

**ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
INSTITUTULUI DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI
PROTECȚIE A PLANTELOR**

Cu titlu de manuscris
CZU: 577.2:611.73 (478)

SACARĂ VICTORIA

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

162.02 – GENETICA OMULUI ȘI ANIMALELOR

Teză de doctor habilitat în științe biologice

Consultanți științifici:

DUCA Maria,

doctor habilitat în științe biologice,
academician al AȘM, profesor universitar



GROPPA Stanislav,

doctor habilitat în științe medicale,
academician al AȘM, profesor universitar



Autor:



SACARĂ Victoria,

doctor în științe medicale,
conferențiar cercetător

CHIȘINĂU, 2019

© Sacară Victoria, 2019

CUPRINS

ADNOTARE.....	5
LISTA ABREVIERILOR.....	8
INTRODUCERE	10
1. GENETICA MALADIILOR NEUROMUSCULARE. GENE-CANDIDATE CU ROLUL MODIFICATOR AL PROCESULUI MIOPATIC	21
1.1. Actualități în domeniul patologiilor ereditare neuromusculare în lume și în Republica Moldova.....	22
1.2. Caracteristicile genetice ale bolilor ereditare neuromusculare abordate în studiu	33
1.3. Caracterizarea genelor presupuse ca factori genetici modificatori în procesele miopatie	55
1.4. Concluzii la capitolul 1	66
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	67
2.1. Materialele cercetării	67
2.2. Metode de cercetare	70
2.3. Metodele de analiză a rezultatelor obținute	82
2.4. Concluzii la capitolul 2	86
3. ASPECTE CLINICO-EPIDEMIOLOGICE ȘI MOLECULAR-GENETICE ALE CERCETĂRII MALADIILOR EREDITARE NEUROMUSCULARE	88
3.1. Spectrul nozologic al bolilor ereditare ale sistemului nervos	88
3.2. Prevalența bolilor neuromusculare ereditare frecvent întâlnite în Republica Moldova.	92
3.3. Caracteristicile molecular-genetice ale bolilor neuromusculare frecvente.....	97
3.4. Diagnosticul prenatal al maladiilor neuromusculare (DMD/B și SMA) în Republica Moldova. Studiul retrospectiv și prospectiv al metodelor utilizate în diagnosticul prenatal	112
3.5. Concluzii la capitolul 3.....	121
4. ANALIZA FRECVENȚEI DE RĂSPÂNDIRE A VARIANTELOR POLIMORFE ALE GENELOR-CANDIDATE ȘI ASOCIEREA LOR CU REALIZAREA PROCESULUI MIOPATIC	123
4.1. Analiza variantelor polimorfe C677T și A1298C a genei <i>MTHFR</i> în grupul de control și la bolnavii cu DMD/B.....	124
4.2. Analiza variantelor polimorfe a genelor <i>MTR</i> A2756G și <i>MTRR</i> A66G în grupul de control și la bolnavii cu DMD/B.....	129
4.3. Analiza variantei polimorfe 4a/4b a genei <i>eNOS</i> la pacienții cu DMD/B și în grupul de control.	132
4.4. Concluzii la capitolul 4.....	136
5. MODELAREA INTERACȚIUNII GENOTIP–FENOTIP ȘI PROGNOSTICUL SEVERITĂȚII PROCESULUI PATOLOGIC LA PACIENȚII CU DMD/B.....	137
5.1. Evaluarea impactului polimorfismelor genelor <i>MTHFR</i> , <i>MTR</i> , <i>MTRR</i> și <i>eNOS</i> asupra evoluției proceselor miopatie	137
5.2 Evaluarea interacțiunii intergenice ale genelor <i>MTHFR</i> , <i>MTR</i> , <i>MTRR</i> și <i>eNOS</i> la bolnavii cu DMD/B	145
5.3. Rolul genelor modificatoare investigate în patogenia miodistrofiei Duchenne.....	159
5.4.Strategia de diagnostic molecular prin personalizarea monitorizării pacienților cu DMD/B.	169
5.5. Concluzii la capitolul 5	172
SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE.....	174
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	186
BIBLIOGRAFIE.....	189
Anexa1. Structura patologiilor BESN în Republica Moldova.....	214

Anexa 2. Distribuția incidenței DMD/B în diferite raioane din Republica Moldova.....	215
Anexa 3. Distribuția incidenței SMA în diferite raioane din Moldova.....	216
Anexa 4. Distribuția incidenței CMT în diferite raioane din RM.....	217
Anexa 5. Frecvența fiecărui exon din gena disrofinei implicat în procesul de deleție la pacienții cu DMD/B investigați.....	218
Anexa 6. Schema complexului de proteine asociate distrofinei (DPC) în mușchii scheletici și ciclul folat	219
Anexa 7. Analiza de durată a delețiilor din gena <i>DMD</i>	220
Anexa 8. Distribuția frecvenței genotipurilor și alelelor genelor-candidate (în baza pacienților din studiu)	221
Anexa 9. Schema diagnosticului clinic.....	222
Anexa 10. Schema diagnosticului molecular-genetic.....	223
Anexa 11. Schema tipurilor de deleție a exonilor în gena <i>DMD</i>	224
Anexa 12. Date predictive pentru calcularea riscului de invalidizare în funcție de factorul genetic prezent la pacient.....	225
Anexa 13. Schema procesului distrofic (E. Hoffman).....	230
Anexa 14. Schema procesului distrofic (L.P. Grinio).....	231
Anexa 15. Schema patogenezei a DMD/B cu implicarea genelor modificatoare	232
Anexa 16. Strategia de diagnostic molecular pentru personalizare.....	233
Declarația privind asumarea răspunderii.....	234
CV AL AUTORULUI.....	235

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 polimorfe 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, персонафикация.

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 был определена частота полиморфных аллелей генов *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *eNOS* в группе больных МДД/Б и контрольной группе. Впервые установлено влияние генов-модификаторов 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 генов-модификаторов 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 nosological 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

2-OMePS – 2-O-metil fosforotioat	DP – diagnostic prenatal
AA – acid ascorbic	DPC – complexul de proteine asociate distrofinei
AAV – virus adenoasociat	DPN – diagnostic prenatal
ADN – acid dezoxiribonucleic	DYS – distrofină
ADNc – acid dezoxiribonucleic complementar	EMG – electromiogramă
ADT – adenzin difosfat	eNOS – gena sintetazei endoteliale de oxid nitric
AON – oligonucleotide antisens	GCFM – genele ciclului folat și celui metioninic
ARNsn – acid ribonucleic nucleolar mic	GRMD – Golden Retriever (model canin pentru distrofie musculară)
ARNm – acid ribonucleic mesager	Hcy – homocisteină
AȘM – Academia de Științe a Moldovei	IMSP IMC – Instituția Medico-Sanitară Publică Institutul Mamei și Copilului
ATP – adenzin trifosfat	LOVD – Leiden open variation database
BESN – boală ereditară a sistemului nervos	MAPH – Multiplex Amplifiable Probe Hybridization
BNM – boală neuromusculară	DMD/B – miodistrofie Duchenne/Becker
BNME – boală neuromusculară ereditară	MDR – Multifactor dimensionality reduction
CFM – ciclul folat metioninic	MESN – maladii ereditare ale sistemului nervos
CGEM – Centrul Genetic de Excelență din Republica Moldova	MLPA – Multiple Ligation Probe Amplification
CK – creatin kinază	MPCR – reacția multiplex de polimerizare în lanț
CMG – consiliere medico-genetică	MTHFR – metilentetrahidrofolatreductază
CMT – boala Charcot-Marie-Tooth	MTR – metionin-sintază
CPK – creatin fosfokinază serică	MTRRv – metionin-sintază-reductază
CR – domeniu bogat în cisteină	NCV – viteza de conducere a impulsului nervos
CNSRGM – Centrul Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală	nNOS – nitric-oxid-sintază
DAPC – dystrophin-associated protein complex	
DGC – complex distrofină-glicoproteină	
DMB – distrofie musculară Becker	
DMD – distrofie musculară Duchenne	
DMP – distrofie musculară progresivă	
dNTP – deoxinucleotidtrifosfat	

NSME – neuropatie senzitivo-motorie ereditară

pb – perechi de baze

PCR – reacție de polimerizare în lanț

PENM – patologii ereditare neuromusculare

PMP 22 –peripheral myelin protein 22

RLFP – polimorfismul lungimii

fragmentelor de restricție

SAH – S-adenozilhomocisteină

SAM – S-adenozilmetionină

SMA – distrofie musculară spinală

SMN – (gena) Survival Motor Neuron

SNP – Single Nucleotid Polymorphism

TC – transcobalamină

THF – tetrahidrofolat

VNTR – repetiții în tandem cu număr variabil

WGCNA – Weighted correlation network analysis

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate

Această lucrare abordează o temă din domeniul modern al științei ce se află la intersecția a două discipline: medicina (neurologia și genetica medicală) și biologia (genetica umană și biologia moleculară). Maladiile ereditare ale sistemului nervos (MESN), datorită polimorfismelor clinice pe care le prezintă și eterogenității genetice, greu se supun diagnosticului și clasificării. Subgrupa maladiilor ereditare ale sistemului nervos include peste 2.400 de maladii diferite, cu frecvența de 1:2000 [1]. Patologiile ereditare neuromusculare (PENM) reprezintă o grupă eterogenă a maladiilor ereditare progresive și degenerative ale sistemului nervos, care se bazează pe structuri ale unității de mișcare (neuroni motori din măduva spinării, nervul periferic, fasciculul muscular), sunt determinate genetic și se manifestă mai frecvent în copilărie și adolescență [2]. PENM constituie o cotă considerabilă printre patologiile monogenice și ocupă, după frecvență, unul dintre primele locuri în Europa [3] și în țările CSI [4]. Nivelul ridicat de invaliditate timpurie, limitarea duratei de viață în urma insuficienței cardio-respiratorii[5], dereglarea aparatului locomotor [6], a somnului, determină exclusiv importanța medicală și social-economică a acestei probleme [7]. 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.

Prezenta lucrare este actuală datorită abordării a două aspecte importante în medicină – aspectul teoretic și aspectul practic. Studiarea caracteristicilor genetico-epidemiologice și molecular-genetice ale bolilor neuromusculare frecvent întâlnite la populația Republicii Moldova este primul studiu de acest gen. 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 genetico-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 în etapa presimptomatică a bolii.

Devine clar că, la etapa actuală de dezvoltare a geneticii medicale, sunt necesare cercetări clinice și genetice cuprinzătoare pentru a rezolva problemele de diagnostic, pentru a prognoza decurgerea corespunzătoare a bolilor, pentru o consiliere genetică eficientă și găsierea unor modalități de corecție terapeutică a acestei patologii. Rezultatele cercetării de față oferă posibilități pentru a reflecta caracteristicile individuale ale pacienților prin prisma medicinei de predicție și medicinei personalizate.

Descrierea situației în domeniul de investigare și identificarea problemelor de cercetare

Neurogenetica clinică se referă la acele domenii ale neurologiei moderne în care au avut loc cele mai semnificative modificări în ultimele decenii. În primul rând, se are în vedere implementarea în medicină a ideologiei și tehnologiei geneticii moleculare, ceea ce a constituit o adevărată revoluție în domeniul diagnosticului afecțiunilor ereditare monogene ale sistemului nervos [8]. O schimbare fundamentală în diagnosticarea maladiilor ereditare monogenice s-a produs datorită introducerii metodelor molecular-genetice în medicină, bazate pe strategia identificării locilor genetici [9], asociați cu bolile monogenice neuromusculare.

Anual, ultima ediție a revistei „Neuromuscular Diseases” publică o actualizare a listei maladiilor musculare monogene în funcție de defectul genetic primar [10]. În versiunea on-line din data de 1.01.2018 se conțin 16 grupe de maladii neuromusculare, sunt incluse 870 de boli, 483 de gene diferite (dintre care 52 gene codifică proteine mitocondriale) și 71 de loci cartajați, care sunt în așteptarea identificării genei [<http://muscle.genetable.fr/>].

În anul 2011, s-a încheiat realizarea Proiectului „NMD-Chip”, care a unificat activitatea a 13 grupuri științifice din opt state europene, direcționată spre crearea tehnologiei de diagnostic al PENM prin metode moleculare, extrem de sensibile, eficiente și productive. Cercetările s-au desfășurat în două direcții: identificarea noilor mutații în diferite populații ale Europei, cu crearea unei baze unice de date și producția de chip-uri de diagnostic pentru îngrijirea practică a sănătății. 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 (HVP)” s-a discutat despre importanța utilizării bazelor de date pentru cercetări științifice și aplicări practice [11].

Baza de date UMD-DMD este un exemplu de bază de date existentă în Franța [12], fundamentată pe analiza genotip-fenotip la unele eșantioane mari de pacienți cu distrofie

musculară Duchenne [3]. Descoperită în anul 1986, gena distrofina DMD și mutațiile ei, ce provoacă diferite forme clinice de miodistrofie Duchenne și Becker (DMD/B), rămân un subiect actual pentru instituțiile științifice [13]

După circa 25 de ani de urmărire și gestionare a pacienților cu MESN, în Republica Moldova au fost create registrul și biobanca familiilor cu patologii ereditare neuromusculare. Acest registru permite realizarea monitoringului familiilor cu risc sporit de patologie ereditară neuromusculară și identificarea necesității de efectuare a diagnosticului prenatal în anumite raioane ale republicii [14]. Efectuarea analizei molecular-genetice permite evidențierea caracteristicilor patologiilor neuromusculare ereditare în regiune, elaborarea unui algoritm eficient de diagnostic al ADN la pacienții din Republica Moldova și desfășurarea analizei comparative cu alte țări a frecvențelor de apariție a mutațiilor [15]. Observarea și monitorizarea pe termen lung a pacienților cu DMD/B ne-a permis să formulăm următoarea ipoteză științifică: prezența unor mutații compuse specifice în genele modificatoare schimbă puterea și tipul de interacțiune intergenică ce afectează rata de progresare și, respectiv, patogenia miopatiei. Prin aplicarea terapiei standardizate de reabilitare, inclusiv prin administrarea metioninei, s-a constatat o rată diferită a procesului de progresare miopatică (o vârstă diferită de plasare în scaunul cu rotile) la pacienții cu aceleași mutații în gena distrofinei. Acest fapt a stat la baza cercetării genetice efectuate asupra polimorfismelor genelor ciclului folat (*MTHFR*), ciclului metioninic (*MTR*, *MTRR*) și genei funcției endoteliale (*eNOS*), pentru a determina rolul lor în evoluția miopatiei. Evaluarea efectelor modificatoare ale unor sisteme genetice asupra expresiei fenotipice a patologiei monogenice are o importanță fundamentală pentru înțelegerea patogeniei procesului miopatic [16].

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.

Elaborarea strategiei de diagnostic molecular, luând în considerare caracteristicile individuale ale pacienților cu DMD/B pentru predicția evoluției și personalizarea tratamentului.

Metodologia cercetării științifice

Cercetarea de față a fost efectuată în cadrul IMSP Institutului Mamei și Copilului (Laboratorului de Genetică Moleculară Umană), Centrului de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală, unicul Centrul de Genetica din republică, unde se concentrează pacienții suspecți la maladii genetice. Design-ul studiului științific este prezentat în Figura 1.

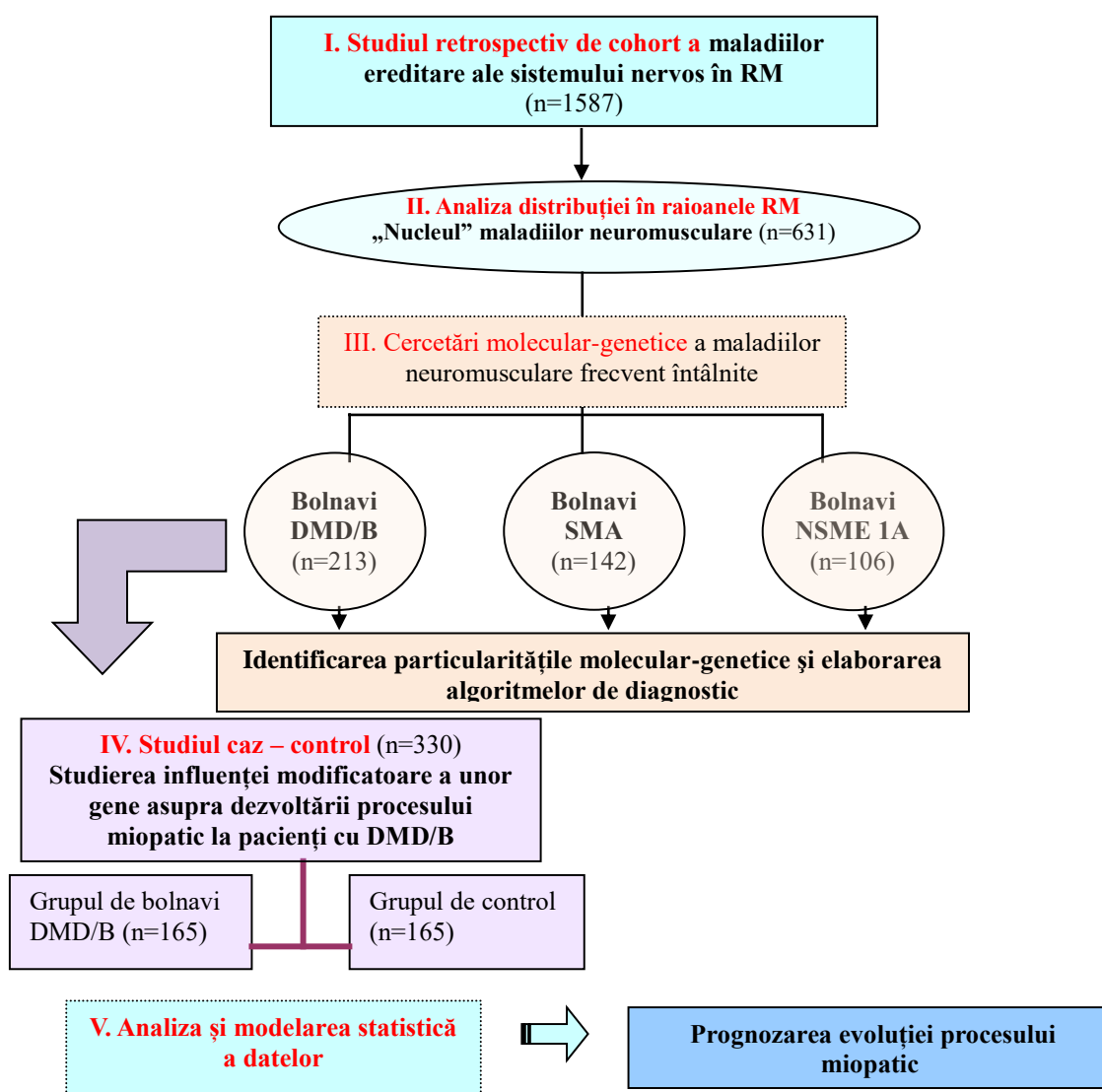


Fig. 1. Design-ul studiului științific

Pentru soluționarea sarcinilor propuse au fost utilizate următoarele metode: clinico-genealogice, biochimice, electrofiziologice, analiza spectrului nozologic (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) [17], PCR multiplex (MPCR) și polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (RFLP) [14], 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 [18]. Pentru prelucrarea statistică a datelor au fost folosite programele Microsoft Excel 2010 și MDR (3.02) [19][20] și resurse web: www.gen-exp.ru, www.r-project.org.

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute din lucrare cuprinde monitoringul de lungă durată a bolilor ereditare ale sistemului nervos și pe baza abordării populaționale cu utilizarea metodei clinico-epidemiologice, efectuarea cercetării privind spectrul, răspândirea și aprecierea frecvenței relative a patologiilor neuromusculare în cadrul populației Republicii Moldova (23,5:100000). A fost folosit conceptul de „nucleu” al patologiei neuromusculare (3 forme nozologice: DMD/B, SMA, CMT 1A), în calitate de caracteristică a geneticii medicale importantă pentru analiza comparativă a populațiilor panmictice. A fost remarcată agravarea patologiei neuromusculare autozomale și X-linkate, în funcție de raioanele republicii.

Au fost obținute date noi despre particularitățile molecular-genetice ale miodistrofiei Duchenne, amiotrofiei spinale și neuropatiei motosenzoriale ereditare tip 1A pe un eșantion de pacienți din Republica Moldova investigați. Au fost depistate 6 tipuri rare de deleții, 16 deleții duble și 4 deleții noi la pacienții cu miodistrofia Duchenne, care lipseau în baza de mutații a patologiilor neuromusculare DMD-LOVD v3.0 (update 08.12.2018). 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.

În premieră a fost stabilită frecvența genotipurilor și alelelor a genelor *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *eNOS* în cadrul grupului de bolnavi cu DMD/B și de control.

A fost înaintată ipoteza influenței modificatoare a genelor ciclurilor folat și metioninic (GCFM) și a genei funcției endoteliale asupra evoluției procesului miopatic și a fost efectuată analiza complexă a relației dintre caracteristicile genelor și gravitatea progresării procesului miopatic.

Prin metoda regresiei logistice multinominale a fost apreciată contribuția polimorfismelor genelor ciclului metioninic, al acidului folic, al genei sintazei oxidului nitric și au fost depistate tendințele specifice care au un impact major asupra timpului de progresare a procesului miopatic.

Au fost studiate tipurile și puterea de interacțiune a patternului genelor polimorfe ale ciclurilor folat și metioninic și a genei funcției endoteliale în DMD/B și a fost determinat rolul lor în formarea componentelor genetice (modificatoare), concomitent cu mutațiile din gena *distrofinei* în cazul progresării procesului patologic la diferite vârste (9 și 12 ani), ca un criteriu ce indică gravitatea procesului miopatic. 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

Pentru prima dată a fost determinată influența genelor modificatoare asupra patogenezei la DMD/B. A fost estimat rolul asocierii genelor modificatoare în cazul patologiei monogenice, care permite completarea șirului de legături patogenetice ale procesului patologic. 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. Această abordare pentru prima dată a permis soluționarea problemei prognozării decurgerii bolii la DMD/B. Paradigma aceasta poate fi aplicată în viitor la prognozarea progresării altor maladii ereditare.

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. Valoarea teoretică a cercetării este determinată de introducerea în circuitul științific al datelor privind spectrul, distribuția și frecvența PENM; frecvențelor alelelor polimorfe a genelor *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *eNOS* în grupul control și la bolnavii cu DMD/B din Republica Moldova. Stabilirea frecvenței heterozigoților este necesară pentru evaluarea gradului informațional al acestor loci în Moldova și pentru utilizarea lor în analiza molecular-genetică. Datele obținute prin intermediul acestui studiu permit efectuarea unei analize comparative a genofondurilor diferitor populații și țări.

Folosind datele cercetării, a fost elaborată modelarea matematică, ceea ce a permis evaluarea importanței și a impactului factorilor genetici modificatori asupra timpului progresării procesului patologic și crearea tabelului de predicție a evoluției acestuia.

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. De fapt, consultul medico-genetic reprezintă veriga principală în complexul metodelor indirecte de examinare a femeii gravide cu scopul de profilaxie a bolilor ereditare și a patologiilor malformative fetale [21]. Scopul consultului medico-genetic îl constituie: prognosticul nașterii unui copil cu patologii ereditare și congenitale, explicarea posibilității unei evoluții nefavorabile a sarcinii și ajutorul femeii (familiei) în cazul confirmării acesteia, ca să ia o decizie corectă vizavi de nașterea copilului [21].

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 familii. A fost soluționată o sarcină importantă pentru medicina practică: s-a demonstrat posibilitatea efectuării diagnosticării ADN-ului pentru o anumită familie pentru diferite tipuri de maladii genetice. Este propusă optimizarea metodelor molecular-genetice a aprecierii genelor *MTHFR*; *MTR*; *MTRR* de prevenire primară a defectelor dependente de acidul folic în Republica Moldova [22], care includ și anomaliile tubului neural [23], precum și a pierderii reproductive asociate cu genele ciclului folat [24].

A fost propusă o strategie molecular-genetică de diagnostic la pacienții cu DMD/B, care este direcționată spre identificarea particularităților individuale ale bolnavilor din perspectiva medicinei predictive și personalizate. Aplicarea cunoștințelor privind starea ciclurilor metabolice, cu corecția ulterioară individuală a pacientului, reprezintă baza medicinei secolului XXI – „medicina celor 4P: personalizată, predictivă, preventivă și participativă”.

Metoda propusă de modelare poate fi testată pe alte eșantioane, deoarece este comodă, universală și are costuri financiare mici.

Această cercetare a permis lărgirea cooperării cu colegii din alte țări și afilierea la societăți științifice (InNerMeD, TREAT-NMD). Rezultatele obținute au fost folosite pentru predarea materiei studenților, masteranzilor, elevilor liceeni, de asemenea, au fost prezentate la televiziune și în presa specializată în popularizarea cunoștințelor științifice.

Rezultatele științifice principale 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 aplicate în lucrul practic al Laboratorului de Genetică Moleculară Umană și al secțiilor neurologice ale IMSP IMC, precum și în cabinetele de consultanță genetică ale Centrului de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală sub formă de protocoale clinice de management al pacienților cu DMD/B și SMA și protocoale de cercetări de laborator (20 acte de punere în practica de rutină a Laboratorului de Genetică Moleculară Umană).

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetării au fost prezentate la Conferințele Societății Europene de Genetică Umană (European Human Genetics Conference) din 2004, 2005, 2006*, 2007, 2008*, 2009, 2010*, 2013, 2014*, 2015, 2016* cu publicarea ulterioară în

„European Journal of Human Genetics”; la Congresele Federației Europene a Societăților Neurologice (the European Federation of Neurological Societies) din 2001*, 2002*, 2003*, 2004*, 2005*, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010*, 2014*; la reuniunea Societății Americane de Genetică Umană din 2005 („American Journal of Human Genetics”); la reuniunea clinică a Societății Americane de Miodistrofie (MDA) din 2012. Multe dintre lucrări au fost remarcate (fellowships)* de comitetele științifice ale acestor comunități.

Rapoarte orale privind rezultatele cercetării au fost prezentate la sesiunile plenare la Adunarea liderilor Asociației „European Surveillance of Congenital Anomalies” EUROCAT (Helsinki, Finlanda, 2008); EPNS Research Meeting (București, România, 2014); Southeastern Europe InnerMed Networking Meeting (Zagreb, Croația, 2015), Conferința Geneticienilor și Amelioratorilor (Chișinău, 2010); Conferințele ”Rare Disease in Moldovan Children Toward EU Standards of Care” (Chișinău, 2016) și „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community” (Chișinău, 2016); Congresul al XVIII-lea al Societății de Neurologie și Psihiatrie a Copilului și Adolescentului din România (România, Cluj-Napoca, 2017), la Conferința consacrată aniversării a 35 ani de la fondarea Institutului mamei și copilului (Chișinău, 2017), la Conferința „Rare Disease” (Chișinău, 2018, 2019), la V-lea Congres de Genetica Medicala (Gura Humurului, 2018), la Conferința Științifică anuală a Institutul Mamei și Copilului (Chișinău, 2017, 2018, 2019).

Publicații la tema tezei. Rezultatele cercetării au fost expuse în 76 de lucrări științifice (9 monoautor), publicate în reviste naționale și internaționale, inclusiv 2 monografii, 2 ghiduri practice, 2 lucrări științifico-metodice și didactice, 2 articole în reviste științifice internaționale, 4 - în reviste recunoscute în străinătate, 26 – în reviste naționale (11 cu categoria B și 15 cu categoria C), materiale prezentate la forurile științifice internaționale (32) și naționale cu participare internațională (8), 20 de acte de implementare.

SUMARUL COMPARTIMENTELOR TEZEI

Teza este expusă pe 233 pagini de text electronic și include: introducere, 5 capitole, sinteza rezultatelor obținute, concluzii generale și recomandări, indicele bibliografic cu 306 de surse citate și 16 anexe. Materialul iconografic conține 40 de figuri, 24 de tabele, 9 formule, 1 design, 4 algoritmi.

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

În *Introducere* sunt reflectate: actualitatea problemei abordate, reperele conceptuale prin redarea scopului și obiectivelor lucrării, metodologia cercetării științifice, noutatea științifică a rezultatelor obținute, semnificația teoretică și valoarea aplicativă, principiile de bază înaintate spre susținere, aprobarea rezultatelor științifice.

Capitolul 1 „Genetica maladiilor neuromusculare. Gene-candidate cu rolul de modificador al procesului miopatic” conține analiza referințelor de specialitate vizând tematica studiului (genetica maladiilor neuromusculare contemporană și posibilitățile de tratament), descrierea particularităților unice ale genelor metabolismului homocisteinei și oxidului nitric, care determină baza biochimică individuală ereditară, amprenta digitală irepetabilă.

În **Capitolul 2 „Materiale și metode de cercetare”** este prezentat designul studiului, sunt descrise materialele și metodele de investigație, precum și etapele de cercetare, formarea loturilor de studiu. Sunt descrise minuțios metodele clinice și cele paraclinice de acumulare a datelor primare, în special metodele molecular-genetice de investigație, ilustrate prin algoritmul investigațional.

În **Capitolul 3 „Aspecte clinico-epidemiologice și molecular-genetice ale cercetării maladiilor ereditare neuromusculare”** utilizând baza de date pentru perioada 1991-2018, a fost stabilit că cele mai frecvente patologii neuromusculare întâlnite în eșantionul de pacienți din Republica Moldova (n=1587) sunt: neuropatia motosenzorială (17,39%), miodistrofia Duchenne-Becker (15%), amiotrofia spinală (12,98%), care constituie „nucleul” bolilor ereditare neuromusculare. A fost calculată frecvența relativă a patologiilor neuromusculare în cadrul populației Republicii Moldova care constituie 23,5:100000 de locuitori. Frecvența miodistrofiei Duchenne/Becker este 9,13:100000 de locuitori, amiotrofie spinală 8,43:100000 de locuitori și neuropatii senzorial motorii 7,2:100000 de locuitori. A fost determinată o asocierie medie semnificativă ($\rho=0,48$) între numărul cazurilor de patologii DMD/B, SMA și NSME tip 1A cu mărimea și compoziția națională a populației raioanelor țării. Au fost obținute date noi despre particularitățile molecular-genetice ale miodistrofiei Duchenne, amiotrofiei spinale și neuropatiei motosenzoriale ereditare tip 1A pe un eșantion de pacienți din Republica Moldova investigați. Au

fost depistate 6 tipuri rare de deleții în gena *DMD*, 16 deleții duble și 4 deleții noi la pacienții cu miodistrofia Duchenne, care lipseau în baza de mutații a patologiilor neuromusculare DMD-LOVD v3.0 (update 08.12.2018). La 85% de pacienți cu amiotrofie spinală constituie 85% au fost găsite deleții ale exonilor 7 sau 8 a genei *SMNI*, ceea ce corespunde cu datele internaționale. La 28% de pacienții din Republica Moldova este găsită deleția concomitentă a exonilor 7 și 8 în gena *SMNI*, ce este diferit de la populațiile iraniene sau indiene. Frecvența duplicației în gena *PMP22* (17p11.2-p12) la pacienții cu NSME 1A din Republica Moldova este de 69%, mai frecvent decât în Coreea (46,9%), Italia (57,6%), Australia (60,7%), Japonia (23,3%), Marea Britanie (28,2%), Statele Unite (51,6%), Rusia (53,6%). Este prezentat algoritmul folosit în scopul cercetării complexe a familiilor cu risc de maladii ereditare ale sistemului neuromuscular.

Capitolul 4 „Analiza frecvenței de răspândire a variantelor polimorfe ale genelor-candidate și asocierea lor cu realizarea procesului miopatic” conține descrierea în premieră a rolului variantelor polimorfe ale genelor ciclului folat, ciclului metioninic și genei *eNOS* în formarea predispoziției pentru procesul miopatic cu progresare ulterioară și risc de invaliditate timpurie. Este reflectat nivelul real al heterozigoției pentru locii *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTRR A66G*, *MTR A2756G* și *NOS3 4a/4b* în populația sănătoasă și la bolnavi cu DMD/B din Republica Moldova. Este analizată frecvența distribuției locilor polimorfi în populația țării noastre, comparativ cu datele unor cercetări similare ale populațiilor din diferite state ale Europei, Asiei și Americii.

În **Capitolul 5 „Modelarea interacțiunii genotip – fenotip și prognosticul severității procesului patologic la pacienții cu DMD/B”** este demonstrată influența modificatoare a genelor ciclurilor folat și metioninic (CFM) și a genei *eNOS* asupra evoluției procesului miopatic și se efectuează analiza complexă a relației dintre caracteristicile genelor și gravitatea progresării procesului miopatic. Prin metoda regresiei logistice multinominale a fost apreciată contribuția polimorfismelor genelor ciclului metioninic și al acidului folic, fiind depistate tendințele specifice, care au un impact major asupra vitezei de progresare a procesului. Sunt studiate tipurile și puterea de interacțiune a patternului genelor polimorfe ale ciclurilor folat, metioninic și ale genei funcției endoteliale în DMD/B și este indicat rolul lor în formarea componentelor genetice (modificatoare) alături de mutațiile din gena distrofinei, în cazul evoluției rapide a procesului patologic. În consecință, este propusă strategia monitoringului personalizat al bolnavilor cu DMD/B.

Sinteza rezultatelor obținute este un capitol de analiză și deliberări argumentate asupra rezultatelor obținute, vizavi de opiniile expuse în literatura de specialitate cu referire la domeniul abordat.

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

Mecanismele genetice joacă un rol major în dezvoltarea procesului patologic al bolilor sistemului nervos, iar contribuția specifică a factorilor ereditari în evoluția unei sau altei forme nozologice poate fi diferită.

Din punctul de vedere al varietății patologiilor neurologice, se pot evidenția două grupe mari [11]. Prima grupă include bolile *monogenice* ereditare. Ele sunt cauzate de mutații într-o singură genă și reprezintă un factor determinant asupra evoluției maladiei. Moștenirea acestei mutații genetice conduce la reapariția fenotipului patologic în cadrul unei familii concrete. Rezultatul unor astfel de mutații este de obicei un defect funcțional semnificativ într-o enzimă, un receptor, o proteină structurală sau de transport, ceea ce se află la baza relației cauzale dintre defectul genei și progresarea bolii. Bolile ereditare monogenice se supun unor legi stricte de transmitere, ce reflectă principiul segregării defectului genetic într-o serie de generații. Astfel de boli sunt numite convențional „mendeliene”, în cinstea savantului G. Mendel. Pentru patologii ereditare mendeliene, rolul locusului genetic principal în etiopatogeneza bolii este primordial, însă expresia fenotipică a mutației poate fi, într-o anumită măsură, modificată prin acțiunea altor factori exogeni.

A doua grupă de boli neurologice include un număr mare de maladii, definite ca *poligenice* sau *multifactoriale*. În patogeneza acestor maladii, de primă importanță sunt o serie de mecanisme interdependente biochimice, imunologice etc., controlate de loci genetici diferiți. În acest context, anumite variante concrete ale unei sau ale mai multor gene majore nu sunt „fatale” și doar determină caracteristicile interacțiunii organismului cu mediul [25].

Bolile neuromusculare ocupă primul loc printre bolile ereditare monogenice ale sistemului nervos. Potrivit datelor lui A. Emery (1991), răspândirea totală a tuturor patologiilor neuromusculare ereditare este de $250-300 \times 10^{-6}$ (adică 1 caz la 3.500 de locuitori). Luând în considerare faptul că pentru această grupă de maladii este caracteristic un proces patologic progresiv, precum și lipsa tratamentului eficient, bolile neuromusculare constituie una dintre cele mai actuale probleme ale neurogeneticii clinice. Profilaxia cazurilor recurente de boli neuromusculare, în familii cu „risc ridicat”, reprezintă astăzi singura modalitate eficientă de combatere a acestor maladii grave, adesea fatale, iar diagnosticul ADN-ului este cel mai important factor în prevenirea lor [14].

1.1. Actualități în domeniul patologiilor ereditare neuromusculare în lume și în Republica Moldova

În prezent sunt cunoscute mai mult de 2.400 de boli ale sistemului nervos [1]. În acest context, trebuie remarcată dezvoltarea rapidă a geneticii medicale și a biologiei moleculare în ultimele decenii. Dacă în anul 1932 identificate aproximativ 40 de boli ereditare ale sistemului nervos, atunci în 1980 erau deja peste 400. La momentul actual sunt descrise 870 de boli neuromusculare.

Bolile neuromusculare (BNM) reprezintă un grup mare de maladii caracterizate prin pareză flasă progresivă sau prin paralizia progresivă a diferitor grupe musculare, ca rezultat al afectării anumitor compartimente ale arcului reflex, ce asigură funcția musculară normală [26].

Pierderea sau modificarea activității motorii normale, cauzată de scăderea forței musculare și a tonusului muscular, poate să apară fie ca urmare a afectării propriu-zise a mușchilor (boli musculare primare), fie ca urmare a afectării nervilor periferici (diferite tipuri de polineuropatie), a motoneuronilor măduvei spinării (atrofii spinale musculare) sau a disfuncțiilor joncțiunii neuromusculare (miastenie), precum și din cauza dereglărilor care afectează indirect activitatea mușchilor [26].

Principalele motive pentru apariția BNM sunt maladiile autoimune, factorii ereditari/genetici și intoxicația cu diferite substanțe. În mod similar, acest grup include o parte din erorile înnașcute de metabolism (inclusiv bolile cu depozitare lizozomală și bolile mitocondriale) și maladiile neurodegenerative cu simptome similare.

Bolile neuromusculare ereditare (BNME) reprezintă cea mai frecventă grupă de maladii monogene ale sistemului nervos cu diferite tipuri de moștenire (autozomal dominant, autozomal recesiv, X-linkat, pe linie maternală) și în majoritatea regiunilor din Rusia, în care s-au efectuat studii [4], precum și la alte populații ale lumii [11], acestea alcătuiesc mai mult de 50% din structura spectrului nozologic al bolilor ereditare ale sistemului nervos.

Similitudinea semnificativă a manifestărilor clinice în grupa BNME (simptomele parezei flasce a diferitor grupuri de mușchi) creează dificultăți semnificative la diagnosticul diferențial în etapa examinării clinice [27] și numai metodele molecular-genetice ajută la stabilirea unui diagnostic veridic [9].

Diagnosticul topic incorect conduce la erori în depistarea unei anumite forme nozologice a BNME, fapt ce sporește costurile pentru efectuarea analizelor molecular-genetice și/sau nu permite realizarea profilaxiei apariției unor cazuri repetate în cadrul unei familii împovăraătoare, determinarea statusului genetic al rudelor pacientului, precum și selectarea terapiei patogenetice adecvate, care este posibilă în unele cazuri de boli ale grupe date [28].

Analiza molecular-genetică ne permite să excludem studiile de diagnosticare suplimentare și să anticipăm potențialul de reabilitare al pacientului. Unele dintre bolile din această grupă au un tratament patogenetic, ce permite prevenirea sau încetinirea semnificativă a progresării simptomelor neurologice. Datorită diagnosticului genetic, poate fi calculat riscul de îmbolnăvire la generațiile următoare și pot fi evitate cazurile repetate în familie [29].

Formele de bază ale BNME:

I. Maladii musculare primare:

- miopatii congenitale structurale (inclusiv boala axului central, miopatia nonmieloidă, miopatia miotubulară etc.);
- distrofii musculare progresive (distrofii musculare congenitale, distrofii musculare la nivelul centurii și membrilor (inclusiv distrofie musculară Duchenne/Becker, distrofie musculară Emery-Dreifuss), distrofie musculară umăr-scapulo-facială, distrofii musculare scapular-peroneale, distrofii ale musculaturii oculofaringiene, distrofie musculară distală.

II. Miopatii metabolice:

- deficiența fosforilazei/boala McArdle;
- deficiența maltazei acide/boala Pompe;
- deficiența fosfofructokinazei/boala Tauri;
- miopatie mitocondrială;
- deficiența carnitinei;
- deficiența carnitin-palmitoil transferazei;
- deficiența de lactat-dehidrogenază-metil transferază ș.a.

III. Maladia neuronilor motori:

- diferite tipuri de atrofie musculară spinală (incluzând maladiile Werdnig-Hoffmann, Kugelberg-Welander, Kennedy, Fenkel);
- scleroza laterală amiotrofică.

IV. Maladiile nervilor periferici:

- neuropatii motorii senzoriale și vegetative senzoriale izolate și sindromice (inclusiv maladiile Charcot-Marie-Tooth, Dijerine-Sottas).

V. Maladiile sinapselor neuromusculare:

- miastenii.

VI. Miotonii și paralizii periodice:

- diferite forme nozologice de miotonie și paramiotonie (incluzând distrofia miotonică);

- paralizie periodică.

În ultimii ani, lunar se descrie un nou sindrom sau o boală ereditară, de aceea problemele ce țin de clasificarea maladiilor ereditare sunt încă departe de a fi soluționate, fiind prezentate doar principiile de bază ale clasificării acestora.

Maladiile ereditare umane pot fi clasificate:

1. În funcție de *nivelul afectării aparatului ereditar*: maladii cromozomiale – maladii genetice (sau moleculare): această abordare este importantă pentru determinarea metodelor de diagnosticare.

2. În funcție de *manifestarea clinică a bolii*, având în vedere gradul afectării sistemului nervos și sindromul de bază. Dezvoltarea clasificării clinice este foarte importantă pentru activitatea practică a clinicienilor. Aceasta permite stabilirea subiectului și a diagnosticului clinic preliminar în baza examinării clinice de rutină. Astfel, în conformitate cu principiul dat se pot distinge distrofiile musculare primare, amiotrofiile secundare (neurogenice și spinale) și degenerări cerebeloase, piramidale, extrapiramidale și corticale.

3. În funcție de *defectul biochimic*. Au fost studiate maladiile ereditare cu afectarea metabolismului carbohidraților (diabet zaharat), metabolismului aminoacizilor (fenilcetonurie, histidinemie etc.), metabolismului lipidelor (neurolipidoză), metabolismul mineralelor (degenerare hepatocerebrală). Cu toate acestea, în multe maladii ereditare, patogenia și defectele biochimice nu sunt cunoscute și, din aceste considerente, un număr mare de maladii ereditare nu pot fi clasificate în funcție de acest criteriu.

4. În funcție de *tipul de moștenire*:

a) tipul autozomal dominant de moștenire: coreea Huntington, boala Parkinson, ataxia cerebrală Pierre-Marie;

b) tipul autozomal recesiv de moștenire: boala Friedreich, fenilcetonuria, amiotrofiile spinale;

c) moștenirea recesivă, legată de sex: hemofilia, distrofia musculară Duchenne.

5. Alte tipuri de moștenire mai puțin studiate: codominant, dominant, linkat cu cromozomul X.

Trebuie remarcat faptul că într-o serie de maladii (amiotrofia neurogenă Charcot-Marie-Tooth, boala Strumpell-Lorrain ș.a.), în cadrul diferitor familii se observă diverse tipuri de moștenire, fapt ce confirmă eterogenitatea patologiei genetice în cazul acestor maladii. Determinarea tipului de moștenire are o importanță considerabilă pentru medicii-geneticieni la prognozarea pacienților din această familie, la determinarea purtătorilor heterozigoți și dezvoltarea unor activități în vederea profilaxiei patologiei ereditare.

Odată cu acumularea materialului experimental, studiul patogenezei maladiilor, identificarea genelor responsabile pentru apariția patologiei și determinarea tipurilor de moștenire, clasificarea maladiilor neuromusculare ereditare se edifică și se perfecționează.

În acest sens, anual, începând cu 1991, revista „Neuromuscular Disorders” publică o listă de maladii neuromusculare monogene în funcție de defectul primar al genei. Din anul 2005 și până în prezent, această listă este prezentată de 16 grupe de maladii neuromusculare: 1) distrofii musculare; 2) distrofii musculare congenitale; 3) miopatii congenitale; 4) miopatii distale; 5) alte miopatii; 6) sindromul miotonic; 7) boala canalelor ionice; 8) hipertermie malignă; 9) miopatii metabolice; 10) cardiomiopatii ereditare, subgrupele 10-A și 10-B (aritmogene); 11) sindroame miastenice congenitale; 12) afecțiuni ale neuronului motor; 13) ataxie congenitală; 14) neuropatii senzorial-motorii ereditare; 15) paraplegie ereditară; 16) alte afecțiuni neuromusculare [37]. În același an, a fost revizuită și actualizată lista de maladii și gene cu ajutorul unor specialiști renumiți în domeniu, precum Kate Bushby (gr. distrofii musculare), Francesco Muntoni și Pascale Guicheney (gr. distrofii musculare congenitale și cardiomiopatii ereditare), Ana Ferreira (gr. miopatii congenitale), Bjarne Udd (gr. miopatii distale), Louis Ptacek (gr. boala canalelor ionice), Salvatore Di Mauro (gr. miopatii metabolice). De asemenea, în anul 2005 a apărut o bază de date tabelară de gene disponibilă online („online gene table database”), ce reprezintă un sistem cu adresa URL: <http://www.musclegenetable.org>. În anul 2009, pe site-ul online au fost înregistrate 481 de maladii și 243 de gene [30]. În decembrie 2014 erau descrise 761 de fenotipuri patologice și 406 de gene diferite (42 dintre care fiind codificate de proteine mitocondriale), 76 de loci cartajați, pentru care se cerea identificarea unei gene [10].

La data de 02.01.2018, Gene Table of Neuromuscular Disorders deține informații cu privire la 870 de maladii, 483 de gene diferite, printre care 52 sunt mitocondriale (<https://www.worldmusclesociety.org/news/view/85>). Creșterea numărului de boli și gene descrise în fiecare an demonstrează intensitatea dezvoltării acestui domeniu.

Prevalența bolilor neuromusculare în lume constituie 2,4–33,8 cazuri la 100.000 de persoane [31]. Prevalența sumară a bolilor neuromusculare constituie 27,2 la 100.000 de persoane.

Marea majoritate a acestor maladii progresează în mod inevitabil, iar la momentul actual nu dispun de un tratament adecvat. Pacienții primesc terapie simptomatică, reabilitare fizică, chirurgie ortopedică și suport respirator. Cercetările științifice din întreaga lume sunt direcționate spre căutarea unui tratament diferențiat (terapie de substituție enzimatică), precum și spre dezvoltarea metodelor de terapie genetică și moleculară.

Adesea, pentru definirea formei nozologice a BNME și pentru identificarea mutațiilor genetice, este nevoie de o perioadă îndelungată. În consecință, apar dificultăți la alegerea unei terapii adecvate, crește costul pentru efectuarea unor analize genetico-moleculare. BNME prezintă un risc sporit de moștenire, iar în absența unui diagnostic genetic precis, este imposibilă prevenirea apariției cazurilor repetate de boală în familie.

Bolile neuromusculare sunt eterogene în ceea ce privește manifestările clinice. În acest sens, pentru medici este dificil de a face distincția între grupurile de boli neuromusculare și a stabili un diagnostic corect. O nouă metodă de secvențiere completă a exonilor, luând în considerare manifestarea clinică, oferă mai multe posibilități de diagnosticare [13]. Datele obținute pot fi analizate prin metode bioinformatiche chiar și peste ani, în scopul depistării unor noi cauze de boală, necunoscute anterior [32]. În timp, odată cu creșterea numărului bazelor de date, secvențierea de nouă generație (NGS – Next Generation Sequencing) și exomul (setul complet de exoni prezenți într-un organism) clinic pot constitui prima etapă a diagnosticului maladiilor ereditare.

Pentru a stabili un diagnostic, medicii examinează pacienții cu boli neuromusculare timp de câteva luni, iar uneori – chiar ani. În general, cel mai frecvent sunt folosite metode indirecte de diagnostic, ce vizează manifestările bolii și simptomatologia, însă nu confirmă cauzele apariției acesteia, care, de fapt, sunt genetice. Anterior, secvențierea completă a exonilor nu era disponibilă în practica asistenței medicale. Totuși, în ultimii ani, costul decodificării exomului (regiuni ale genomului ce codifică genele) a scăzut semnificativ. Astfel, anume reducerea costurilor și disponibilitatea decodificării exomului constituie obiectivul principal al laboratoarelor genetice din întreaga lume. Din anul 2015, laboratoarele de clasă mondială au început să elaboreze și să evalueze eficacitatea abordării integrate a secvențierii de următoare generație (NGS), analizând simultan toate genele cunoscute, responsabile de dezvoltarea bolilor neuromusculare ereditare eterogene din punct de vedere clinic și genetic [13]. În continuare sunt prezentate panelurile pentru 10 categorii de boli neuromusculare ereditare, dezvoltate la Baylor Miraca Genetics Laboratories (Houston, USA), care permit analiza tuturor exonilor și a secvențelor intronice adiacente (circa 20 pb) din cadrul a 236 de gene responsabile de BNME, prin secvențierea NGS cu ajutorul echipamentului HiSeq2000, Illumina [13]:

1) Miopatii metabolice – 39 de gene: *ABHD5, ACADM, ACADS, ACADVL, AGL, ALDOA, CPT1A, CPT1B, CPT1C, CPT2, ENO3, ETFA, ETFB, ETFDH, G6PC, GAA, GBE1, GYG1, GYS1, HADH, HADHA, HADHB, LDHA, LPIN1, PFKM, PGAM2, PGK1, PGM1, PHKA1, PHKA2, PHKB, PHKG2, PNPLA2, PRKAG2, PYGM, PYGL, SLC22A5, SLC25A20, SLC37A4.*

2) Distrofie musculară congenitală – 18 gene: *CHKB, COL6A1, COL6A2, COL6A3, DNM2, FHL1, FKRP, FKTN, GTDC2, ISPD, ITGA7, LAMA2, LARGE, POMT1, POMT2, POMGNT1, SEPNI, TCAP*.

3) Miopatie congenitală – 21 de gene (2): *ACTA1, BIN1, CCDC78, CFL2, CNTN1, DNM2, KBTBD13, MTM1, MTMR14, MYBPC3, MYF6, MYH2, MYH7, NEB, RYR1, SEPNI, TNNT1, TPM2, TRIM3, TTN, TPM*.

4) Alte miopatii – 16 gene (3): *ACVR1, BAG3, CAV3, CRYAB, DES, FHL1, FLNC, GDF8, ISCU, LAMP2, LDB3, PABPN1, PLEC1, SEPNI, TTID, TTN*.

5) Afecțiunile neuronului motor – 37 gene: *ALS2, ANG, AR, ATP7A, ATXN2, BSCL2, CHMP2B, DCTN1, DYNC1H1, ERBB3, FIG4, FUS, GARS, GLE1, HSPB1, HSPB3, HSPB8, IGHMBP2, MYBPC1, NEFH, OPTN, PFN1, PIP5K1C, PLEKHG5, PRPH, REEP1, SETX, SIGMARI, SMN1, SOD1, TARDBP, TRPV4, UBA1, UBQLN2, VAPB, VCP, VRK1*.

6) Sindroame miastenice congenitale – 14 gene (1): *AGRN, CHAT, CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE, COLQ, DOK7, GFPT1, LAMB2, MUSK, PLEC1, RAPSN, SCN4A*.

7) Artrogripoză sau arthrogyrosis multiplex congenita – 21 gene (6): *CHRNA1, CHRND, CHRNG, DHCR24, DOK7, ERCC2, ERCC6, FBN2, HRAS, LMNA, MYBPC1, MYH3, MYH8, RAPSN, RIPK4, TPM2, TNNI2, TNNT3, VIPAR, VPS33B, ZMPSTE24*.

8) Sindroame miotonice sau boala canalelor ionice – 20 de gene (2): *ATP2A1, CACNA1A, CACNA1S, CAV3, CLCN1, DMPK, HSPG2, KCNA1, KCNE1, KCNE2, KCNH2, KCNJ5, KCNJ11, KCNJ18, KCNQ1, LIFR, SCN4A, SCN4B, SCN5A, ZNF9/CNBP*.

9) Boala Charcot-Marie-Tooth sau boli peroxizomale – 58 de gene (8): *AARS, ARHGEF10, ATLI, CTDPI, DNM2, DNMT1, DYNC1H1, EGR2, FGD4, FIG4, GAN, GARS, GDAP1, GJB1, HOXD10, HSPB1, HSPB8, IKBKAP, KIF1A, KIF1B, LITAF, LMNA, LRSAM1, MED25, MFN2, MPZ, MTMR2, NDRG1, NEFL, NGFB, PEX1, PEX2, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PEX10, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX26, PMP22, PRPS1, PRX, RAB7, SBF2, SEPT9, SH3TC2, SLC12A6, SPTLC1, SPTLC2, TFG, TRPV4, WNK1, YARS*.

10) Alte distrofii musculare – 28 de gene (14): *ANO5, CAPN3, CAV3, DAG1, DES, DMD, DNAJB6, DYSF, EMD, FHL1, FKRP, FKTN, LMNA, MYH7, PLEC1, POMGNT1, POMT1, POMT2, SGCA, SGCB, SGCD, SGCG, SYNE1, SYNE2, TCAP, TRIM32, TTID, TTN*.

Notă. În paranteze este indicat numărul genelor care se repetă.

Trebuie remarcat faptul că laboratoarele din Rusia „Genetiko”, „Genomed”, „Genotek” au reușit să reducă costul secvențierii genomului la cel mai accesibil preț din Europa, cu utilizarea celui mai bun echipament. În mod similar, panelul „Maladiile neuromusculare” dezvoltat în Laboratorul „Genomed” permite efectuarea cercetărilor utilizând metoda secvențierii NGS prin

intermediul sistemului Illumina NextSeq 500, cu o acoperire medie de cel puțin 70-100x. În cadrul acestui panel sunt incluse 391 de gene responsabile pentru dezvoltarea bolilor neuromusculare, precum și o parte din genele asociate cu maladii ce prezintă manifestări clinice similare, fapt ce face mai ușoară căutarea diferențiată și identificarea cauzei bolii.

Cu toate acestea, o parte din sindroamele din grupul BNME se datorează expansiunii repetițiilor trinucleotidice și nu sunt detectate prin secvențierea exomului.

Studiile genetice permit identificarea mutațiilor din genele cunoscute asociate cu BNME. Analiza genotipică exclude efectuarea studiilor de diagnostic suplimentare și facilitează prezicerea cu mai multă acuratețe a evoluției maladiei.

Majoritatea bolilor neuromusculare progresează, dereglând treptat activitatea funcțiilor cotidiene. În general, se aplică terapia simptomatică, reabilitarea fizică [33] și cea psihologică, suportul respirator [34] și chirurgia [35].

Studiile din ultimii ani sunt direcționate spre căutarea unui tratament diferențiat (de exemplu, terapia de substituție enzimatică pentru maladia Pompe) [36], precum și spre terapia genică și moleculară [37]: de exemplu, „exon skipping” în distrofia musculară Duchenne [38] și preparatul Nusinersen (înregistrat de compania farmaceutică sub denumirea de SPINRAZA™) pentru atrofia musculară spinală (SMA) tip I [39].

Datorită faptului obținerii rezultatelor la capitolul tratament al SMA, în ultimii 2 ani se propune pe larg tuturor țărilor de a implementa screeningul de rutină neonatal prin proba din pete de sânge uscat pentru a testa dacă lipsesc 2 copii ale genei SMN1. Dacă este pozitiv testul de screening, vor fi furnizate și alte teste de confirmare, inclusiv examinarea fizică și alte metode pentru cuantificarea copiilor genei SMN1 [298].

Asociația neguvernamentală EURORDIS (European Organisation for Rare Diseases) a prezentat dovezi ce atestă inegalitatea accesului la asistență medicală în SUA și Europa, în baza criteriului apartenenței naționale. Din aceste considerente, EURORDIS a atenționat despre necesitatea elaborării unei linii directe pentru diagnosticarea și tratamentul DMD/B [25]. În acest context, a fost lansat un proiect cu sprijinul Centrelor pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) și al Societății de Distrofie Musculară pentru Îngrijire, Cercetare și Educație (MD-CARE) și în colaborare cu organizațiile comunitare și reprezentanții rețelei TREAT-NMD, rezultatele cărora pot fi rezumate prin semnarea Acordului internațional privind tratamentul și acordarea asistenței medicale pacienților cu DMD/B și dezvoltarea unui „Ghid pentru familie”. Acest ghid reprezintă rezultatul muncii a peste 80 de experți și descrie îngrijirea completă coordonată, pe care trebuie să o primească pacienții cu DMD/B în cursul progresării maladiei. Diseminarea și aplicarea acestor recomandări

reprezintă o nouă sarcină, iar un exemplu ce atestă efortul depus îl constituie colaborarea dintre grupurile ce protejează interesele pacienților și rețeaua de excelență în cercetări translaționale din Uniunea Europeană în vederea evaluării și tratamentului bolilor neuromusculare (TREAT-NMD). Proiectul a primit o finanțare suplimentară din partea Uniunii Europene, îndreptată spre implementarea principiilor de bază privind îngrijirea pacienților în cadrul Europei de Est (CARE-NMD) [25].

Primul oficiu de consiliere genético-medicală din Republica Moldova a fost inaugurat la data de 1 martie 1971 și a fost deschis în baza Dispensarului Neurologic Republican.

În țara noastră, cercetările patologiilor neuromusculare ereditare au fost începute de academicianul Diomid Gherman, considerat fondatorul neurologiei naționale. Discipolii săi – prof. S. Groppa, prof. M. Gavriiliuc și prof. V. Lisnic – au dezvoltat diagnosticul clinic și diferențial. Prof. M. Gavriiliuc, pentru prima dată în Republica Moldova, a efectuat studii electromiografice (EMG). Datorită acestor cercetări, este posibilă realizarea primei etape a diagnosticului diferențial și determinarea nivelului de afectare (muscular, neural sau spinal).

Prof. V. Lisnic a dezvoltat cercetările electrofiziologice la nivel național. În anul 2011, la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Chișinău, a fost susținută teza cu tema „Neuropatia periferică în scleroza multiplă: studiu clinic-electrofiziologic”, autor – Olesea Odainic, conducător științific – V. Lisnic. În anul 2013 a fost susținută teza cu tema „Caracteristicile clinice și electrofiziologice ale axonopatiilor periferice”, autor – O. Misic, conducător științific – V. Lisnic. În Republica Moldova, acești cercetători au efectuat studii privind incidența sclerozei multiple [40].

Una dintre primele recomandări metodice pentru diagnosticul diferențial al distrofiilor musculare progresive a fost publicată la Editura „Știința” în anul 1984. La elaborarea acestui document au participat iluștrii savanți sovietici în acest domeniu, cum ar fi L.O. Badalian, E.P. Grinio, G.N. Avakean, P.A. Temin și compatriotul nostru S.A. Groppa.

În 1992 a fost publicată recomandarea metodică privind diagnosticarea ADN în maladiile ereditare, autorii căreia au fost O.V. Evgrafov (Moscova, Federația Rusă) și S.A. Groppa (Chișinău, Republica Moldova), și din acel moment a debutat perioada molecular-genetică de investigare a patologiilor ereditare.

Crearea laboratorului de diagnostic molecular-genetic ADN în Republica Moldova a coincis în timp cu inițierea cercetărilor de amploare la nivel mondial – Proiectul „Genomul Uman” (1990), cu scopul decodificării informației genetice. În 1991, în cadrul secției de patologii ereditare a IMSP Institutul de Cercetări Științifice în Domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului, sub conducerea doctorului în științe medicale Dumitru Amoășii, a fost

creată prima echipă ce-și propunea inițierea studiilor molecular-genetice, în componența a doi cercetători științifici stagiaari. Astfel, Programul internațional „Genomul Uman” a servit drept punct de plecare pentru dezvoltarea activității științifico-practice a echipei molecular-genetice în direcția elaborării și implementării metodelor noi de diagnostic al patologiilor ereditare.

În contextul dat, este important să menționăm aportul important al membrilor Laboratorului de Diagnostic Prenatal (sub conducerea șefului de laborator, Vladislav Baranov, profesor, membru corespondent al Academiei de Științe Medicale din Rusia) al Institutului de Cercetări Științifice în Obstetrică și Ginecologie „D.O. Otto” (Sankt Petersburg, Federația Rusă), care au fost primii dascăli și inspiratori ai specialiștilor din R. Moldova. Aceste personalități au participat la realizarea cercetărilor de identificare a mutațiilor și la studierea particularităților populaționale ale polimorfismului genelor, dereglări ce sunt cel mai frecvent implicate în patologii monogenice. Această direcție de cercetare, cu suportul membrilor echipei lui Baranov (T. Ivascenko, O. Artemieva, M. Asseev), a fost transmisă și echipei geneticienilor din Moldova. Primele testări molecular-genetice, efectuate în 1992, au avut drept scop identificarea mutațiilor și a particularităților populaționale a două patologii monogenice frecvente – miodistrofia Duchenne și hemofiliile A și B [41].

Totodată, un aport major la antrenarea tinerilor specialiști în realizarea investigațiilor cu utilizarea metodelor molecular-genetice l-a avut profesorul Nicolae Barbacari, considerat promotorul geneticii moleculare în Republica Moldova, care a implementat reacția polimerizării în lanț (Polymerase Chain Reaction – PCR) la începutul anilor 1990, în cadrul laboratorului condus de dumnealui și laboratorului condus de dr. L. Tumanova din cadrul Institutului de Genetică al Academiei de Științe a Moldovei.

O direcție importantă inițiată de echipă din Moldova în anii următori (1995-1996) a fost studierea genei SMN1, ale cărei mutații duc la una dintre cele mai frecvente patologii neuromusculare – atrofia musculară spinală (boala Verding-Hoffman). Primul diagnostic al acestei boli a fost realizat cu suportul Laboratorului de Genetică Moleculară (Moscova, Federația Rusă), condus de A. Poleakov (astăzi Centrul de Genetică Moleculară, ARȘM).

În 1997, sub conducerea profesorului S. Groppa a fost elaborat și apoi aprobat primul Program național ”Perfecționarea serviciului medico-genetic în Republica Moldova. Anii 1998-2005”, în care au fost prezentate strategiile de bază de regionalizare și optimizare a structurii serviciului medical-genetic, inclusiv cu scopul de aprofundare a cercetărilor.

Dezvoltarea geneticii moleculare în republică a fost posibilă și datorită suportului din partea membrilor administrației Institutului de Ocrotire a Sănătății Mamei și a Copilului, al vicedirectorului pentru activitatea științifică, profesor Petru Stratulat (1993-2015); directorului

Centrului științific al patologiilor ereditare, profesor Dumitru Amoșii (1993-1996), și directorului Centrului medico-genetic, profesor Stanislav Groppa (1996-2003).

Ca rezultat, în 2009 a fost posibil de a organiza Laboratorul Științific de Genetică Moleculară Umană (șef laborator – V. Sacară, cercetător principal – S. Groppa), ca unitate independentă în cadrul Centrului Național de Sănătate Reproductivă și Genetică Medicală (director – profesor V. Moșin, 2003-2012).

Datorită activității prodigioase a grupului de specialiști geneticieni-moleculari, a fost inițiat diagnosticul prenatal pentru astfel de maladii precum distrofia Duchenne și atrofia musculară spinală, boala Charcot-Marie, hemofiliile A și B, fenilcetonuria, fibroza chistică, maladia Wilson. Astfel, pe parcursul celor 25 de ani de activitate, au fost efectuate peste 130 de diagnostice prenatale pentru cele șase maladii monogenice grave. În 30% de cazuri, diagnosticul a fost confirmat, pe când în alte familii cu risc înalt femeile au născut copii sănătoși [41].

Începând cu anul 2001, laboratorul a servit drept bază științifică pentru pregătirea studenților-medici ai Universității de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și a studenților-biologi ai Universității de Stat din Moldova. Ulterior, din 2009 a fost inițiată colaborarea cu Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir” (USDC) pentru pregătirea studenților la specialitățile „Biologie” și „Biologie moleculară” și antrenarea lor în lucrul de laborator, fiind elaborat și implementat cursul „Genetică umană” în cadrul programelor de masterat.

Pentru asigurarea cu cadre tinere și transferul cunoștințelor, Institutul Mamei și Copilului colaborează cu Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”. Astăzi, USDC este una din cele mai bune instituții educaționale din republică ce pregătește specialiști în domeniul biologiei moleculare la nivel de licență și de masterat. Modalitatea principală de colaborare constă în antrenarea studenților universității în activități de cercetare, prin aplicarea cunoștințelor lor în lucrul de laborator, studierea polimorfismelor genetice ale diverselor patologii, formarea deprinderilor de diagnostic medical etc.

Universitatea dezvoltă mai multe domenii de cercetare, care pot aduce progrese în diagnosticul medical. Astfel, a fost elaborat și implementat cursul „Bioinformatică” pentru masteranzi, iar cercetările cu aplicarea tehnicilor bioinformaticice cu aplicații medicale pentru diagnosticul diferitor cardiopatii au fost inițiate în cadrul Laboratorului de Bioinformatică, în Centrul universitar Genetică Funcțională al USDC (rector – dr. hab., prof. univ. Hanganu Aurelia) [42]. Deprinderile practice formate la studenți sunt aplicate pentru designul primerilor și asigurarea condițiilor tehnice de realizare a tehnicii PCR la determinarea polimorfismelor genice, pentru studiul comparativ al secvențelor nucleotidice și proteice, pentru planificarea experiențelor ce țin de stabilirea diagnosticului patologiilor cercetate. Realizarea unor astfel de

studii asupra structurii genelor prin utilizarea instrumentelor bioinformatice ne-a permis să elaborăm strategiile de identificare și validare a polimorfismelor mononucleotidice. Cunoștințele în domeniul bioinformaticii au devenit indispensabile în utilizarea echipamentului de performanță cu care este dotat laboratorul actualmente. Totodată, folosirea bazelor de date bioinformatice asigură cercetătorii laboratorului cu surse de literatură necesare fundamentării scopurilor și obiectivelor direcțiilor prioritare de cercetare trasate. Deși domeniul bioinformaticii are o aplicație practică foarte largă în științele biomedicale, dezvoltarea lui mai necesită măsuri de sincronizare. Actualmente, cursul „Bioinformatica” este introdus la Universitatea de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” pentru studenții-medici din anul cinci și doctoranzi. Medicinistii își vor dezvolta capacitățile de identificare și fundamentare a ipotezelor științifice în cercetarea medicală [41].

Colaborarea strânsă dintre cercetători, reprezentanții biobăncilor, asociațiile pacienților, industria biotehnologică și cea farmaceutică este esențială pentru abordarea atât a bolilor neuromusculare, cât și a celor comune. În anul 2015 a fost creat Centrul Genetic de Excelență din Republica Moldova (CGEM), care are drept obiectiv principal stabilirea, operarea, precum și dezvoltarea unei infrastructuri de cercetare distribuite paneuropean de biobănci și resurse biomoleculare în diferite domenii genetice, inclusiv în neurogenetică. Acest fapt va ușura accesul la resursele biologice și biomedicale și va susține cercetarea biomoleculară și medicală de înaltă calitate. Un obiectiv deosebit de important pentru Republica Moldova a fost aderarea la BBMRI-ERIC și TREAT-NMD. Networkul TREAT-NMD este rețeaua care studiază bolile neuromusculare. De la lansarea sa în ianuarie 2007, accentul rețelei a fost pus pe dezvoltarea unor instrumente de care industria, medicii și cercetătorii au nevoie pentru elaborarea noilor metode terapeutice și pentru stabilirea celor mai bune practici de îngrijire a pacienților cu boli neuromusculare. Republica Moldova a devenit membru al alianței TREAT-NMD în 2013. Participarea la rețelele TREAT-NMD și altele similare asigură creșterea abilităților noastre profesionale și este o modalitate de a lua parte la proiecte de cooperare internațională.

Necesitatea dezvoltării domeniului neurogeneticii este dictată de discrepanțele dintre echiparea tehnico-materială actuală și competențele profesionale ale cercetătorilor-geneticieni din R. Moldova, discrepanțe care împiedică participarea lor în proiecte internaționale moderne, având echipament neperformant, învechit. În ciuda dificultăților economice din țară, prin sprijinul nemijlocit al Academiei de Științe și al Ministerului Sănătății, cercetătorii Laboratorului de Genetică Moleculară Umană realizează și implementează noi paneele de diagnostic, însă cu utilizarea tehnologiilor învechite. Laboratorul dispune în prezent de echipamentul de bază necesar pentru diagnosticul unor boli și pentru cercetări molecular-genetice. Datorită suportului

Ministerului Sănătății, în urma acordării grantului japonez de suport tehnic JICA, laboratorul a primit în dotație un secvențiator de 8 canale Genetic Analyzer 3500Dx și un amplificator în timp real RealTime PCR 7500 (Applied Biosystems, SUA), ceea ce a permis de a extinde considerabil seria de metode și tehnici aplicative. Astfel, acum noi putem utiliza:

- 1) tehnica de PCR cantitativ pentru identificarea mutațiilor și dezvoltarea metodelor de diagnostic prenatal noninvaziv;
- 2) metoda analizei de fragmente (MLPA, QF-PCR);
- 3) metoda identificării mutațiilor în genele de interes, asociate cu diverse patologii;
- 4) metoda secvențierii Sanger.

Metodele menționate vor permite lărgirea spectrului de diagnostic al ADN pentru un număr mai mare de patologii genetice neuromusculare. Astfel, succesele studiilor molecular-genetice ale laboratorului în cercetarea fundamentală vor include datele noi obținute referitoare la specificul calitativ și cantitativ al mutațiilor și polimorfismului genelor, la defectele responsabile de patologii ereditare frecvente, la predispoziția genetică pentru diverse manifestări clinice etc. Noile rezultate vor fi utilizate în elaborarea programelor de screening, în urma cărora va deveni posibil de a identifica purtătorii formelor nefavorabile ale genelor, respectiv de a estima riscurile asociate cu apariția patologiilor în cadrul populației țării.

Dezvoltarea ulterioară a laboratorului se va conforma politicilor europene de cercetare, dezvoltare și inovare, promovate prin programul „Horizont 2020”, efortul fiind depus pentru conectarea la centre de excelență internaționale, transferul de tehnici și metode de diagnostic. Totodată, laboratorul va promova consolidarea capacităților de infrastructură și de potențial uman în Republica Moldova, pentru dezvoltarea serviciilor noi de diagnostic molecular-genetic. Cercetarea în domeniul geneticii umane în secolul trecut s-a bazat pe o cooperare internațională și crearea Consorțiului ce îi permite R. Moldova să se integreze în infrastructura de cercetare paneuropeană distribuită biobăncilor sau resurselor biomoleculare, pentru a facilita accesul la resursele biologice și biomedicale, a stimula cercetarea biomedicală de înaltă calitate și a contribui la îmbunătățirea sănătății cetățenilor Moldovei.

1.2. Caracteristicile genetice ale bolilor ereditare neuromusculare abordate în studiu

A. Distrofiile musculare progresive, forma Duchenne

Deja primele lucrări apărute la sfârșitul sec. al XVIII-lea au permis, în baza investigațiilor histologice ale mușchilor, de a diferenția două tipuri de miopatii: tipul primar, muscular de afecțiune, și tipul secundar, neurogen, condiționat de distrofia motoneuronilor segmentari ai

creierului spinal și fibrelor nervoase periferice. Formele de bază ale distrofiilor musculare progresive (DMP) au fost sistematizate încă în anul 1892 de către V. Erb.

Divizarea principială a maladiilor neuromusculare în primare sau *musculare* și secundare sau *neurogene* s-a păstrat până în prezent. Conform clasificărilor moderne, elaborate în clinicile neurologice coordonatoare, DMP, după criteriile clinico-anatomice, se împart în două grupe de bază: *primare* și *secundare*. Între ele există totuși un șir de forme de tranziție. În legătură cu aceasta, L. Badalean (1973) divizează DMP în trei grupe: *primare*, *secundare* și *mixte*. Studiarea DMD continuă de mai bine de un secol, însă ultimii 25 de ani cuprind profunde investigații în acest domeniu, ani ce îmbină în sine un complex de cercetări de cele mai diverse niveluri (celular, molecular, submolecular etc.) [43], efectuate la bolnavii cu miopatie și la rudele fenotipic sănătoase ale acestora [44], precum și pe animale cu DMD [45].

Prima observație privind miopatia pseudohipertrofică îi aparține lui E. Meryon (1852), care a publicat în articolul „Cu privire la degenerarea lipidică și granulară a mușchilor” cazul maladiei a patru frați cu creșterea exagerată a mușchilor gastrocnemieni și contracții în articulațiile mari. G.B.A. Duchenne, în 1861, a descris un bolnav cu paralizie musculară pseudohipertrofică, atrăgând atenția la o combinație neobișnuită de simptome: mărirea mușchilor gastrocnemieni și miastenia progresivă. În 1872, G.B.A. Duchenne a efectuat, pentru prima dată, biopsia mușchiului scheletic la un bolnav cu paralizie musculară pseudohipertrofică. În 1879, W. Gowers, unul dintre fondatorii neurologiei germane, în tratatul științific „Paralizia musculară pseudohipertrofică”, a generalizat materialele propriilor observații asupra a 21 de bolnavi cu DMD și 139 de cazuri similare, descrise în literatura de specialitate.

Unul dintre cele mai caracteristice simptome ale DMD/B este hipertrofia diferitor grupuri de mușchi: gastrocnemieni, deltoizi, fesieri. În special, sunt tipice pseudohipertrofiile mușchilor gastrocnemieni („pulpa gnomului”). Pseudohipertrofiile mușchilor gastrocnemieni se dezvoltă devreme, de la 3–5 ani, și pe măsura înaintării în vârstă au tendință de micșorare. Pseudohipertrofiile produc o impresie falsă de sănătate fizică [46].

Inițial, atrofiile musculare se localizează în mușchii centurii pelviene, în sectoarele proximale ale membrilor posterioare, iar ulterior se observă expansiunea lor în direcție ascendentă spre centura scapulară, mușchii spinali, zonele proximale ale membrilor superioare. Ridicarea din poziția orizontală sau de pe scaun provoacă mari dificultăți. Ridicându-se, bolnavii folosesc metode ajutătoare („cățărarea pe sine însuși”, „cățărarea în scară”). W. Gowers (1879) a descris o metodă deosebită, utilizată de bolnavii cu DMD/B în timpul ridicării, denumită ulterior „semnul/manevra Gowers” (ridicarea în ortostatism prin cățărarea pe propriul corp cu sprijin pe genunchi).

Miodistrofia Duchenne este o maladie ereditară recesivă, X-înlănțuită, cu incidența de 1 la 3500 băieți nou-născuți, indiferent de apartenența etnică și rasială [31].

În stadiile incipiente ale maladii, la bolnavii cu forma de îmbolnăvire DMD, cele mai tipice dereglări osteoarticulare sunt: scolioza, lordoza lombară, aplatizarea și deformările cutiei toracice („torace în carenă”, „torace plat”). Pe măsură ce procesul miodistrofic progresează, se dezvoltă deformarea ecvinică a tălpilor și contractura în articulațiile mari.

Investigațiile din ultimii ani denotă că una dintre problemele serioase ce apar la bolnavii cu DMD este afectarea inimii (cardiomiopatie dilatată) [47].

Prin cercetările efectuate de Adzija D. și colab. în 1994, s-a stabilit că în procesul patologic al DMD, sistemul cardiovascular frecvent este implicat de timpuriu. Circa 73% din bolnavi manifestă diverse patologii cardiace. Cauza patologiei vasculare constă în insuficiența genetic determinată a distrofinei în cardiomiocite [48].

Pentru diagnosticare și consultația medico-genetică, o mare importanță are depistarea cât mai devreme a maladii. Metoda optimă pentru investigațiile de screening este determinarea creatininfosfochinazei în serul sangvin [49]. În majoritatea publicațiilor se indică faptul că deja în primele 2-5 zile de viață ale bolnavilor, activitatea acesteia în sânge este ridicată de 50-100 de ori față de valorile normale și poate fi efectuat screeningul nou-născuților la DMD [50].

Pe măsura progresării procesului miodistrofic, există tendința de micșorare a activității creatininfosfochinazei. După datele lui Arai Y. ș.a. (1995), tomografia computerizată a mușchilor scheletici indică zonele cu densitate scăzută în mușchii scheletici, semnele de atrofie musculară, micșorarea densității și a volumului țesutului muscular pe măsura progresării procesului miodistrofic. În prezent se utilizează imagistica prin rezonanță magnetică pentru diagnosticul și monitoringul procesului miopatic [51].

În anul 1955, Becker P. E. a descris o maladie foarte asemănătoare fenotipic cu DMD, care a fost denumită „distrofia musculară Becker”, dar care se deosebea de aceasta printr-o demarare mai tardivă și o evoluție benignă. Incidența ei constituie 3,2-5 la 100.000 indivizi [52].

Grație eforturilor multor laboratoare de cercetări științifice din întreaga lume, a fost identificată și clonată gena distrofina pe brațul scurt al cromozomului X, locusul Xp21 [52]. A fost stabilit alelismul genelor DMDuchenne și DMBecker. Se subliniază de asemenea că ambele maladii sunt condiționate de mutațiile genei distrofina [53].

Comparativ cu DMDuchenne, distrofia musculară Becker prezintă diverse manifestări clinice. Conform datelor lui Polmucci L. ș.a. (1992), la unii bolnavi predomină tabloul cardiomiopatiei, cu lipsa sau implicarea redusă a mușchilor scheletici în procesul patologic.

Potrivit datelor lui *Quinlian R.M.* și *Dubowitz V.* (1992), în caz de DMBecker, inima este implicată în procesul patologic în circa 75% cazuri.

La un șir de bolnavi are loc progresarea lentă a simptomelor de miopatie și aceștia își mențin capacitatea de a se deplasa singuri până la 12-15 ani, în pofida depistării delețiilor ample ale genei distrofinei [54].

Depistarea distrofinei nu numai în țesutul muscular, dar și în encefal, a permis de a presupune o interconexiune a DMBecker și DMDuchenne cu maladiile intelectuale și psihice. În lucrările științifice ale multor savanți se menționează că reținerea dezvoltării mintale nu se referă la maladiile asociate cu cromozomul Xp21 [55]. Reținerea dezvoltării mintale la pacienții cu DMDuchenne și/sau Becker poate fi asociată cu o genă separată, localizată în apropierea genei DMD.

Delețiile eterogene în zona Xp21 au fost depistate în ADN-ul bolnavilor cu DMD și DMB, markerul ADN din zona dilatată fiind în legătură strânsă cu segregarea mutantă din familii. Exonii în gene au fost depistați prin explorarea fragmentului puternic conservativ din ADN-ul clonat, iar transcriptul mare a fost identificat în mușchiul scheletic al fătului uman. Seriile de clone ADNc care înconjoară 14 kb de transcript au fost separate din mușchii scheletici ai fătului uman și a fost stabilită consecutivitatea nucleotidică [56].

Gena distrofinei codifică proteina-distrofina compusă din 3,685 aminoacizi și este foarte probabil că ea se referă la clasa proteinelor-bastonaș elastice, în care intră spectrina și α -actina. Acestea sunt două proteine citoscheletice, ipotetic organizate ca dimeri antiparaleli, care pot lega actina și pot fi antrenate în amplasarea submembranară a proteinelor cu care sunt asigurate citoscheletele multor tipuri de celule [57].

Gena distrofinei este cea mai mare genă descrisă la ființa umană, ea conține mai mult de 2,2 MB (milioane perechi de baze) [58] ale secvenței genomice, care corespunde la aproximativ 0-1% din întregul genom uman sau 1-5% din întregul cromozom X. Gena distrofinei constă din introni în proporție de 99%, iar secvența codantă este constituită din 86 exoni (inclusiv șapte promotori legați la primul exon). ARN mesager cu lungimea totală de 14.000 bp, transcris de pe gena distrofinei, se exprimă predominant în mușchii scheletici și în cel cardiac și, în cantități mici, în creier.

Cercetările efectuate în ultimii ani au confirmat faptul că distrofina acționează în calitate de supresor tumoral și, probabil, ca factor antimetastatic, sugerând că terapiile în dezvoltare pentru distrofia musculară pot avea relevanță și în tratamentul cancerului [59].

Au fost identificate trei izoforme ce conțin același număr de exoni, dar provin de la trei promotori independenți în creier, mușchi și neuronii cerebelari Purkinje (Figura 1.1). Acești trei

promotori au un prim exon unic, legat la setul comun de 78 exoni, și denumirea fiecăruia reflectă locul de exprimare maximă. De exemplu: promotorul cerebral asigură expresia primară în neuronii corticali și hipocampusul creierului, în timp ce promotorul Purkinje se exprimă în celulele cerebelare Purkinje [60] și, într-o concentrație foarte mică, în mușchii scheletici, cardiomiocite [61], precum și, în concentrații mici, în unele celule gliale ale creierului. A fost descrisă de asemenea o izoformă acțională limfocitară de lungime întreagă. Însă descoperirile curente au înaintat ideea că această formă poate fi un artefact, atribuindu-i un rol funcțional neclar.

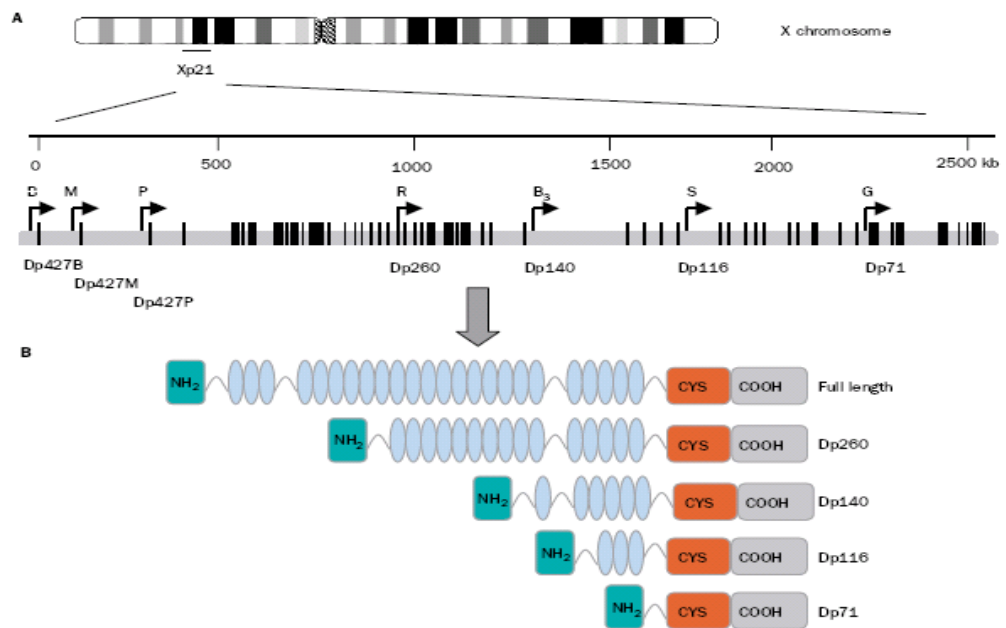


Fig. 1.1. A, B – structura genei distrofinei, localizată pe cromozomul Xp21 [62]

Liniile negre verticale din Figura 1.1.A reprezintă cei 79 de exoni ai genei distrofinei, distribuiți în aproximativ 2-5 milioane de baze. Săgețile indică diferiți promotori, în particular cei cerebrali – B (brain), musculari – M (flex) și Purkinje – P; R sau promotorul Dp 260 (retina), B3 sau Dp140 (creier), S sau Dp116 (celulele Schwann) și G sau Dp71 (general) [62].

În Figura 1.1.B este indicată structura domeniului diverselor proteine distrofine. Domeniul amino-terminal este urmat de domeniul de tip spectrinic, de cel bogat în cisteină și de domeniul carboxi-terminal.

Distrofina constă din patru domenii:

- Zona N-terminală (circa 240 de aminoacizi), potrivit datelor lui Hammond (1987), asemănătoare sectorului actin-liant al α -actinei. Aceasta este o proteină citoscheletică tipică și

este legată cu alte proteine ale complexului membranal. Ea are importanță pentru stabilitatea distrofinei; deleția ei duce la forma gravă a miodistrofiei Becker.

- Partea a doua este numită „axială”, deoarece ei îi revine masa principală. Această regiune mare conține 25 de segmente spiralate terțiare, consecutive, care conțin câte 88-126 aminoacizi fiecare. Potrivit datelor lui Davison, Critchley (1988), repetările sunt analoge repetărilor spectrinei și α -actinei, în special în segmentul triptofanic. Segmentul spiralat terțiar conține: α -spirală/rotație/ α -spirală/rotație/ α -spirală, structură torsionată spre sine, formând spirala terțiară până la atașarea următorului segment repetat, de lungimea α -spiralei. Davison ș.a. (1989) au presupus o structură din patru spirale de lungimea domeniului în formă de bețișor al distrofinei, spectrinei și α -actinei. Ea se baza pe structura secundară a repetării presupuse, precum și pe amplasarea restului, când au loc rotirile în segmentul α -spiralat. Această a doua parte este importantă ca o verigă de legătură între părțile 1 și 3. Delețiile părții ei centrale sunt lipsite de simptome, iar cele ale sectorului distal provoacă forma clasică a miodistrofiei Becker [63]

- A treia regiune a distrofinei (circa 150 de aminoacizi) este o regiune bogată în cisteină, asemănătoare regiunii carboxilice a α -actinei. Delețiile ei provoacă forma Duchenne a miodistrofiei [64].

- Ultima regiune a distrofinei, denumită „C-terminală”, este unică [64]. Ea conține circa 420 de aminoacizi și nu e similară nici uneia dintre consecutivitățile proteinice, însă, conform datelor lui Lemaire C. ș.a. (1988), ea este puternic conservativă „între” om și găină. Această asemănare este neobișnuită, deoarece la nivel nucleotidic ea se extinde în regiunea 3'-intranslabilă presupusă. Partea proximă a acestui domeniu este foarte importantă pentru funcționarea distrofinei, iar delețiile în ea provoacă forma Duchenne, pe când la modificarea părții terminale apare forma neprogresivă a miodistrofiei Becker.

Așadar, modificarea diferitor părți ale distrofinei este în conexiune cu evoluția diversă a miodistrofiei.

În conformitate cu concepțiile moderne, gena *DMD* uriașă se găsește sub controlul unui sistem complex de reglare a transcripției și a matisării (splicingului). Cinci promotori independenți realizează transcripția alternativă specifică a primilor exoni în diverse stadii ale dezvoltării embrionare. Trei promotori expresează molecula integră a distrofinei, în timp ce alți doi promotori realizează expresia ultimelor domenii prin metoda excluderii reciproce [65].

Transcripția și splicingul co-transcripțional al proteinei distrofina umană (2,2 Mb) durează 16 ore în condiții experimentale. Distrofina conține introni lungi (24 cu lungimea de peste 10 kb

și 5 – mai mult de 100 kb), iar grație eterogenității dimensiunii acestora se formează un transcript ideal pentru studierea diferitelor aspecte ale procesului de matisare [65].

Secvențele a șase exoni ce codifică capătul C-terminal al proteinei sunt supuse unui splicing alternativ, creând câteva forme structurale diferite de distrofina, ce realizează diverse funcții. Așadar, a fost identificat ARNm de 6,5 mii pb transcris de pe gena DMD, care este, probabil, produsul de bază al acesteia în țesuturile nemusculare, inclusiv în creier.

Proteina respectivă se deosebește considerabil de distrofina și nivelul ei în unele țesuturi nemusculare este comparabil cu cel al distrofinei în mușchi. Este de asemenea descris transcriptul de 4,8 mii pb al aceluiași locus, ce se expresează în multe tipuri de țesuturi, în special în celulele Schwann care înfășoară neuronii, unde distrofina lipsește [66].

Această proteină a primit denumirea de „apodistrofina-1”. A fost clonat și secvenționat încă un transcript de 2,2 mii pb ale genei *DMD*, care codifică apodistrofina-3, ce se expresează în embriogeneza tardivă. Deci, în cercetările din ultimii ani s-a depistat existența câtorva forme izomere ale distrofinei, care au fost denumite „apodistrofine” [67].

Cele mai frecvente schimbări în gena distrofinei sunt delețiile, care apar în 65% din mutațiile distrofince. Delețiile și, mai rar, duplicațiile pot avea loc în orice regiune a genei, dar se cunosc două regiuni cu deleții frecvente: una localizată în partea centrală a genei, iar cealaltă – la capătul 5'. Prima regiune este supusă cel mai frecvent mutațiilor și include exonii 45-55 – punctul rupturii genomice, localizându-se în intronul 44, în timp ce zona capătului 5' include exonii 2-19, cu punctul de ruptură aflat în intronii 2-7. Clusterelor acestor două zone fierbinți servesc ca bază pentru utilizarea tehnicii PCR, cu ajutorul căreia, în urma sceningului a numai 19 exoni, au fost identificate mai mult de 98% din deleții [55][68].

Tehnica PCR este foarte eficientă pentru diagnosticul molecular al delețiilor, totuși ea nu poate fi utilizată pentru identificarea duplicațiilor sau identificarea femeilor purtătoare. În aceste cazuri se pot folosi alte tehnici de diagnostic, precum PCR cantitativ sau hibridizarea multiplă amplificabilă a probei.

Delețiile se identifică la circa 60–65% din pacienții cu DMD și BMD, iar frecvența duplicațiilor poate varia de la 5% la 15%, posibil ca rezultat al sensibilității diferite a tehnicilor utilizate. Restul cazurilor se consideră a fi cauzate de combinarea mutațiilor mici (cel mai frecvent, mutațiile punctiforme rezultă în nonsens sau mutații frame-shift), deleții intronice pure sau inserții exonice ale secvențelor repetitive [69].

Nu există o relație simplă între mărimea deleției și manifestarea clinică a bolii. De exemplu, deleția unui exon mic, cum este 44 tipic, rezultă în DMD, în timp ce deleții mari care implică aproape 50% din genă au fost descrise la pacienții cu BMD. Domeniile centrale și cele

distale par a fi mai puțin importante funcțional, unele deleții în aceste regiuni au fost asociate cu mialgii și crampe musculare, însă fără slăbiciune. Unii pacienți prezintă chiar o creștere izolată a concentrației creatinkinazei în plasmă. Acest fenomen a fost demonstrat la bolnavii cu deleții în exonii 32-44, 48-51 sau 48-53, majoritatea dintre care aveau o concentrație a distrofinei normală sau aproape normală [55].

Așadar, efectele asupra fenotipului depind nu atât de mărimea deleției (același lucru se referă și la duplicații), cât de faptul dacă aceasta întrerupe blocul citit (Figura 1.2).

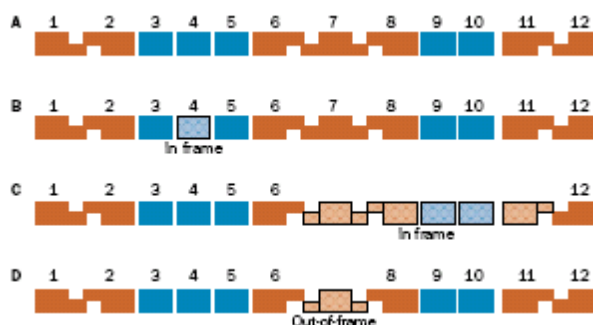


Fig. 1.2. Efectele diferitor deleții în „reading frame” (cadrele de citire) ale genei distrofinei (A) [62]

Altă observație este că diferite deleții (ca mărime și localizare) pot fi asociate cu un fenotip sever foarte similar. Cauza acestui efect poate fi scăderea ARN nonsens-mediată. Acest fenomen poate avea importanță atât în insuficiența restabilirii funcției distrofinei, cât și pentru variabilitatea fenotipică prin variația eficienței controlului scăderii ARN [3].

Mutațiile care mențin citirea scheletului nucleotidic (transcripția) in-frame în general rezultă în distrofina anormală, însă parțial funcțională, și sunt asociate cu BMD (Figura 1.3). La pacienții cu DMD, delețiile și duplicațiile dereglează transcripția (frame-shift), rezultând în ARN nestabil, care eventual duce la formarea proteinelor trunchiate în cantități aproape indetectabile. Aceasta ipoteză „Reading frame” cuprinde peste 90% de cazuri și este de obicei folosită atât pentru confirmarea diagnosticului de distrofinopatie, cât și pentru diagnosticul diferențial între DMD și BMD [70].

Excepții ale ipotezei reading-frame există și ele includ pacienții cu BMD, purtători de frame-shift deleții sau duplicații, și pacienți cu DMD, cu *in-frame* deleții sau duplicații.

Aproximativ 65% din cazurile DMD sunt cauzate de delețiile de tip *out-of-frame*, care pot produce distrofine trunchiate și nonfuncționale. Totodată, delețiile de tip *in-frame* permit expresia unor proteine distrofice interne cu deleții, dar parțial funcționale. De aceea, fenotipul DMD poate fi, teoretic, schimbat în fenotipul DMB prin restaurarea cadrelor de citire (reading-

frame). Cadrul de citire poate fi recuperat prin blocarea unui exon vecin în delețiile out-of-frame pe perioada de pre-ARNm desplicare [71].

„Exon skippingul” reprezintă o abordare mai recentă a distrofiilor musculare de reparare a genei endogene, o strategie care induce excluderea exonului ce conține mutația alelică. Scopul acestei strategii este de a exclude exonii mutați din ARNm matur care codifică distrofina (de exemplu, acești exoni transportă o mutație nonsens ce cauzează oprirea prematură a traducerii), prin prevenirea includerii lor în timpul matisării ARNm [72]. Această metodă ar trebui să conducă, prin urmare, la formarea unei distrofine mai mici, care este încă funcțională. Exon skippingul folosește oligonucleotidele antisens (AON), care sunt special concepute pentru a bloca situsurile recunoscute în timpul splicingului, pentru a procesa precursorul ARNm în ARNm matur. Exon skippingul este astăzi, probabil, cea mai promițătoare abordare pentru a atenua substanțial simptomele în DMD, având în vedere dovezile științifice solide și faptul că principala cauză a DMD este gena distrofina mutantă [73].

Există trei abordări distincte care folosesc exon skippingul. Deși principiul antisens mediat al acestei strategii este același, cele trei metode diferă în mare măsură prin chimia oligonucleotidelor și prin maniera prin care secvențele antisens sunt aplicate în țesut. Prima metodă utilizează virusuri adenoasociate (AAV) pentru a genera o anumită U7 ARNsn, care este implicat în prelucrarea capătului 3' al ARNm precursor al histonelor. Studii pe șoareci *mdx* au furnizat dovezi convingătoare despre potențialul acestei metode pentru tratamentul DMD (în detalii se va expune mai jos). Această metodă este în curs de dezvoltare pe baza modelului *Golden Retriever* pentru DMD (GRMD) [74]. Deși metoda este atrăgătoare, utilizarea de AAV are totuși limitele și provocările sale. De exemplu, virusul trebuie să fie aplicat sistemic și trebuie să transducă toți mușchii scheletici, ca să fie eficient.

Altă metodă exon skipping presupune aplicarea directă a oligonucleotidelor antisens în țesut [75]. Tehnica de tratament cu AON a fost dezvoltată cu mai mult de două decenii în urmă. După multe eșecuri inițiale în studiile clinice, metoda a ajuns acum la o etapă în care poate fi aplicată într-un cadru clinic. Pentru tratamentul DMD, utilizarea AON este mult mai avansată. Estimările actuale prevăd că aproximativ 15% dintre pacienții cu DMD ar beneficia de excluderea exonului 51 al distrofinei, iar aceasta reprezintă cea mai mare fracțiune. Excluderea exonului 51 ar putea fi realizată printr-o serie de AON, deși nu este foarte clar dacă eficacitatea sa ar fi într-adevăr aceeași, indiferent de mutație [76]. Pentru acei pacienți cu DMD care nu pot beneficia de skippingul exonului 51, trebuie să fie proiectate noi AON. Două dintre cele mai comune mutații care pot fi tratate printr-un singur AON au fost găsite la aproximativ 8% dintre pacienții cu DMD. În total, aproximativ jumătate dintre pacienții cu miodistrofie Duchenne ar

putea beneficia de exon skipping, dar este important de menționat că numărul de bolnavi care pot beneficia de un anumit AON poate fi foarte mic. Faptul că nu toți pacienții cu DMD pot fi tratați prin această abordare indică necesitatea de a continua căutarea unor metode de alternativă.

Cele mai mari provocări cu care se confruntă tratamentul cu oligonucleotide antisens este necesitatea de a ajunge la toți mușchii și cerința ca AON să pătrundă în nucleii mușchilor în cantitate suficientă, pentru a permite reexpresia distrofinei. Estimările actuale arată că 30% din nivelul distrofinei găsite în controale sunt suficiente pentru a evita o distrofie musculară.

O abordare originală de terapie genică pentru DMD a fost dezvoltată la Universitatea Oxford de către un grup de cercetători condus de Kay Davies. Esența metodei constă în încercarea de a stimula activitatea omologului autozomal al distrofinei – gena utrofina, produsul de expresie al căreia are potențialul de a compensa lipsa distrofinei în toate grupele musculare. În embriogeneza umană, până la aproximativ șapte săptămâni de dezvoltare, distrofina nu se expresează, iar funcția sa în mușchi este efectuată de proteina utrofina. În intervalul dintre cea de-a șaptea și a 19-a săptămână de dezvoltare embrionară, sunt expresate ambele proteine, iar după a 19-a săptămână se produce substituția utrofinei musculare prin distrofină. După 19 săptămâni de dezvoltare embrionară, utrofina se găsește numai în regiunile conexiunilor neuromusculare.

Proteina utrofina, fiind localizată autozomal, prezintă similitudini evidente cu proteina distrofina, prin intermediul domeniilor sale N- și C-terminale, care joacă un rol decisiv în funcționarea distrofinei, în timp ce domeniul central rod (bastonaș), nesemnificativ din punctul de vedere al funcționalității, este prezent în cadrul utrofinei într-o versiune foarte scurtă [77]. Au fost deja obținute date care demonstrează că transfecția șoarecilor mdx in vivo cu gena utrofina conduce la exprimarea utrofinei la nivelul mușchilor scheletici și diafragmatici [77]. Rezultatele experimentale admit posibilitatea de a corecta defectele din fibrele musculare, care nu prezintă distrofină, prin intermediul utrofinei [78].

B. Amiotrofiile spinale

Amiotrofiile spinale formează o grupă de maladii eterogene, ereditare autosomal-recesive, caracterizate prin degenerarea celulelor coarnelor anterioare ale măduvei spinării [79].

Prima mențiune despre amiotrofia spinală (SMA) ține de sfârșitul secolului al XIX-lea, când G. Werdnig (1891) a publicat în revista „Arhiva de psihiatrie și neurologie” articolul „Două cazuri de atrofie musculară infantilă ereditară începătoare progresivă de natură neurogenă”. Acesta a descris SMA la un copil care până la 10 luni a fost sănătos, însă treptat a apărut slăbiciunea musculară progresivă în ambele picioare, s-au dezvoltat atrofii la mușchii spinali, ceea ce a condus la pierderea posibilității de a șede de sine stătător.

SMA este o boală neurodegenerativă ereditară și se subdivide în trei forme clinice:

Tipul I – forma *acută* (boala Werdnig-Hoffmann), ce apare în primele șase luni de viață și provoacă moartea în primii doi ani. Slăbiciunea este simptomul principal al SMA. Gravitatea și timpul apariției simptomelor bolii variază. Există o corelație între începutul maladiei și gravitatea ei. Astfel, boala care se începe mai târziu este mai acută și are o prognoză nefavorabilă [81].

Tipul II – forma *intermediară*: pacienții nu se țin pe picioare, dar de obicei trăiesc mai mult de patru ani. Mai des, slăbiciunea se manifestă în primele câteva săptămâni sau luni ale vieții, când familia are posibilitatea de a observa copilul și începe să se îngrijoreze că lipsesc mișcărilor motrice normale [82].

Tipul III – forma *juvenilă* (boala Kugelberg-Welander): slăbiciunea musculară progresivă apare după doi ani. Cea mai simplă formă se observă în cazul apariției târzii a primelor simptome ale bolii. Primul simptom este slăbiciunea mușchilor părților proximale ale extremității posterioare. Copiii nu pot fugi, cad deseori, au greutate la urcarea scării și la ridicarea din poziție șezândă.

Tipul IV – forma *adultă*: maladie treptat progresivă, având debutul, în majoritatea cazurilor, peste vârsta de 35 de ani; nu afectează grav calitatea vieții. Atrofia musculară spinală de tipul IV se caracterizează prin slăbiciunea musculaturii proximale, fasciculelor, scăderea reflexelor tendoanelor și duce la incapacitatea de deplasare de sine stătător. Electromiograma relevă semne specifice de deteriorare a coarnelor anterioare ale măduvei spinării, manifestată prin activitate ritmică spontană. Examinarea morfologică a biopsiilor fibrelor musculare evidențiază atrofierea și hipertrofierea fibrelor de tipul I și tipul II. O trăsătură caracteristică este acumularea de fibre mici, rotunde, intercalate cu fibre hipertrofiate (atrofie „fasciculară”). Examenul patomorfologic evidențiază umflarea, încrețirea sau atrofia motoneuronilor din coarnele anterioare ale măduvei spinării și, în unele cazuri, a nucleelor nervilor cranieni.

Toate cele patru forme ale SMA prezintă variante alelice ale mutațiilor unei gene – *SMN1* (survival motor neuron 1 – gena factorului de supraviețuire a neuronilor motori 1), situată pe brațul lung al cromozomului 5 (5q11.2-q13.3), aflată în locusul *D5S125* și identificată prin metoda de clonare pozițională în anul 1995. În cromozomul 5q13 a fost descoperită duplicarea invertită, compusă din 500 kb, ce conținea o regiune critică în zona telomerelor. În zona dată a fost identificată o genă cu mărimea de 20 kb. Analiza northern blot a ARN din diferite țesuturi, inclusiv din măduva spinării, a arătat că gena expresează larg și dă un transcript cu mărimea de 1,7 kb mARN, care codifică o proteină necunoscută înainte, este compus din 294 de aminoacizi și are masa moleculară de 32 kDa [83].

Ulterior, a fost descoperită o genă omoloagă la 95% din indivizii de control, dislocată în zona centromerului, care diferă cu cinci mutații punctiforme. Acest fapt a permis diferențierea ambelor gene prin amplificarea exonilor 7 și 8. Gena din zona centromerului a fost numită *cBCD541* (mai apoi *SMN2*), ea se expresează și ARNm ei se supune splicingului alternativ, cu pierderea exonului 7 [84].

Oamenii și cimpanzeii pitici (Bonobo) sunt unici deținători a două copii paralogice (sau gene omoloage, formate în urma apariției unei copii predecesoare a genei) ale genei *SMN* inversate în cadrul cromozomului 5. Genele *SMN1* (copia telomerică) și *SMN2* (copia centromerică) se diferențiază la nivel de secvență codificatoare printr-o singură nucleotidă. Schimbul nucleotidei 6C>T în exonul 7 al genei *SMN2* duce la schimbul matisării ARN-ului, ulterior la lipsa exonului 7 aproximativ în 90% din transcriptul genei *SMN2*. Din această cauză, gena *SMN2* reprezintă sursa sintezei proteinei izoforme SMN Δ 7, proteină schimbată, nestabilă și ușor degradabilă, care nu este capabilă să compenseze consecințele delețiilor în gena *SMN1*[85]. Numărul copiilor genei *SMN2* este invers proporțional gravității bolii. În ciuda faptului că absența produselor de sinteză ale genelor *SMN* este absolut fatală, în prezența mai multor copii ale genei *SMN2* sunt descrise cazuri de prezență asimptomatică a mutațiilor homozigote în *SMN1*[86].

Într-un studiu, la 93% (213 din 229) din bolnavi a fost depistată lipsa genei *SMN*, iar structura ei deteriorată – la 13 (5,6%) pacienți examinați. Prezența mutațiilor punctiforme (Y272C) [87] sau ale delețiilor scurte în situsuri de splicing ale intronilor 6 și 7 a stat la baza presupunerii că copia telomerică dată este responsabilă de apariția acestei boli. Astfel, analiza grupului de control a arătat că gena *SMN* era prezentă la toți indivizii, iar gena *cBCD541* – la 95%.

Alături de capătul telomerului genei *SMN* este identificată încă o genă – gena proteinei inhibitoare a apoptozei neuronilor – *NAIP* (neuronal apoptosis inhibitory protein). În formele clinice severe ale SMA (tipul I) condiționate de deleții, se atestă frecvent pierderea genei *NAIP*. S-a stabilit că diferența dintre vârsta apariției manifestărilor și severitatea variantelor alelice ale SMA proximale de tipurile I-IV poate fi datorată efectului de modificare al numărului de copii atât ale genei *SMNc*, cât și ale altor gene din această regiune –*NAIP*, *SERF1A* (*H4F5*) și *GTF2H2* [88].

Burglen ș.a. au studiat gena *SMN* mai detaliat și au arătat că ea constă din 9 exoni, dar nu din 8, cum se credea înainte. A fost determinată localizarea stop-codonului translării în exonul 7, deoarece exonul 8 nu se translatează.

Bussaglia ș.a. au efectuat analiza genetică a 54 de familii neînrudite, printre care a fost descoperită deleția a 4 pb ale genei *SMN*, codonii 133–134 în exonul 3, la 4 pacienți neînrușiți. Această deleție este explicată prin modificarea diapazonului de citire și apariția prematură a stop-codonului, care s-a produs în același loc al haplotipului, ceea ce presupune apariția unui eveniment mutațional, ce a avut loc în toate cele patru familii. Din trei familii, un pacient a avut SMA de tipul II, fiind homozigot după deleția dată, un alt pacient a avut boală de tip I, alții doi – de tip III, deleția fiind moștenită de la unul dintre părinți. Ceilalți pacienți posedau alte deleții ale genei *SMN* sau conversia genei, ce înlocuiau exonul 7 cu copia omoloagă. Aceasta a fost prima mutație cu modificarea diapazonului și ea confirmă asocierea genei *SMN* cu fenotipul SMA.

S-a stabilit că majoritatea pacienților poartă deleția homozigotă a exonilor 7 și 8 și numai la o mică parte dintre ei lipsește exonul 7, dar se păstrează 8. Utilizând metoda „contiguous PCR”, de la exonul 6 până la exonul 8 al genei *SMN* a fost găsită gena himeră, ce s-a format ca rezultat al unirii exonului 7 al genei de copiere (*SMN2*) și exonului 8 al genei *SMN*, s-a stabilit lipsa genei *SMN* normale. Prin urmare, conversia genică poate duce la formarea diferitor forme ale bolii, iar aceasta explică apariția maladiei la indivizii la care au lipsit delețiile exonilor 7 și 8. S-a ajuns la concluzia că prezența genei hibride funcționale, la indivizii sănătoși cu delețiile exonilor 7 și 8 ale genei *SMN*, poate explica lipsa manifestărilor clinice la aceștia.

A rămas de răspuns la întrebarea critică: de ce pierderea homozigotă a genei *SMN1*, dar nu a *SMN2*, provoacă SMA? Analiza transcriptelor *SMN1/SMN2* ale genelor hibride și ale genei noi mutante *SMN1* a arătat relații reciproce directe între boală și lipsa exonului 7. Pentru a determina care dintre cele cinci nucleotide ale genelor diferite *SMN1* și *SMN2* provoacă splicingul alternativ al exonului 7, au fost obținute seriile de minigene *SMN* și caracterizate produsele lor. S-a constatat că substituția C cu T în codonul 280 al exonului 7 este responsabilă pentru splicingul alternativ [89].

Există o corelație strânsă între severitatea bolii și nivelul de proteină SMN. Proteina SMN este expresată pretutindeni, ea se găsește atât în citoplasmă, cât și în nucleu, unde este concentrată în structuri punctiforme, numite „gems”. Niveluri ridicate de proteină sunt întâlnite în neuronii măduvei spinării, acestea fiind celulele afectate la pacienții cu SMA [90].

După cum am menționat mai sus, maladia ereditară SMA este cauzată de o mutație la nivelul genei *SMN1*, și anume de o mutație homozigotă. La persoanele sănătoase există cel puțin o copie a genei *SMN1* și una a genei *SMN2* (Figura 1.3) [91].

Mutații în cadrul alelelor genei *SMN1* sunt prezente la aproximativ 95% din pacienții afectați; restul 5% sunt persoane cu mutații nonsens, frameshift sau missense în genă [92], [93]. Cea mai frecventă mutație în *SMN* este deleția exonilor 7 și 8 [94], [95].

În afară de aceasta, la un pacient cu SMA de tipul III a fost descoperită o mutație a genei *SMN* necunoscută anterior, exprimată printr-o unică înlocuire nucleotidică în intronul 7, c.922+6 T/C, care rupea succesiunea zonei-donor a splicingului exonului 7, fapt ce a dus la pierderea lui. Rezultatele studiului demonstrează mecanismul molecular-genetic de dezvoltare a bolii.

Actualmente s-a stabilit că regiunea SMA conține patru gene: *SMN1*, *NAIP*, gena *p44*, care codifică una dintre subunitățile factorului principal transcripțional *TFIIH*, și *H4F5*, genă cu funcția nedeterminată [88]. Cele patru gene sunt duplicate și au copii telomerice și centromerice. Deleția uneia dintre ele poate fi depistată la pacienții cu SMA, dar numai gena *SMN* telomerică (*SMN1*) este responsabilă de declanșarea bolii.

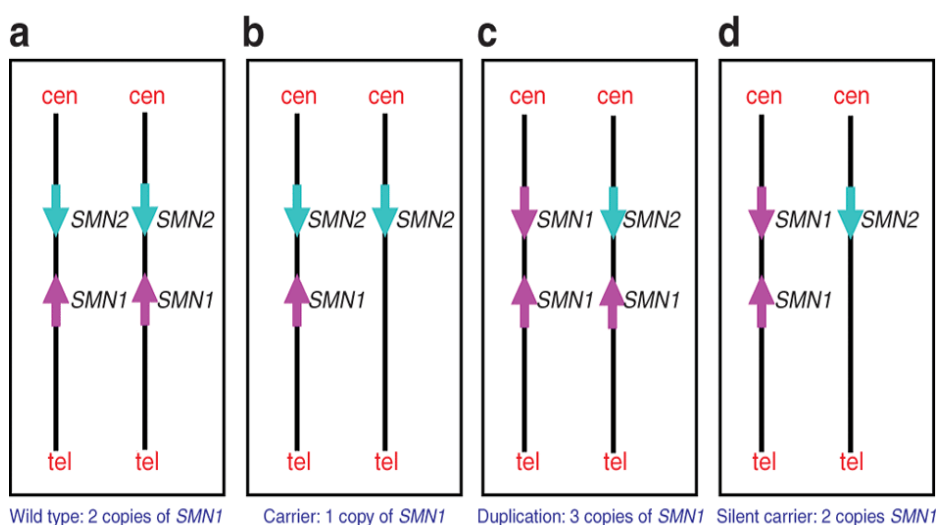


Fig. 1.3. Schema alelelor genelor *SMN1* și *SMN2* pe cromozomul 5q13:

a – tip sălbatic cu o copie a *SMN1* și *SMN2* pe fiecare cromozom 5 (1+1); **b** – purtător SMA cu o copie *SMN1* pe un cromozom 5 și pierderea *SMN1* pe alt cromozom (1+0); **c** – duplicarea cu două exemplare de *SMN1* pe un cromozom 5 și o copie pe alt cromozom (2+1); **d** – SMA purtător ascuns cu două copii ale genei *SMN1* pe un cromozom 5 și pierderea alelei *SMN1* pe celălalt cromozom (2+0)[91]

În mod similar, gena *SMN2* se prezintă ca una dintre genele SMA modificate. Au fost găsite dovezi că această genă poate influența asupra fenotipului bolnavilor, pentru că nivelul proteinei SMN în gena dată corelează cu gravitatea bolii. Totuși, ea nu poate preveni boala. Numărul copiilor genei depistate la bolnavii cu SMA tipurile I și II este mai mic decât la cei cu tipurile II și III.

Proteina completă SMN este formată din 294 de aminoacizi, se caracterizează prin expresie omniprezentă și are multe funcții [96]. Concentrația înaltă a acestei proteine se întâlnește în special la nivelul creierului și măduvei spinării, rinichilor și ficatului, dar se găsește și în inimă, mușchi și alte țesuturi. Proteina este expresată atât în nucleu, cât și în citoplasmă în

componenta complexului SMN, ce reprezintă autoasamblarea structurilor proteice multidimensionale, necesare pentru îmbinarea pre-mARN [97]. Proteina SMN acționează ca o subunitate a complexului SMN în biosinteza particulelor mici de ribonucleoproteine nucleare (snRNP – small nuclear ribonucleic particles). Complexul SMN le permite proteinelor Sm și nucleului ARN nuclear îmbogățit cu uridină să formeze snRNP, implicat în matisarea pre-ARNm [98]. Conținutul insuficient de proteine SMN duce la o scădere a sintezei snRNP.

Pentru a determina proteinele celulare ale proteinei SMN și includerea lor în funcțiile celulare, au fost efectuate cercetări asupra relațiilor biochimice. S-a stabilit că SMN intră în calitate de partener al ribonucleoproteinei U [99], de asemenea acționează reciproc cu sine însăși, cu fibrilarina și cu alte proteine necunoscute, numite „SIP-1” (proteina ce acționează cu SMN). Fibrilarina este o proteină nucleară asociată cu toate boxele C/D snRNP, participă în procesarea și modificarea ARNr. Cooperarea dintre SMN și fibrilarină este una directă. La ambele proteine au fost identificate domenii care participă la interacțiune.

Prin metoda de imunoprecipitare, a fost depistată cooperarea dintre SMN cu proteinele Gemin-3 și Gemin-4 [100]. În celulele HeLa, SMN, SIP-1 și Gemin-3 au fost localizate în citoplasmă și în structurile nucleare necunoscute, asociate cu corpurile spiralate (coiled bodies) și numite „gems” (gemini of coiled bodies). Aceste structuri sunt definite ca anticorpi anti-SMN, cu mărimea de circa 0,1-1 μm, apar în cantități de 2-8 pe nucleu și în ele se expresează coilina. Corpurile spiralate presupuse participă în metabolismul ARN. „Gems” în cuplu cu corpii spiralați sunt supuse modificărilor asemănătoare ca răspuns la factori endogeni și exogeni ai celulei. Se presupune că aceste structuri participă la procesarea ARN.

Li U. ș.a. au arătat că SMN și SIP-1 formează un complex cu miezul „core” al proteinei Sm snRNP și posedă două situsuri de legătură – unul pentru SIP-1 și altul pentru proteine Sm. Analiza imunocitochimică a fibroblastelor pacienților cu SMA a arătat scăderea numărului „gems” la pacienții cu SMA tip I, precum și corelația dintre aceste structuri și tabloul clinic al patologiei.

S-a demonstrat acțiunea directă a SMN și ARN asupra legării ADN. Sectorul proteinei SMN care este codificat de al 2-lea exon este necesar pentru asigurarea unirii acizilor nucleici. Domeniul acesta este omolog la câțiva factori de legare a acizilor nucleici, inclusiv câteva proteine mobile grupate (HMG). În afară de aceasta, mutațiile *SMN* descoperite anterior la pacienții cu AMS au demonstrat micșorarea acțiunii legării ARN.

Proteina SMN cooperează cu proteine spliceozome snRNP și este necesară pentru concentrarea SMN în citoplasmă. S-a constatat că proteina SMN mutantă, în care lipsesc 27 de aminoacizi N-terminali (SMN Δ 1N27), provoacă reorganizarea negativă a snRNP în nucleu. În

afară de aceasta, SMNdelN27 inhibă splicingul premesagerului ARNm in vitro, totodată proteina SMN normală stimulează splicingul. Aceasta demonstrează că SMN joacă un rol decisiv în formarea complexului multiproteic numit „spliceozom” și în biogeneza ARNm [101].

Eforturile de dezvoltare a terapiilor pentru SMA sunt axate pe identificarea procesului ce ar potența expresia SMN. A fost identificat ARN lung necodificator (lncRNA), ce provine din catena antisens a SMN – SMN-AS1, care are un nivel crescut în neuroni și care transcripțional reprimă expresia SMN prin recrutarea complexului epigenetic represiv Polycomb-2. Degradarea orientată a SMN-AS1 cu oligonucleotidele antisens (ASO) crește expresia SMN în celulele derivate de la pacient, în culturile de neuroni și sistemul nervos central al șoarecelui. SMN-AS1 ASOs livrate împreună cu oligonucleotidele de comutare a *SMN2* sporesc expresia SMN și îmbunătățesc supraviețuirea șoarecilor afectați sever de SMA. Acest studiu este prima dovadă a conceptului că orientarea ARN-ului lung necodificator spre activarea transcripțională a *SMN2* poate fi combinată cu modificarea matisării *SMN2* spre ameliorarea SMA și demonstrează eficiența combinării ASO pentru tratamentul maladiilor neurogenetice [102].

Până acum, toate eforturile oamenilor de știință (generații de grupuri de cercetare în această direcție activează în USA, Germania, Italia) au fost orientate spre identificarea metodelor ce ar mări considerabil cantitatea de proteină SMN în organism. Rezultate bune au fost obținute în urma administrării unor preparate farmacologice (acid valproic, butirat de natriu și altele), iar eficacitatea utilizării celulelor stem în tratamentul maladiei SMA rămâne încă sub semnul întrebării.

Știri despre șase programe de cercetare pentru căutarea terapiei medicamentoase pentru atrofia musculară spinală (SMA) au fost prezentate la Conferința din SUA consacrată SMA de la mijlocul lunii iunie 2016. Dintre aceste șase programe, patru – AVXS-101 (terapia genică), Nusinersen, RG7800/RG7916 și LMI070 – abordează genetica maladiei SMA. Terapia genică își propune să înlocuiască mutația în gena *SMN1*, care este cauza amiotrofiei spinale, iar celelalte trei programe vizează *SMN2* ca o „genă de duplicare”. Alte două programe au ca scop protecția funcțiilor celulelor nervoase și, respectiv, a mușchilor. Din 2017, preparatul firmei Biogen, numit Spinraza (nusinersen) a fost acceptat de către FDA pentru tratamentul maladiei tipul 1, 2 și 3 [103]. Actual se propune tot mai multor țări acest preparat pentru tratament, dintre care au acceptat USA, Australia, Noua Zeelandă, Hong Kong, Taiwan și Coreea de Sud

1. *Olesoxime* – Roche/Genentech. Roche și Genentech activează actualmente pentru obținerea aprobării medicamentului în concordanță cu nevoile pacienților cu SMA. Ei evaluează dezvoltarea clinică a două medicamente experimentale cu abordări diferite pentru SMA – Olesoxime și modificatorul splicingului *SMN2* (RG).

Începând cu luna martie 2015, Roche evaluează și promovează dezvoltarea clinică și producția de Olesoxime în conformitate cu cerințele serviciilor de management al sănătății, în speranța obținerii permisiunii de a intra pe piață pentru a oferi pacienților cu SMA acest preparat. Totodată, Roche va efectua un studiu suplimentar privind faza 3 Olesoxime la bolnavii cu tipurile II și III ale maladiei SMA [104].

2. *LMI070 – Novartis*. Medicamentul LMI070 a fost administrat la 13 pacienți; durata maximă de administrare până în prezent este de ~ 14 luni. Doza maximă tolerată nu a fost atinsă (MTD). Efectele secundare raportate au fost ușoare, iar preparatul a fost, în general, bine tolerat. Au fost identificate noi organe-țintă pentru studii de toxicologie la câini (efecte secundare asupra organelor au fost identificate numai în studiile pe animale) [105].

Pacienții incluși în studiu continuă să primească medicamentul cu o ajustare a dozei și cu măsuri de siguranță suplimentare. Astfel, cu excepția a două decese datorate insuficienței respiratorii, niciunul dintre pacienți nu a renunțat la testare.

Se urmărește îmbunătățirea stărilor pacienților pe scara The Children’s Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND) [106] și menținerea alimentării și respirației independente la pacienți.

Rezultatele unui studiu pe animale ce utilizează doza zilnică pe parcursul unui an (comparativ cu o doză săptămânală într-un studiu la om), au arătat o deteriorare neașteptată a nervilor periferici, a măduvei spinării, a testiculelor și a vaselor sangvine din rinichi.

3. *Nusinersen – Biogen/Ionis*. La data de 23 decembrie 2016, preparatul Nusinersen (BIOGEN) este aprobat în SUA de către Agenția de control al produselor alimentare și medicamentelor (FDA – Food and Drug administration) pentru tratamentul atrofiei musculare spinale, ceea ce îl face prima terapie pentru SMA aprobată în istorie. Biogen și Ionis Pharmaceuticals lucrează la cercetarea preparatului respectiv [39]. În prezent, sunt în curs de desfășurare două studii de faza a 3-a a trialului clinic – ENDEAR și CHERISH. Ele se află în etapa colectării datelor clinice pentru depunerea lor la autoritățile de reglementare și pentru obținerea autorizației de comercializare, în cazul în care se constată că studiile au avut succes. Studiul ENDEAR analizează efectele Nusinersenului la sugarii cu vârsta de până la 7 luni [107], iar CHERISH – la copiii cu vârsta cuprinsă între 2 și 12 ani [108].

Două studii suplimentare ce se desfășoară în faza a 2-a a trialului clinic, denumite NURTURE și EMBRACE, sunt de asemenea efectuate în scopul colectării datelor suplimentare despre Nusinersen. Studiul NURTURE (presimptomatic) cercetează efectul preparatului la sugarii cu SMA care au fost diagnosticați, dar nu au manifestat încă simptome, cu scopul de a determina dacă este posibilă prevenirea sau încetinirea apariției bolii. Studiul EMBRACE este

conceput pentru a colecta date suplimentare despre un grup mic de pacienți cu SMA în perioada infantilă sau în copilărie, care nu îndeplinesc criteriile de vârstă și alte criterii pentru studiile ENDEAR și CHERISH. Toate studiile sunt efectuate în întreaga lume. Studiul NURTURE desfășoară activ recrutarea pentru experimente sau studii clinice, iar pentru studiile ENDEAR, CHERISH și EMBRACE a fost recrutat numărul deplin de pacienți.

4. *RG7800 și RG7916 – Roche/PTC/SMA Foundation.* Roche, PTC Therapeutics și Fundația SMA colaborează în scopul elaborării preparatelor RG7916 și RG7800, destinate corectării modificărilor de splicing ale genei *SMN2*, pentru pacienții cu SMA[109]. Aceste preparate sunt produse orale experimentale și sunt studiate în prezent pentru capacitatea lor de a modifica selectiv matisarea *SMN2* în mRNA, astfel încât să fie produs un transcript *SMN2* de o lungime maximă în ARNm.

În aprilie 2015 a fost suspendat studiul clinic numit Moonfish, care a investigat modificatorul splicingului *SMN2*, denumit RG7800, la pacienții cu SMA. Suspendarea a fost o măsură preventivă după recepționarea unor date neașteptate ca urmare a testării pe termen lung a preparatului RG7800 pe animale, într-o concentrație mai mare decât cea din studiul Moonfish. Cercetările ulterioare asupra preparatului RG7800 au fost oprite. Pacienții care au participat în experimentul Moonfish au dreptul de a se alătura la studiul deschis privind siguranța medicamentului RG7916. În decembrie 2015, cercetarea clinică cu al doilea modificator al splicingului *SMN2* – RG7916 – a fost inițiat pe oamenii sănătoși. Pe baza rezultatelor acestui studiu, preparatul respectiv a fost revendicat pentru studiile clinice la pacienții cu SMA. Cercetările la pacienții cu SMA tipurile I, II și III au fost inițiate la sfârșitul anului 2016 și continuă până în prezent.

5. *CK-2127107 – Cytokinetics/Astellas.* Cytokinetics în colaborare cu Astellas au sponsorizat studiul medicamentului CK-2127107 la pacienții cu atrofie musculară spinală. Acesta este cel mai nou activator rapid de troponină pentru mușchii scheletici, care poate îmbunătăți funcția musculară [110]. Pacienții sunt recrutați din centrele de cercetare clinică din Statele Unite ale Americii pentru faza a 2-a a trialului clinic, ce reprezintă de fapt un studiu randomizat, cu grup de control în care se administrează placebo. Se planifică recrutarea a două grupuri de pacienți pentru două studii consecutive de creștere a dozelor. Pacienții trebuie să fie confirmați genetic cu SMA de tip II, III sau IV și să aibă vârsta de 12 ani și mai mult. Se planifică recrutarea a 72 de pacienți, care vor avea status ambulatoriu sau neambulatoriu. Studiul va aprecia funcția musculară după a 8-a săptămână de administrare a preparatului CK-2127107.

6. *AVXS-101 (Gene Therapy) – AveXis.* În decembrie 2015 a fost format grupul din 15 pacienți cu SMA tip 1 pentru faza 1 curentă, în timpul căreia medicamentul a fost administrat

intravenos (IV) [111]. Principalele teste ale preparatului AVXS-101, administrate intravenos pentru pacienții cu SMA de tip 1, pentru SUA și Uniunea Europeană au fost realizate în anul 2017. În a doua jumătate a anului 2016 s-a efectuat injectarea intratecală (spinală) a AVXS-101 pentru pacienții cu SMA de tip II.

Începând cu data de 15 septembrie 2016, Compania AveXis, specializată în dezvoltarea și efectuarea studiilor clinice de terapie genică pentru pacienții cu boli genetice neurologice rare și fatale, a furnizat informații actualizate privind rezultatele intermediare ale primei faze a preparatului AVXS-101 pentru tratamentul atrofiei musculare spinale de tip 1 (SMA). Datele au fost prezentate de Dr. Jerry Mandell, directorul Centrului de Terapie Genetică de la Institutul de Cercetare al Spitalului Național pentru Copii (SUA). Studiul a fost prezentat la cel de-al 21-lea Congres anual al Societății Mondiale de Boli Neuromusculare, care a avut loc în Granada, Spania. La începutul anului 2017, Compania AveXis a primit pentru preparatul AVXS-101 statutul de „inovator” de la Agenția de Control al Produselor Alimentare și Medicamentelor din SUA (FDA), acesta fiind primul medicament cu acest statut ce tratează atrofia musculară spinală. În cadrul prezentării, pentru prima dată au fost înaintate datele preliminare ale studiului clinic, ce au inclus informații despre realizările funcțiilor motorii ale pacienților. Două treimi din pacienții din cohorta 2 au dobândit capacitatea de a sta individual. De asemenea, în cohorta 2, 11 din 12 pacienți au putut să-și țină capul, 7 din 12 pacienți au reușit să realizeze mișcări de întoarcere a corpului, iar 11 din 12 au reușit să ia o poziție șezândă cu sprijin [111]. După desfășurarea studiului, doi pacienți au putut să se deplaseze de sine stătător, la unul dintre ei această funcție fiind afectată după data de 15 septembrie 2016. De asemenea, acești doi pacienți au reușit să stăpânească astfel de funcții importante, cum ar fi abilitatea de a se târî, a sta în poziție șezândă cu suport, a sta în poziție ortostatică, a merge cu sprijin.

C. Neuropatiile musculare ereditare

Neuropatiile ereditare reprezintă o grupă de maladii genetice, eterogene, complicate ale sistemului nervos periferic, caracterizate prin polimorfism clinic marcat. În prezent se diferențiază patru grupe de neuropatii, în funcție de combinația dintre deteriorarea porțiunilor locomotoare sau senzitive ale nervilor periferici: 1) neuropatii senzitivo-motorii ereditare (NSME); 2) neuropatii motorii ereditare; 3) neuropatii senzoriale ereditare; 4) neuropatii senzitivo-vegetative ereditare. Fiecare dintre aceste grupe se împarte în câteva variante clinice și genetice.

Cea mai numeroasă grupă o constituie NSME, ce alcătuiește ~ 80% din toate neuropatiile ereditare. Conform propunerii P. Dyck și E. Lambert, bazate pe datele electrofiziologice și histopatologice, NSME au fost împărțite în două tipuri de bază: demielinizate (I) și axonale (II).

Pentru toate grupele de NSME a fost caracteristică triada simptomelor clinice: atrofia secțiunilor distale ale mâinilor și picioarelor, cu deformarea lor; tulburări de sensibilitate în zona mușchilor atrofiați; hipo- sau areflexia mușchilor de la nivelul extremităților superioare și inferioare. De regulă, NMSE au avut o evoluție progresiv-moderată, fără a duce la dizabilități severe ale pacienților. Diagnosticul bolii, în cazuri sporadice, excludea polineuropatiile endocrine, alergice, infecțioase, alcoolice și alte polineuropatii exogene.

Deja primele lucrări apărute la sfârșitul secolului XVIII au permis, în baza investigațiilor histologice ale mușchilor, de a diferenția două tipuri de miopatii: tipul primar, *muscular*, de afecțiune și tipul secundar, *neurogen*, condiționat de distrofia motoneuronilor segmentari ai creierului spinal și ai fibrelor nervoase periferice.

Patologia Charcot-Marie-Tooth (CMT) a fost descrisă concomitent de trei savanți din Londra și Paris în anul 1886. Profesorul Jean Martin Charcot (1825-1893) și studentul său Pierre Marie (1853-1940) au editat în același an primul discurs despre atrofia musculară peroneală, constatând slăbiciune musculară distală la nivelul membrelor inferioare. Ei au examinat familii din Franța, determinând micșorarea excitabilității musculare distale la nivelul membrelor inferioare și superioare. Howard Henry Tooth (1856-1926) a descris această patologie în lucrarea sa prezentată la Universitatea Cambridge în 1886, numind-o „atrofie musculară peroneală progresivă”.

Mai apoi, patologia a primit o altă denumire: „neuropatie senzitivo-motorie ereditară” (NSME).

În anii '60 ai secolului XX, patologia se întâlnea cu o frecvență de 1:2500 populație [112], acum aceste date s-au micșorat până la raportul de 1:5000 (în unele populații constituie de la 1:10000 până la 1:2500), datorită examinărilor și studiilor genetice efectuate. În populația infantilă, prevalența acestei patologii nu a fost stabilită [112].

Neuropatiile senzitivo-motorii ereditare reprezintă o grupă genetic omogenă de maladii ereditare ale sistemului nervos. La baza lor se află afectarea multiplă a nervilor motori și senzitivi periferici. Maladiile din această grupă se clasifică în funcție de: tipul de ereditate, particularitățile clinice, gravitatea evoluției și caracterul modificărilor electromiografice și histomorfologice.

Semnele majore ale afecțiunii sunt slăbiciunile cu evoluție lentă și atrofierea musculaturii segmentelor distale, preponderent ale membrelor inferioare, formarea piciorului „de cocoș”, a piciorului cav (pes cavus), modificarea specifică a mersului (stepaj) și diminuarea sau dispariția reflexelor tendinoase ahilian și carporadial [113].

Biopsia musculară sau de nerv sural (care transmite senzația la pielea de pe o latură a piciorului) poate confirma diagnosticul de neuropatie. După biopsie, acea parte rămâne amorțită un timp, cu furnicături la oboseală, ca electrocutarea. De asemenea, durerile pe acea porțiune de picior se menține mai mult de jumătate de an, iar amorțeala poate persista aproximativ doi ani după operație. Prin procesul de căutare a nervului sural, operația de biopsie este dureroasă. Cu ajutorul electromiogramei (EMG) este măsurată viteza de conducere a impulsului în nerv. Un nerv este stimulat electric la ceva distanță de mușchiul pe care îl alimentează. Este măsurat timpul scurs între stimularea și contracția musculară și este calculată viteza de conducere a impulsului în nerv, în m/sec. Stimulul este aplicat mai mult distal. Similar, măsurările sunt făcute pe transmisia impulsului în direcție opusă, de la degete spre coloana vertebrală. Uneori rezultatele analizelor sunt limitate și dificil de interpretat. Analiza ADN-ului se face peste hotare și se identifică la nivel genetic tipul de CMT (I-IV) [114].

În anul 2000, Reilly Mary M., cercetătoare engleză, a propus clasificarea tipurilor de patologie Charcot-Marie-Tooth, ce se bazează pe studiile efectuate de savanții-geneticieni care au descoperit locul și gena afectată ce cauzează boala. Studiile s-au desfășurat în secolul trecut, apoi aceste descoperiri au fost adiționate clasificării existente deja, care se bazau numai pe aspectul clinic al bolii. Descoperirile efectuate de geneticieni au fost un pas progresiv, făcut cu scopul de a găsi tratamentul acestei maladii.

Divizarea principală a maladiilor neuromusculare în forme primare sau *musculare* și secundare sau *neurogene* s-a păstrat până în prezent. După modul de transmitere a CMT, sunt boli de tip dominant autozomal (cea mai comună), recesiv-autozomal și X-linkate. Forma dominant autozomală a fost împărțită, la rândul ei, în două tipuri principale de CMT, în funcție de viteza de conducere a impulsului nervos în mușchi (NCV):

Tipul I – CMT 1 (formă demielinizantă cu scăderea NCV);

Tipul II – CMT 2 (forma axonală cu NCV normal sau aproape de normă).

Cu excepția tipului 1X, care se moștenește X-linkat, patologia Charcot-Marie-Tooth tipul 1 se caracterizează printr-un mod de moștenire autozomal dominant. Tipul 1 CMT deține 2/3 din toate formele de CMT, caracterizat prin scăderea conductibilității nervoase.

Conform datelor Asociației Internaționale a Bolnavilor cu CMT din ianuarie 2018, circa 2,8 milioane de oameni din întreaga lume suferă de această patologie. CMT este una dintre cele mai frecvente tulburări neurologice ereditare, care apare la 36 de persoane din 100.000 populație [www.charcot-marie-tooth.org].

Cel mai obișnuit tip de boală CMT – 1A (OMIM # 118220) – are o moștenire autozomal-dominantă și este cauzat de dublarea brațului scurt al cromozomului 17 (17p11.2). Această

regiune conține gena *PMP22*, care codifică proteina *PMP22*, fiind o componentă critică a tecii de mielină a fibrelor nervoase periferice. Ca urmare a dublării genei, crește cantitatea de proteină *PMP22* produsă, ceea ce duce la tulburări structurale și funcționale în teaca de mielină.

CMT 1B(OMIM#118200) este o maladie ereditară, cu moștenire autozomal-dominantă. Este cauzată de mutația în gena *MPZ*, ce codifică proteina P0, care este o componentă importantă a tecii de mielină. Majoritatea mutațiilor ce duc la dezvoltarea fenotipului patologic sunt punctiforme. În prezent se cunosc peste 120 de mutații punctiforme diferite în gena P0.

CMT 1 este caracterizată prin polineuropatie motorie. Simptomele generale sunt:

- îngreunarea mersului;
- atrofierea părților distale ale membrilor inferioare;
- formarea piciorului cav.

În 50% cazuri, la pacienți nu sunt prezente reflexele tendinoase. La cei care sunt afectați la o vârstă mai înaintată, simptomele pot fi aclinice. Simptome de formare a piciorului cav se evidențiază la 50-70% din pacienții afectați la o vârstă fragedă. Mai rar, maladia evoluează afectând și membrele anterioare. La 10% din bolnavi se evidențiază o scolioză pronunțată. Există și forme hipertrofice de patologie CMT 1, în cadrul cărora se evidențiază hipertrofia nervilor ce pot fi simțiți la palpare. În general, aceasta este o maladie cu NCV mică, de 18-30 m/s, în circa 50% cazuri, pe când valoarea normală este de 40-45 m/s. CMT 1 este mai des întâlnită la copii. În acest tip de boală este afectată teaca de mielină (hipertrofierea nervului), care are un aspect specific: pe alocuri nervul este hipertrofiat, formând un „bulb de ceapă” sau formațiuni globulare, căpătând astfel aspect de șirag de crenvurști [115].

În funcție de aspectele clinice, acest tip se divide în următoarele subtipuri: CMT 1A, CMT 1B, CMT 1C, CMT 1D, CMT 1E, CMT 1F.

Charcot-Marie-Tooth subtipul 1A este cea mai frecventă formă a patologiei și include 60% din pacienți. Apariția acestei boli se datorează duplicației genei *PMP 22* a cromozomului 17. În mod normal, fiecare genă își are alela sa în organism, însă în cazul dat, gena *PMP 22* fiind în stare dublă, se evidențiază trei alele.

PMP 22 codifică proteina mielină periferică, dar nu se cunoaște cum anume această genă declanșează patologia CMT, subtipul 1A.

Aspectul clinic este următorul: mersul dificil, pacienții adesea cer perne ortopedice pentru susținerea bolții piciorului. După circa 10 ani de la apariția problemelor cu picioarele, uneori apar slăbiciuni și în membrele superioare. Totuși, 90% din pacienți nu sunt imobilizați și nu este afectată durata vieții.

Mutațiile punctiforme în gena *PMP22* reprezintă un fenomen mult mai rar în raport cu apariția duplicațiilor sau delețiilor. Potrivit datelor Consorțiului european pentru cercetarea bolii Charcot-Marie-Tooth, mutațiile punctiforme în gena *PMP22* sunt depistate doar la 4% din bolnavii cu amiotrofii neurale fără duplicații. Majoritatea mutațiilor înregistrate în gena *PMP22* reprezintă substituții de nucleotide și provoacă NSME cu fenotip I sau, în cazuri mai grave – sindromul Dejerine & Sottas (SDS) [116]. Mutațiile în gena *PMP22* se repartizează uniform, incluzând toți cei patru exoni [117].

A fost demonstrat că dozele mari de acid ascorbic (AA) reduc nivelul de ARN mesager (ARNm) al genei *PMP22*, ameliorează funcția și cresc numărul axonilor mielinizați ai nervului periferic în modelul C22 al șoarecelui cu CMT1A [118].

A fost efectuat un studiu clinic cu utilizarea dozelor mari (4-g/zi) de AA timp de doi ani la subiecți cu CMT1A. A fost utilizată modificarea în scorul de neuropatie Charcot-Marie-Tooth (CMTNS – Charcot-Marie-Tooth neuropathy score) ca intervenție primară pe baza recomandărilor din cadrul celui de-al 136-lea European Neuromuscular Centre International Workshop privind CMT, ca fiind cel mai bun obiectiv primar disponibil pentru studiile clinice. A fost utilizată o doză de AA de 4 g/zi, deoarece este echivalentă cu cantitatea maximă ingerată de șoareci, iar o cantitate de până la 10 g/zi a fost tolerată de oameni [119].

Dovezile de înaltă calitate arată că acidul ascorbic nu ameliorează cursul CMT1A la adulți în ceea ce privește parametrii rezultanți utilizați. Conform dovezilor de calitate scăzută, acidul ascorbic nu ameliorează cursul CMT1A la copii. Cu toate acestea, a fost observat că în urma tratamentului cu AA, CMT1A progresează încet, iar parametrii finali arată doar o schimbare mică în timp. Ar trebui luate în considerare studiile de lungă durată, iar parametrii finali, mai sensibili la schimbarea în timp, trebuie să fie proiectați și validați pentru studii viitoare [120].

1.3. Caracterizarea genelor presupuse ca factori genetici modificatori în procesele miopatie

Studierea genei *MTHFR* s-a început în 1970, când Kuthbah și Stokstad au extras această enzimă. Cercetările au evidențiat asocierea dintre deficitul ereditar al acestei enzime și dereglarea metabolismului homocisteinei. Tot în această perioadă s-a demonstrat că creșterea nivelului de homocisteină reprezintă un factor de risc pentru dezvoltarea complicațiilor vasculare. S-au făcut cercetări pentru a clarifica natura genetică a deficitului de *MTHFR*. Clonarea genei *MTHFR* în 1993 a stat la baza determinării mutației asociate cu diferite grade de deficit al enzimei date.

Creșterea nivelului de homocisteină în plasmă este un factor de risc pentru dezvoltarea bolilor sistemului circulator, ce pot fi induse de o variație genetică în metilentetrahidrofolat reductaza (*MTHFR*), enzimă inclusă în metabolismul homocisteinei [121].

În prezent, se cunoaște faptul că homocisteina poate condiționa oxidarea lipidelor de densitate joasă, cu perturbarea funcției endoteliului vascular, proliferarea celulelor musculaturii netede a peretelui vascular, activarea trombocitelor și declanșarea cascadei coagulabilității. Având în vedere toate acestea, în ultimii ani se studiază metabolismul homocisteinei și factorii ce influențează asupra lui.

Homocisteina este un aminoacid ce se formează în urma metabolismului metioninei și cisteinei. Obținută cu produsele alimentare, metionina este metabolizată, cu formarea S-adenozilhomocisteinei, care, la rândul său, în urma hidrolizei, se transformă în homocisteină. În procesul metabolismului homocisteinei, un rol important îl joacă vitaminele B6, B12 și acidul folic [122], [123].

Dereglarea metabolizării homocisteinei în metionină și cisteină duce la creșterea nivelului seric al homocisteinei și eliminarea ei cu urina.

Homocisteina în serul sangvin se supune oxidării, cu formarea radicalilor liberi, toxici pentru endoteliul vascular, proces în urma căruia are loc proliferarea fibrelor musculare, cu stimularea trombocitelor și leucocitelor [124]. Teoretic, un nivel ridicat de homocisteină în sânge (hiperhomocisteinemie) se crede că poate provoca îngustarea și rigidizarea arterelor (ateroscleroza). Îngustarea vaselor de sânge, la rândul ei, duce la diminuarea fluxului sangvin prin arterele afectate. Valorile crescute de homocisteina (>10 micromoli/litru) în sânge poate fi asociată cu arterioscleroza, precum și cu un risc crescut de infarct miocardic, accidente vasculare cerebrale, trombi și, eventual, boala Alzheimer.

Valorile înalte de homocisteină în sânge pot crește de asemenea tendința de coagulare. Cheagurile de sânge din interiorul arterelor pot diminua și mai mult fluxul sangvin. În consecință, lipsa alimentării cu sânge a mușchilor inimii poate provoca atacuri de cord, iar alimentarea defectuoasă a creierului cauzează accidente vasculare cerebrale.

Nivelul ridicat de homocisteină de asemenea s-a dovedit a fi asociat cu formarea de cheaguri în vene (tromboză venoasă profundă și embolie pulmonară). Mecanismul este complex, fiind similar cu modul în care acestea contribuie la arterioscleroză. Unele studii au arătat rate mai ridicate de incidență repetată de formare a cheagurilor de sânge, chiar și la nivele moderate ale homocisteinei.

Există mai multe teorii cu privire la mecanismul prin care hiperhomocisteinemia favorizează apariția și dezvoltarea arteriosclerozei. Unii savanți sugerează că este implicată

gruparea sulfidril din molecula homocisteinei, deoarece aceasta este ușor oxidabilă. Au fost elaborate teorii care urmăresc să stabilească rolul patogen al homocisteinei, precum favorizarea agregării plachetare, dezvoltarea leziunilor endoteliale, alterarea afinității pentru fibrina lipidelor și lipoproteinelor, alterări ale proliferării celulelor musculare netede și creșterea producției de specii reactive de oxigen, conducând la creșterea stresului oxidativ [125].

Metionina este un aminoacid esențial, care funcționează ca sursă de sulf-adenozil-metionină (SAM). SAM este un donator de grupări metil în lanțul de biosinteză a numeroase componente celulare, cum ar fi ADN, ARN, creatina, proteinele și catecolamina.

Metionina are un rol important în producerea creatinei – o substanță care se găsește în țesutul muscular. Creatina furnizează mușchilor energia necesară pentru mișcare și crește astfel performanța sportivilor în timpul antrenamentelor. De asemenea, acest aminoacid susține funcționarea optimă a inimii, ceea ce este deosebit de important, mai ales pentru persoanele care efectuează exerciții fizice sistematice.

Prin demetilarea SAM se formează homocisteina. Nivelul homocisteinei serice variază în funcție de cele două căi de metabolizare a ei. Prima ar fi transsulfurarea la cisteină, prin intermediul enzimei cistation b-sintetaza, enzimă ce necesită vitamina B6 drept cofactor. A doua cale ar fi remetilarea la metionină, necesitând prezența unor enzime ce au drept cosubstrat acidul folic și coenzima vitamina B12 [126].

Vitamina B12 intervine, alături de folați și de vitamina B6, în dinamica proceselor de metilare, SAM (sulf-adenozil metionina) și SAH (sulf-adenozil homocisteina) având un rol important în metilările din organism. Grupările metil de natură exogenă sunt preluate de SAM, care devine astfel donator universal de grupări metil pentru reacțiile de metilare din organism [126].

Acidul folic este ușor convertit în tetrahidrofolat (THF). *MTHFR* convertește THF la 5-metil THF. *MTR* (metionin sintaza), combină apoi 5-metil folatul cu homocisteina, pentru a forma metionina și tetrahidrofolatul, mai precis, *MTR* îndepărtează o grupare metil de la 5-metil folat, apoi reține cisteina pentru a forma metionina. În acest proces, 5-metil folatul este convertit înapoi în THF. *MTRR* generează metil B12, de care are nevoie *MTR*. Dacă enzimele *MTRR*, *MTHFR* și *MTR* nu funcționează normal, nivelul homocisteinei în sânge va crește, iar metilarea în general va fi comprimată (Figura 1.5).

Metionin sintaza (*MS* sau *MTR*), o enzimă dependentă de vitamina B12, catalizează transferul de bază de metil de la 5-metil THF al homocisteinei, producătoare de metionină și tetrahidrofolat (THF).

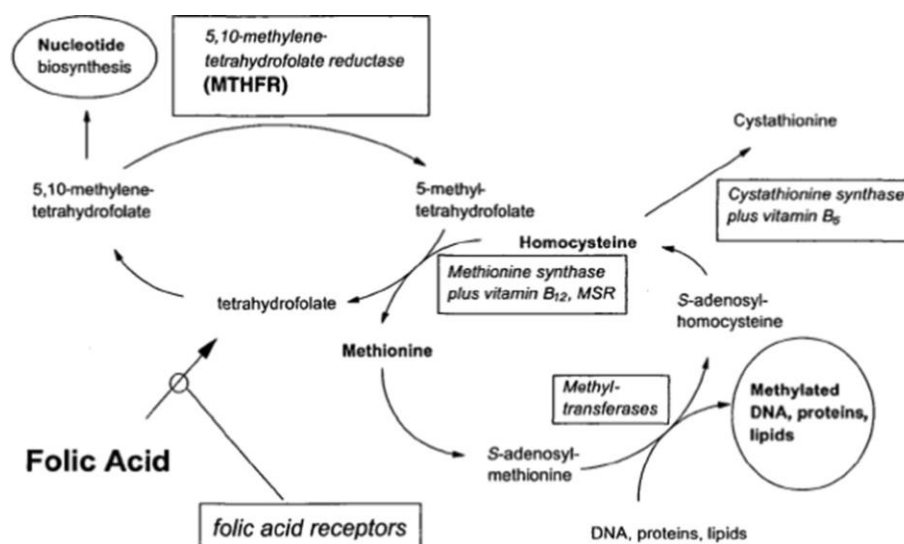


Fig. 1.5. Ciclul acidului folic, metioninei și homocisteinei [121]

Gena *MTR* este situată pe cromozomul 1q43.9, fiind esențială pentru menținerea unui nivel adecvat intracelular de S-adenosilmetionine (*SAM*) pentru metilarea ADN-ului și reglând concentrațiile de homocisteină, ca să nu atingă niveluri toxice. *SAM* este un grup de bază donator de metil implicat în 100 de reacții de metilare, inclusiv metilarea ADN-ului (Figura 1.6).

Metilene-tetrahidrofolat reductaza (*MTHFR*) catalizează reducerea de la 5,10-metilenetetrahidrofolate (metilen THF) la 5-metiltetrahidrofolate (5-metil THF), este forma majoră circulantă a acidului folic și donator de carbon pentru remetilarea homocisteinei la metionină. Astfel, *MTHFR* asigură legătura dintre acidul folic și metabolismul homocisteinei.

Localizarea citogenetică a genei *MTHFR*: 1p36.3.

Localizarea moleculară pe cromozomul 1: perechile de baze 11,769,246 până la 11,788,568 (Figura 1.6).

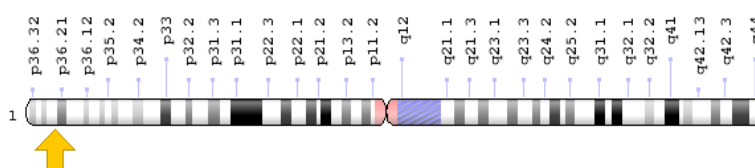


Fig. 1.6. Localizarea moleculară a genei *MTHFR* pe cromozomul 1 [299]

Clonarea genei *MTHFR* în anul 1993 a stat la baza identificării mutațiilor asociate cu deficitul acestei enzime.

Enzima este codificată de gena *MTHFR*, compusă din 11 exoni. S-au descris două tipuri de mutații ale genei *MTHFR*. Cea mai cercetată este mutația missense *C677T*, în cadrul căreia nucleotida citozina (*C*) în poziția 677, care se referă la exonul 4, este înlocuită cu timidină (*T*). Acest fapt induce schimbarea restului de alanină, cu înlocuirea restului de valină (p.Ala222Val)

în domeniul catalizator în situl legat de folat. Această dereglare ereditară provoacă hiperhomocisteinemie asociată cu producția insuficientă a metioninei, mai ales în starea homozigotă a genei (*T/T*) [127].

La persoanele homozigote cu această mutație se observă termolabilitatea *MTHFR* și diminuarea activității fermentului până la 35% din nivelul mediu. Totodată, la aceste persoane se constată distribuția defectuoasă a folatului în eritrocite, care se exprimă prin acumularea de poliglutamate, tetraglutamate și a derivatelor mutilate ale tetrahidrofolatului. Prezența acestei mutații însoțește creșterea nivelului de homocisteină în sânge [128]. Cercetările au depistat diminuarea nivelului metilenzării ADN-lui în genomul pacienților homozigoți după această mutație.

O altă variantă a polimorfismului genei *MTHFR* este înlocuirea nucleotidei adenina (*A*) cu citozina (*C*) în poziția 1298, ceea ce duce la înlocuirea restului glutaminei cu restul alaninei în domeniul regulator al enzimei. La persoane homozigote, după mutația *1298CC* se observă diminuarea activității *MTHFR* până la 35% din valoarea normală.

Spre deosebire de polimorfismul *677CT*, la pacienții cu mutația *1298AC* nu se depistează nici creșterea concentrației homocisteinei totale, nici diminuarea nivelului folatului în plasmă. Iar în caz de asociere a heterogenității alelelor *677T* și *1298C* se produce atât reducerea activității fermentului [121], cât și creșterea concentrației homocisteinei în plasmă și micșorarea nivelului de folat, fenomen ce se observă în caz de homogenitate *677T* [127].

Frecvența înaltă a alelei *677T* indică faptul că purtătorii acestei mutații pot avea diferite preferințe în selecția naturală. Există o ipoteză conform căreia, în timpul foamei, micșorarea activității *MTHFR* duce la diminuarea remetilării homocisteinei și la păstrarea radicalilor monocarbonați ai metabolismului tetrahidrofolat pentru sinteza ADN și ARN. Conform acestei ipoteze, purtătorii alelei mutante au un risc mai scăzut de a dezvolta cancer al intestinului gros, ca rezultat, frecvența mutației în populație poate treptat să crească [129].

O metaanaliză a demonstrat asocierea polimorfismului *MTHFR C677CT* cu dezvoltarea cancerului glandei tiroide în populațiile asiatice și cele cauziene [127].

Localizarea și funcțiile genei MTRR în condiții normale și în patologie

Gena *MTRR* este localizată pe brațul scurt al cromozomului 5 între pozițiile 15.3 și 15.2. (perechile de baze de la 7, 922, 216 până la 7, 954, 236) (Figura 1.7).

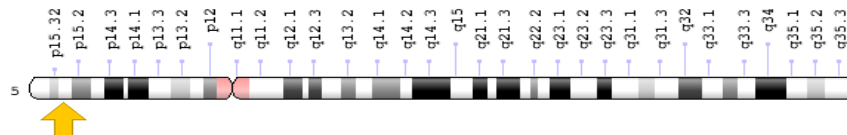


Fig. 1.7. Poziția moleculară a genei *MTRR* în cromozomul 5[299]

Gena *MTRR* codifică resturile aminoacide ale enzimei metionin-sintaza reductaza (*MTRR*), care are un rol important în sinteza proteinelor și participă la un număr mare de reacții biochimice care țin de transferul grupei metil. Una dintre funcțiile *MTRR* este transformarea inversă a homocisteinei în metionină. În această reacție, în calitate de cofactor participă vitamina B12 (cobalamina).

Polimorfismul genei MTRR

Polimorfismul *I22MA->G* este legat de transferul de aminoacizi în molecula fermentului *MTRR*. În rezultatul acestui transfer, funcționarea activă a enzimei scade, ceea ce duce la creșterea riscului de apariție a unor dereglări în dezvoltarea embrionului – defecte de tub neural. Polimorfismul se agravează în cazul deficitului de vitamină B12. La combinarea polimorfismului *I22M A->G* al genei *MTRR* cu polimorfismul *C677T* în gena *MTHFR*, riscul de apariție a spinei bifida se mărește. Polimorfismul *I22M A->G* al genei *MTRR* crește riscul de apariție a hiperhomocisteinemiei.

Localizarea și funcțiile genei MTR în condiții normale și în patologie

Localizarea moleculară e pe cromozomul 1. Mai exact, *MTR* este situată de la perechea de baze 235, 025, 340 până la 123, 130, 584 pe cromozomul uman 1 (Figura 1.8).

Gena *MTR* codifică resturile aminoacide ale enzimei metionin-sintaza (*MTR*), una dintre enzimele de bază ce catalizează transformarea metioninei din homocisteină pe calea remetilării. În această reacție, în calitate de cofactor participă vitamina B12 (cobalamina) [127].

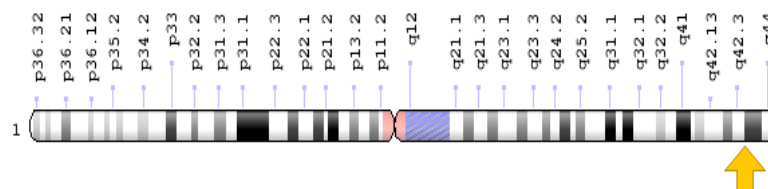


Fig. 1.8. Localizarea moleculară a genei *MTR* pe cromozomul 1[299]

Polimorfismul genei MTR

Polimorfismul *D919G (A2756G) A>G* este legat cu transferul de aminoacizi (aminoacidul asparagina cu glicina) în molecula enzimei *MTR*. Ca urmare a acestui transfer, activitatea funcțională a enzimei se schimbă, ceea ce duce la creșterea riscului de apariție a sindromului

Down la copil, a defectului de tub neural [130], cancerului mamar [131]. Influența negativă a polimorfismului se majorează din cauza creșterii nivelului de homocisteină [122].

Caracteristica moleculară a genei eNOS. Produsul genei și funcția lui

Oxidul nitric (NO) este produs din L-arginină de către NO-sintaza. NO are proprietăți vasodilatatoare, fiind esențial în reglarea presiunii sangvine. Acest gaz este implicat în controlul agregării trombocitare și în reglarea contractilității musculare. Efectul NO cauzează relaxarea mușchilor netezi ai vaselor sangvine, ce are loc prin activarea guanilat ciclazei solubile [132]. Totodată, se mărește conținutul de cGMP (guanozin monofosfat ciclic) care, la rândul său, duce la micșorarea conținutului intracelular de Ca^{2+} . Toate aceste efecte sunt mediate de activarea guanilat ciclazei, care duce la creșterea nivelului de GMP ciclic în celulele-țintă. În anii 1960, Goldberg a descoperit că în unele țesuturi cGMP are rol în transmitere a semnalelor.

Mai târziu, s-a descoperit fragmentul guanilat ciclaza, ce participă la sinteza cGMP. Guanilat ciclaza nu este tot timpul legată de membrană, ci este activată de ionii de calciu, fiind considerată un al treilea transmițător de semnale. cGMP provoacă în celule adesea funcții contrare celor ale cAMP. cGMP participă în reglarea ciclului celular. În funcție de raportul cAMP/cGMP, celula decide: să stopeze proliferarea sau să treacă în faza G1. Astfel, cGMP stimulează proliferarea celulară, iar cAMP o stopează.

Se cunosc trei izoforme ale enzimei NOS:

- NOS inductibilă;
- NOS neuronală constitutivă;
- NOS endotelială (eNOS).

NOS constitutivă neuronală și endotelială sunt codificate de gena *NOS1* și, respectiv, *NOS3*. Prin urmare, mutațiile la nivelul genei pentru NO endotelial (*eNOS*) pot conduce la sinteza anormală de NO, la creșterea rezistenței vasculare, iar ulterior la creșterea presiunii sangvine sistemice. Acestea sunt sintetizate în creier, endoteliul vascular, neutrofile și necesită ioni de calciu pentru activitatea lor. NO-sintaza inductibilă este codificată de gena *NOS3*, se sintetizează în macrofage și în celulele endoteliale și nu este dependentă de ionii de calciu. Toate acestea constituie o familie de gene localizate în diferiți cromozomi și funcționează în diferite linii celulare. NO endotelial induce relaxarea rețelei trabeculelor și a mușchilor ciliari [133].

Gena pentru NOS neuronală (*NOS1*) este localizată pe cromozomul 12 (12q24.2-q24.31) și include 29 de exoni. NOS neuronală participă la relaxarea uretrei și reglează peristaltismul esofagului și al faringelui. Exonul 29 al genei *NOS1* conține o secvență de repetiții dinucleotidice (CA). Frecvența acestei alele-marker polimorfice diferă semnificativ între populațiile de caucazieni și afroamericani și este asociată cu astmul [134].

Gena pentru NOS macrofagic (*NOS2*) este localizată pe cromozomul 17 (17q11-q12) și include 26 de exoni. Regiunea-promotor al acestei gene conține repetiții pentanucleotidice (CCTTT) înalt polimorfice. În multe studii, acest polimorfism este asociat cu diabetul zaharat tip I. Totuși, conform unui studiu, acest polimorfism este asociat cu un risc scăzut de retinopatie diabetică într-o populație din Irlanda de Nord. Ulterior, a fost demonstrat rolul protectiv al acestei alele și în nefropatia diabetică.

Gena *eNOS* (*NOS3*) este localizată pe cromozomul 7 (7q35-36), fiind constituită din 26 de exoni cu o lungime de 21 kb, între perechile de baze 150 688 146 – 150 711 675 (Figura 1.9).

Denumirea oficială a genei este „nitric oxide synthase 3”, iar simbolul oficial al genei este *eNOS*.

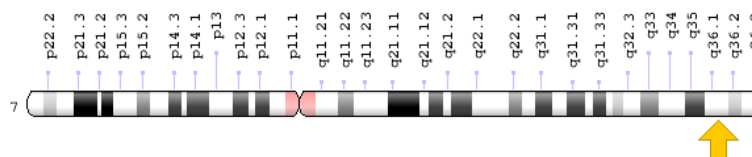


Fig. 1.9. Reprezentarea schematică a genei *eNOS* [299]

Polimorfismul genei *eNOS* cel mai bine studiat este un SNP în exonul 7, poziția 894, și reprezintă o substituție G/T ce determină o mutație missens Glu298Asp în lanțul polipeptidic. Un alt polimorfism bine studiat, localizat la nivelul intronului 4 (*eNOS* 4a/4b), constă din patru (alela 4a) sau cinci (alela 4b) repetiții din 27 pb. Purtătorii genotipului 4a/4a se deosebesc de homozigoții 4b/4b printr-un conținut de nitrați și nitriți sangvini cu 25% mai mare, care este direct dependent de sinteza NO în endoteliul vascular. Se cunoaște că genotipului 4a îi corespunde un nivel maximal de NO bazal, iar la oamenii cu genotipul 4b, nivelul de NO este de două ori mai mic, la heterozigoți acest indicator este intermediar [135].

Peroxizii și radicalii liberi produși în hiperglicemie și în stresul oxidativ reduc semnificativ concentrația de NO la pacienții cu diabet zaharat, provocând astfel complicații vasculare și arteroscleroză. Într-un studiu al unei populații de ruși s-a stabilit că markerul Glu298Asp nu se asociază cu nefropatia diabetică la pacienții cu diabet zaharat tip I și ischemie hepatică [136]. Totuși, această complicație se asociază cu polimorfismul 4a/4b al genei *eNOS*. Astfel, putem conchide că gena *eNOS* determină predispoziția genetică pentru polineuropatia diabetică la pacienții cu diabet zaharat tip I [137].

NO inhibă respirația mitocondrială. Acțiunea NO are loc prin inhibarea 1 (*NADH* ubichinon oxidoreductaza) și inhibarea 2 (succinat ubichinon oxidoreductaza) ale complexelor lanțului transportator de electroni în mitocondrii, fapt ce duce la micșorarea sintezei intercelulare

a macroergilor. Macroergii sunt surse universale de energie în celulă, inclusiv în cea musculară, și reprezintă o energie liberă a legăturii macroergice a lanțului de fosfor al *APT*, care este eliberată în timpul hidrolizei *ATP* până la *ADP* și *AMP* și fosfor neorganic. Însă *ATP*-ul prezent în mușchi este suficient pentru menținerea lucrului muscular nu mai mult de 0,5 secunde și, din acest motiv, în timpul lucrului muscular este utilizată toată energia *ATP* care la moment se sintetizează în celulă, preluându-se suplimentar toată energia existentă în alți macroergi ai celulei [66].

Oxidul nitric este o moleculă mică, hidrofobă, produsă în mai multe țesuturi. NO joacă mai multe roluri în organism, inclusiv modularea tonusului vascular, care acționează ca un neurotransmițător și contribuie în răspunsul imun. Specific pentru musculatura scheletică, NO monitorizează eliberarea de Ca^{2+} , modulează sau inhibă parțial contracția musculară și contribuie la creșterea masei musculare longitudinale prin adăugarea sarcomerului [138]. Datorită capacității sale de a forma specii reactive de oxigen, NO este de asemenea capabil să provoace necroza țesuturilor. În cantități mari, acest gaz este toxic pentru țesut. NO este un vasodilatator puternic al mușchiului neted vascular și, când este administrat inhalator, este un vasodilatator selectiv pulmonar. Se difuzează rapid din alveole spre musculatura netedă vasculară. Stimulează activitatea guanilat ciclazei, care crește concentrația *GMP* ciclic și determină vasodilatația [138].

Oxidul nitric este produs în organism, pe cale naturală, de diverse tipuri de celule. Pereții vaselor de sânge sunt formați din țesut muscular neted, captușit cu celule endoteliale. Aceste celule produc oxidul nitric pentru semnalizarea țesutului muscular înconjurător că trebuie să se relaxeze. Relaxarea țesutului muscular duce la mărirea în diametru a vaselor de sânge (vasodilatarea), care scade presiunea din interiorul vaselor și facilitează circulația sangvină, ceea ce cauzează creșterea fluxului sangvin către inimă, ficat, rinichi și alte organe vitale. S-a demonstrat că NO îmbunătățește circulația, inhibând atât agregarea trombocitelor (formarea cheagurilor de sânge), cât și depunerile din interiorul pereților vaselor sangvine. Oxidul nitric ajută la scăderea riscului de respingere în cazul transplanturilor și implanturilor sau la tratarea disfuncției erectile. Totodată, creșterea fluxului sangvin în organe de genul ficatului și rinichilor facilitează detoxificarea organismului [139].

Sinteza de NO în țesuturi este mediată de o familie de enzime numite „nitric oxid sintaze” (*NOS*), care generează NO din L-arginină, în prezența nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfatului (*NADPH*) și oxigenului. L-arginina este precursorul fiziologic principal al oxidului nitric, care joacă un rol multilateral în fiziologie. Oxidul nitric este o moleculă universală de semnalizare, cu un rol-cheie într-o varietate extrem de diversă de procese fiziologice și fiziopatologice [140].

Sinteza de NO de către *NOS* este dependentă de cinci cofactori. Nitric oxid sintaza a fost identificată și descrisă în 1989, cele trei izoforme majore au fost clonate și purificate între anii 1991 și 1994. Analizele moleculare identifică trei loci genetici pentru *NOS*. Produsele corespunzătoare ale proteinei au fost numite în funcție de situsurile lor originale de identificare. Astfel, au fost identificate trei izoforme distincte de *NOS*, fiind produse de gene diferite, cu localizare diferită, reglare, proprietăți catalitice și sensibilitate inhibitorie și cu 51–57% omologie între izoenzimele umane. Aceste izoforme sunt menționate de nomenclatura cea mai frecventă: *nNOS* (fiind cunoscută de asemenea de tip I, *NOS-I* sau *NOS-1*). Fiind prima izoenzimă găsită (și care predomină) în țesutul neuronal, *nNOS* constă din 1434 de aminoacizi cu o greutate moleculară de 160.8 kDa, este exprimată în neuronii maturi și cei imaturi. De asemenea, *nNOS* a fost găsită în astrocite, în stratul exterior al peretelui vaselor de sânge ale creierului, în miocitele cardiace etc. Potențiatorii funcției sintazei oxidului de azot endoteliale au efect protector pentru endoteliu [141].

Izoenzima neuronală este implicată în dezvoltarea sistemului nervos. Aceasta funcționează ca un neurotransmițător retrograd important în intensificarea pe termen lung și, prin urmare, este probabil să fie importantă în memorie și învățare. *nNOS* are multe alte funcții fiziologice, inclusiv în reglarea funcției cardiace, în peristaltismul și excitația sexuală la bărbați și femei, de asemenea are un rol important în comunicarea celulară și este asociată cu membranele plasmactice.

Gena umană *iNOS* (de asemenea cunoscută și de tipul II, *NOS-II* sau *NOS-2*) reprezintă izoenzima care este indusă într-o gamă largă de celule și țesuturi. Ea este localizată pe cromozomul 17 (17q11.2-q12) [142] și are o mărime de 37 kb, codificând o proteină de 131 kDa. *iNOS* conține 26 de exoni și 25 de introni, lungimea exonului variind de la 50 până la 586 pb, cu situsurile de inițiere și terminare a translării și care apar în exonii 2 și, respectiv, 26.

Din punct de vedere funcțional, este important să cunoaștem faptul că inducerea mărită a *iNOS* de obicei apare într-un mediu oxidativ și astfel nivelurile ridicate de NO pot reacționa cu superoxidul, care conduce la formarea peroxinitritului și a toxicității celulare.

Aceste proprietăți pot defini rolul *NOS* inducibil în imunitatea gazdei, determinând participarea sa la activitățile antimicrobiene și antitumorale, ca parte a izbucnirii oxidate a macrofagelor [142].

Gena *eNOS* (de asemenea fiind cunoscută de tipul III, *NOS-III* sau *NOS-3*) a fost prima izoenzimă depistată în celulele vasculare endoteliale. Aceste izoforme au fost în trecut diferențiate pe baza lor constitutivă, după expresia (*eNOS* și *nNOS*) față de cea inductibilă (*iNOS*) și dependența lor de calciu (*eNOS* și *nNOS*) sau independența (*iNOS*) de el.

Gena *eNOS* a fost clonată pentru prima dată în 1993. Este localizată pe cromozomul 7 (7q35-36). Ea cuprinde 26 de exoni, se întinde pe aproximativ 21 kb ai ADN-ului genomic și codifică un ARNm de 4052 nucleotide; este prezentă o singură copie în genomul haploid uman [143].

Cercetările din ultimii 10 ani arată că *eNOS* este o genă extrem de complexă și înalt reglată, cu roluri fascinante în multe aspecte ale biologiei endoteliale și patobiologiei. Un aspect interesant ce ține de dezvoltarea și reglarea genei *eNOS* este contribuția importantă a ambelor procese transcripționale și posttranscripționale ale *eNOS* la starea de echilibru a expresiei ARNm [144]. Dimerizarea este o cerință pentru activitatea catalitică a *eNOS*, deși forma cu adevărat activă constă dintr-un complex ce include calmodulina, *FAD* [140], tetrahidrobiopterina (BH4) și protoporfirina IX (hem) [145].

eNOS apare preponderent în endoteliu în caz de nivele scăzute de calmodulină și trombocite [140]. Ea este o proteină acilată în mod individual, membranar periferică, care se adresează caveolelor plasmalemal-endoteliale prin interacțiune cu proteinele structurale caveolare, caveolin-1 și sarcolemal caveolare (în inimă), printr-o interacțiune similară cu caveolin-3. Mitocondriile izolate din mușchii scheletici au arătat îmbunătățirea imunolocalizării pentru eNOS, sugerând clar o localizare specifică a genei *eNOS* în mitocondriile musculaturii scheletice [146].

NO este produs prin oxidarea L-argininei, fiind catalizată de trei izoforme diferite ale nitric oxid sintazelor (*NOS*). *NOS* de tip I neuronală (*nNOS*) și *eNOS* de tip III sunt exprimate constitutiv ca enzime latente și necesită o concentrație mai mare de Ca^{2+} pentru activitatea enzimei [144].

eNOS este compusă din doi monomeri identici, totodată fiecare monomer conține un domeniu oxidază amino-terminal și un domeniu reductază carboxi-terminal. Pentru ca NO să fie produs de substraturile O_2 și L-arginină, fluxul de electroni apare de la domeniul reductazei de la un monomer la domeniul oxigenazei al altor monomeri. Ca^{2+}/CaM se leagă la *eNOS*, care facilitează transferul de electroni de la *NADPH* la domeniul reductazei flavinelor sau acel de la flavine care oxigenează domeniul fierului din hem [147].

În mod stringent, eNOS este reglată prin mai multe mecanisme diferite ce implică proteine de interacțiune, cum ar fi Ca^{2+}/CaM , caveolin-1 și hsp90; reglările posttranslaționale (fosforilarea, acilarea); cofactorii și substraturile; cu localizare subcelulară (aparatur Golgi și compartimentele citosolice). În condiții alcaline, activitatea *eNOS* este păstrată inactivă prin mai multe mecanisme independente. În primul rând, majoritatea *eNOS* par a fi legate la caveolin-1 cu activitatea enzimei reprimată în caveole [148]. Această inhibare a *eNOS* poate fi eliberată prin

deplasarea caveolin-1 cu Ca^{2+}/CaM , ca răspuns la agoniștii de mobilizare a Ca^{2+} , inclusiv acetilcolina și ATP. În al doilea rând, un element autoinhibitor presupus, un segment de 50 aminoacizi în domeniul flavin-mononucleotid al *eNOS*, împiedică legătura CaM la *eNOS*. În al treilea rând, cercetătorii Ju H. și Marrero M. au stabilit că *eNOS* s-a dovedit a fi inhibată de interacțiunea cu anumiți receptori ai proteinelor G, cum ar fi receptorii B_2 bradikinina, receptorii angiotensinei II – AT1 și receptorii endotelin-1 ET_B . S-a demonstrat, că bradikinina stimulează fosforilarea tirozinei receptorilor B_2 , iar acest proces este însoțit de disocierea tranzitorie a *eNOS* de la receptor și mărește producția de NO. În al patrulea rând, activitatea eNOS este de asemenea suprimată prin interacțiunea cu proteinele NO de interacțiune (*NOSIP*), care s-a demonstrat că reglează negativ translocția intracelulară și activitatea nitric oxid sintazei endoteliale [149].

1.4. Concluzii la capitolul 1

1. Cercetarea surselor bibliografice a evidențiat particularități unice ale genelor *DMD*, *SMN1*, *SMN2*, *PMP22*, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *eNOS* care afectează dezvoltarea și decurgerea unor procese patologice.
2. Efectuarea analizei molecular-genetice (cu utilizarea tehnicilor moderne disponibile în Moldova) face posibilă determinarea particularităților patologieilor neuromusculare ereditare ale pacienților din Republica Moldova, elaborarea unei strategii de diagnostic al ADN pentru ei și realizarea unei analize comparative a distribuției mutațiilor întâlnite în Moldova și în alte țări.
3. Urmărirea pe o perioadă îndelungată a pacienților cu DMD/B și analiza literaturii de specialitate ne-au condus la ipoteza despre prezența factorilor modificatori în patogeneza DMD/B și ne-a permis să stabilim scopul și obiectivele studiului de față. Acest fapt a stat la baza cercetării genetice a formelor polimorfe ale genelor ciclurilor metioninic (*MTR*, *MTRR*), folat (*MTHFR*), ale genei funcției endoteliale (*eNOS*) și determinării rolului lor în progresarea miopatiei. Evaluarea efectelor modificatoare ale unor sisteme genetice asupra expresiei fenotipice a patologiei monogenice are o importanță fundamentală pentru înțelegerea patogeniei procesului miopatic.

Analiza literaturii din domeniu ne-a permis să formulăm scopul și obiectivele cercetării noastre, să promovăm o ipoteză științifică.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

În conformitate cu obiectivele de cercetare trasate, au fost analizate într-un studiu prospectiv materialele de observare din cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară Umană al IMSP Institutul Mamei și Copilului (IMSP IMC).

Lucrarea a fost realizată în patru etape:

Etapa 1. Determinarea problemei: scopul și domeniul cercetării;

Etapa 2. Colectarea și prelucrarea materialului, precum și observare statistică;

Etapa 3. Prelucrarea statistică a materialului colectat (utilizarea programelor de prelucrare statistică a datelor cu metode standard pentru cercetarea biomedicală, MDR 3.02 și resursele www.gen-exp.ru și www.r-project.org);

Etapa 4. Analiza rezultatelor obținute și argumentarea strategiei aplicate.

Obiectul de bază în cercetare l-au constituit copiii cu maladii ereditare neuromusculare.

Registrul național al patologiilor neuromusculare și banca de ADN al familiilor cu risc înalt au fost organizate în cadrul departamentului științific al Centrului Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală (CNSRGM) și în IMSP IMC, fiind un element funcțional de importanță națională [150].

Lucrarea a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectelor de cercetare instituționale.

Designul cercetării este ilustrat în Introducere, Figura 1.

2.1. Materialele cercetării

Ținând cont de obiectivele propuse, au fost utilizate date obținute de la 1587 de pacienți afectați/suspectați de a prezenta patologii ereditare ale sistemului nervos. Colectarea datelor, inițiată în anul 1991, s-a realizat continuu până în anul 2018. Sursa de bază a indicatorilor ce reflectă răspândirea și frecvența bolilor ereditare cu afectarea sistemului nervos a constituit-o Registrul de evidență a patologiilor ereditare din cadrul CNSRGM, începând cu anul 1991 [151], [150].

Pe parcursul perioadei 1991-2018 au fost supuși examenului clinic complex 274 de bolnavi cu miodistrofie Duchenne/Becker (DMD/B), 252 bolnavi cu amiotrofie spinală și 276 cu neuropatie senzorial-motorie, tip 1A (CMT, 1A), selectați din cei 1587 de pacienți cu patologii ereditare ale sistemului nervos, internați în departamentul de neurologie al Institutului Mamei și Copilului și care au beneficiat de consiliere medicală și genetică în cadrul Centrului de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală, unicul Centrul de Genetica din republica, unde se concentrează pacienții suspecti pentru maladii genetice.

Pacienții au fost incluși în grupul de cercetare cu DMD/B numai după stabilirea diagnosticului în conformitate cu criteriile de diagnostic [152][27] și recomandările organizației Muscular Dystrophy Association (USA) [153][6].

Materiale pentru acest studiu au constituit mostrele de ADN ale persoanelor cercetate, colectate în cadrul CSRGM în perioada 1991-2018, păstrate în congelator la temperatura de -20°C în eprubete de tip Eppendorf de 1.5 ml, cu capac înșurubător, în Laboratorul de Genetică Moleculară Umană, CSRGM.

Cercetarea molecular-genetică a fost efectuată pe mostrele de ADN ale bolnavilor cu DMD, SMA și NMSE tip 1A (Tabelul 2.1), extrase din leucocitele sângelui periferic.

Tabelul 2.1. Formele nozologice și numărul de probe

N	Formele nozologice	Numărul de probe
1	Miodistrofie Duchenne/Becker (DMD/B)	213
2	Amiotrofie spinală (SMA)	142
3	Boala Charcot-Marie-Tooth (CMT, 1A)	106

Formarea grupurilor de copii bolnavi și de copii sănătoși incluși în studiu s-a efectuat printr-o metodă compactă. Pentru aprecierea rolului genelor modificatoare asupra procesului miopatic, a fost realizată cercetarea de tip „caz–control” la 165 bolnavi cu DMD/B și 165 indivizi sănătoși.

A. Caracteristica generală a participanților în studiu

În primul grup – *de cercetare* – au fost incluși indivizi neînrușiți, cu diagnostic de DMD/B, SMA, CMT, care au beneficiat de consiliere medico-genetică în cadrul CNSRGM.

Al doilea grup – *de control* – a inclus un eșantion din indivizi sănătoși înrușiți, copii cu vârsta cuprinsă între 6 și 16 ani, grup eterogen după sex (masculin/feminin).

În anul 2006, toți cei incluși în cercetare, sau rudele apropiate în caz de handicap fizic, au semnat un acord informat, confirmând participarea voluntară la studiu, întrucât Convenția privind protecția drepturilor și demnității omului în domeniul biomedicinii, partea a IV-a, articolul 12, garantează drepturile și toate măsurile pentru a păstra confidențialitatea informațiilor personale. Testarea genetică și analiza datelor au fost realizate în conformitate cu principiile GRIPS, în scopul de a spori transparența, calitatea de predicție a riscurilor [154].

B. Echipamentul laboratorului

În cercetare au fost utilizate următoarele utilaje:

- dispozitive de centrifugare (Eppendorf, Hettlich, Germania);
- vortex, termostate (Bio-San);
- dispozitiv pentru electroforeză verticală (Sigma, SUA);

- d. surse de energie (Sigma, SUA);
- e. amplificator cu gradient de temperatură (Eppendorf, Germania);
- f. termociclere (Techne Thermal Cycler AMP – 1A, Marea Britanie, și tehnologia ADN-ului Tercik, Rusia, Eppendorf MasterCycler, Germania);
- g. transiluminator UV cu aparat de fotografiat digital (UVITEC, Cambridge);
- h. pipete automate (Dia-M, Rusia; Eppendorf, Germania).
- i. secvențiator (ThermoFischer, SUA)

C. Consumabile: reactivi, enzime, biopreparate

În lucrare au fost utilizați reactivi, enzime, biopreparate:

1. acrilamidă;
2. bis-acrilamidă;
3. citrat de sodiu;
4. proteinază K (Fermentas, Lituania);
5. dezoxinucleotidtrifosfați (Fermentas, Lituania);
6. clorură de magneziu;
7. sulfat de amoniu;
8. enzime de restricție (Fermentas, Lituania):
 - TaqI – 5'T↓CGA3' 3'AGC↑T5';
 - PstI – 5'G↓ACGTC3' 3'CTGCA↑G5';
 - BseNI – 5'ACTGGN↓3' 3'TGAC↑CN 5';
 - EcoRV – 5'GAT↓ATC3' 3'CTA↑TAG5';
 - MboII – 5'GAAGAN₈↓3' 3'CTTCTN₇↑5';
 - HaeIII – 5'GG↓CC3' 3'CC↑GG5';
 - Hind II – 5'GTY↓RAC3' 3'CAR↑YTR5'.
9. ADN-polimerază termostabilă („Taq-polimeraza” sau „DreamTaqpolimeraza” Fermentas, Lituania; ThermoFischer, SUA);
10. primeri (oligonucleotidici) sintetizați de Firmele: „Fermentas” (Lituania), „Alpha DNA” (Canada), „Invitrogen” (Illumina, SUA), Eurofins MWG Operon (Germania);
11. TBE-TRIS-borat EDTA;
12. TAE-TRIS-acetat EDTA;
13. poliacrilamidă;
14. TEMED – tetrametiletildiamin;
15. PSA – persulfat de amoniu;
16. bromură de etidiu;

17. acid boric;
18. bromfenol albastru (Serva, Germania).

2.2. Metode de cercetare

Metode molecular-genetice de cercetare

1. Extragerea ADN-ului din sânge

A) *Extragerea cu fenol-cloroform*

B) *Metoda SALT-OUT modificată de extragere a ADN-ului din sânge*

Pentru extragerea ADN-ului se pregătesc materialele necesare (soluțiile-tampon, sol. H₂O₂, eprubete, micropipete), verificând volumul și starea celorlalți reactivi (Tabelul 2.2).

1. Sângele prelevat de la indivizi, conținând EDTA, este transferat în eprubetă sterilă de 15 ml.
2. Se adaugă soluție-tampon Erylysis (Erylysis-Buffer) până la 15 ml, se agită ușor.
3. Se observă schimbarea culorii (culoare roșie metalică) timp de 10 min.
4. Se centrifughează timp de 10 minute la 4500 rot./min.
5. Se înlătură supernatantul, dar se păstrează precipitatul (celulele albe).
Se repetă acțiunile din punctele 2-5 încă de două ori.
6. Se adaugă:
 - proteinază K tampon – 1 ml;
 - SDS (20%) – 50 ml;
 - proteinază K (25mg/ml) – 6 ml.
7. Se agită 15-20 sec. (vortex).
8. Mostrele se lasă la 37°C peste noapte.
9. Se adaugă 300 ml NaCl 5M, se agită aproximativ 15 sec. (vortex).
10. Se centrifughează 10 min. la 4500 rot./min.
11. Se transferă supernatantul într-un tub nou de 15 ml.
12. Se adaugă 4 ml etanol 96%, se agită ușor imediat până la apariția ADN-ului condensat.
13. ADN-ul "se pescuiește" cu pipeta și se transferă într-un tub de 2 ml cu dop etanș, cu precauție de a cuprinde cât mai puțin etanol de 96%.
14. În tubul cu ADN se adaugă 1 ml etanol 70%, se centrifughează la 14000 rot./min., se decantează cât mai mult etanol posibil. ADN-ul se usucă aproximativ 15 min la temperatura camerei.
15. Se dizolvă ADN-ul în 200 ml soluție-tampon TE (TE-Buffer), se lasă în frigider la 4°C câteva zile, apoi ADN-ul este depozitat în cutii special destinate pentru păstrarea acestuia.

Tabelul 2.2. Compoziția soluțiilor-tampon utilizate în extragerea ADN-ului

Denumirea soluției-tampon	Reactivul utilizat	Concentrația	Cantitatea
Erylysis Buffer pH 7.4	NH ₄ Cl	155 mM	41.45 g
	KHCO ₃	10 mM	5 g
	EDTA	0.5 M	0.1 ml
	H ₂ O		500 ml
Proteinaza K Buffer	Tris HCl	1 M	5 ml
	NaCl	5 M	3 ml
	EDTA	0.5 M	1 ml
	H ₂ O		1000 ml
TE Buffer pH 8.0	Tris	10 mM	1.21 g
	EDTA	1 mM	0.37 g

C) Protocol de extragere a ADN-ului prin setul de extragere QIAamp DNA Mini

QIAamp DNA Mini reprezintă o metodă simplă și rapidă de extragere și purificare a ADN-ului pentru un PCR sigur. ADN-ul total (genomic, viral, mitocondrial) poate fi purificat din sânge, plasmă, ser, strat membranar, măduvă osoasă și din alte lichide sau țesuturi.

Procedura *QIAamp* este potrivită pentru lucrul cu sânge integral proaspăt sau congelat și sânge care a fost tratat cu citrat, heparină sau EDTA. Separarea prealabilă a leucocitelor nu este necesară. Purificarea nu necesită nicio precipitare cu fenol/cloroform sau alcool și implică foarte puțină manipulare. ADN-ul este eluat în tampon AE sau apă, gata pentru reacții PCR sau alte reacții enzimatice. Alternativ, poate fi depozitat în condiții de siguranță la -20°C pentru utilizare ulterioară. ADN-ul purificat este liber de proteine, nucleaze și alți contaminanți sau inhibitori.

Important înainte de a începe: toate etapele de centrifugare se realizează la temperatura camerei (15-25 °C).

Algoritmul procedurii:

- Probele se aduc la temperatura camerei.
- Se pune la încălzit o baie de aburi sau un termostat la temperatura de 56°C.
- Se echilibrează soluție-tampon AE sau apă distilată la temperatura camerei.

D) Metoda de extragere a ADN-ului fetal din lichid amniotic.

Lichidul amniotic este transferat în eprubetă sterilă de 15 ml (eprubetă de lucru).

1. Se varsă supernatantul și se păstrează „granula”.
2. Se adaugă 1 ml SSC1x, se agită.

3. Se centrifughează 5 min. la 4500 rot./min.
4. Se varsă supernatantul și se păstrează „granula”(sediment).
5. Se adaugă 1 ml SSC1x, se agită.
6. Se varsă supernatantul și se păstrează „granula”.
7. Se adaugă: 1 ml proteinază K tampon, se dezbate „granula” , 100 μl SDS (20%), 10 μl proteinaza K (25 mg/ml).
8. Se vortexează 15-20 sec.
9. Probele se incubează la 37°C peste noapte.
10. Se adaugă 300 μl NaCl 5M, se vortexează 15 sec.
11. Se centrifughează 10 min. la 4500 rot./min.
12. Se transferă supernatantul într-un tub nou de 15 ml.
13. Se adaugă 4 ml de etanol 96%, se agită ușor imediat prin răsturnarea ușoară a eprubetei.
14. ADN-ul alb ”se pescuiește” cu pipeta și se transferă într-un tub de 2 ml. În timpul acestei etape se transferă mai puțin etanol.
15. În tubul cu ADN se adaugă 1 ml etanol 70%, se centrifughează la 14.000 rot./min., se decantează cât mai mult etanol posibil. ADN-ul se usucă aproximativ 15 minute.
16. ADN-ul se dizolvă în 200 μl soluție-tampon TE (TE-Buffer), se dizolvă peste noapte, iar apoi se lasă în frigider la 4°C câteva zile. Apoi ADN-ul este depozitat în cutii special destinate pentru păstrarea ADN-ului.

2. Reactia de polimerizare în lant (PCR)

Reacția PCR (Polymerase Chain Reaction) este o metodă de amplificare enzimatică in vitro a unei anumite secvențe de ADN. În prezent s-a dezvoltat o adevărată tehnologie PCR, care este folosită într-o varietate foarte mare de domenii: biologie moleculară, științe ale mediului, criminalistică, științe medicale, biotehnologie, microbiologie, industria alimentară, epidemiologie etc.

Din punct de vedere chimic, PCR este constituită din cicluri succesive de replicare a ADN-ului în vitro, folosind 2 primeri oligonucleotidici ce hibridizează cu cele 2 catene ale secvenței originale (folosite ca matriță în replicare). Diferența esențială dintre o asemenea reacție de replicare și un proces de replicare ADN in vivo este faptul că în reacția PCR etapa de desfacere a dublului helix matriță și, respectiv, cea de atașare a primerilor nu sunt realizate enzimatic, ci prin parcurgerea unor trepte de temperatură, iar singura enzimă folosită în reacție este o ADN polimerază ADN-dependentă (cu funcție de replicază).

Principalele componente ale reacției sunt: ADN-matriță, o ADN polimerază termostabilă, primeri oligonucleotidici, deoxinucleotridifosfați (dNTP), tamponul de reacție, ioni de Mg^{2+} . O reacție PCR este formată din n cicluri (între 25 și 40), în fiecare ciclu fiind parcurse 3 etape principale:

1. denaturarea termică a matriței (deci, desfacerea dublului helix ADN);
2. atașarea primerilor;
3. polimerizarea propriu-zisă.

La terminarea unui ciclu de replicare in vitro (de amplificare), cantitatea de ADN rezultată este dublă față de matriță. Mai mult decât atât, produsele rezultate într-un ciclu sunt folosite ca matriță în ciclul următor, astfel încât numărul final de copii ADN este de $2n \cdot y$, unde y = numărul inițial de copii, iar n = numărul de cicluri de replicare. Este de subliniat faptul că moleculele acumulate exponențial reprezintă copii ale matriței, care la capete au încorporați primerii.

Prima raportare în literatura de specialitate a unui experiment de amplificare in vitro a unei secvențe ADN prin PCR a fost realizată de Kary Mullis în 1985. Ulterior, metoda a fost aplicată de către un grup de cercetători de la Departamentul de Genetică Umană de la Cetus Corporation (SUA) pentru amplificarea secvenței de ADN ce codifică globina umană și pentru diagnosticul prenatal al anemiei falciforme. Inițial, reacția PCR folosea ca replicază fragmentul mare (Klenow) al ADN polimerazei I de la *Escherichia coli*. Această enzimă era însă inactivată de temperaturile ridicate necesare etapei de denaturare a matriței. Ca urmare, la fiecare ciclu de replicare trebuia adăugată enzimă „proaspătă”. Ulterior, a fost descoperită și introdusă în reacția PCR o ADN polimerază termostabilă, izolată inițial dintr-o tulpină de *Thermus aquaticus* (bacterie termofilă izolată din izvoarele termale Yellow Spring din SUA).

Un alt pas important în dezvoltarea tehnologiei PCR a fost procesul de automatizare, care a condus la producerea în prezent a unor aparate ce desfășoară „singure” întregul proces de PCR, parcurgând toate treptele de temperatură în n cicluri.

a) **Matrița ADN.** De cele mai multe ori, într-o reacție PCR se introduc molecule de ADN linear/circular ce include secvența de amplificat. Puritya ADN-ului introdus ca matriță reprezintă un parametru important pentru succesul unei reacții PCR. De exemplu, cantități mari de ARN dintr-un extract ADN pot chelata ionii de Mg^{2+} , determinând astfel o activitate scăzută a ADN polimerazei. Totodată, o serie de contaminanți din extractul ADN pot inhiba acțiunea ADN polimerazei.

Cantitatea de ADN-matriță introdusă într-o reacție PCR influențează puternic performanța reacției. Cantitățile recomandate pentru o reacție PCR standardizată sunt: maximum 500 ng pentru ADN genomic uman, 1-10 ng ADN bacterian, 0.1-1 ng ADN plasmidial. Cantitatea ADN

trebuie însă corelată cu numărul de copii de secvență-matriță, aceasta depinzând de complexitatea moleculelor de ADN. Astfel, pentru un plasmid de 4 kbp din care trebuie amplificată o secvență de 1 kbp, secvența-matriță reprezintă 25% din ADN introdus în reacție. În timp ce, o secvență tot de 1 kbp, dar dintr-un ADN genomic uman (specia umană având un genom de aproximativ $3.3 \cdot 10^9$ bp), reprezintă doar 0.00003% din ADN introdus în reacție. Ca urmare, pentru a avea același număr de secvențe-matriță, trebuie introdusă o cantitate de aproximativ 1 milion de ori mai mare în cazul ADN-ului genomic uman. Ca recomandare generală, se pornește cu un minimum de 104 copii de secvență-matriță pentru a obține un semnal într-o reacție PCR de 25-30 cicluri, având însă grijă ca și concentrația finală de ADN în amestecul de reacție să fie mai mică sau egală cu 10 ng/μl.

b) **ADN polimeraza termostabilă.** În prezent, în toate reacțiile de tip PCR se introduc ADN polimeraze termostabile. Variantele naturale ale unor asemenea enzime au fost izolate din microorganisme termofile, care posedă echipamente enzimatică cu temperaturi optime ridicate (mai mari de 70°C) și care sunt capabile să desfășoare activitățile specifice și după treceri peste temperaturi extreme (în jur de 100°C). În marea majoritate a cazurilor, pornind de la asemenea variante naturale, ADN polimeraze termostabile au fost manipulate genetic (cu obținerea unor variante ameliorate) și clonate în tulpini de *E. coli* (microorganism ce este mult mai ușor de crescut și manipulat decât bacteriile termofile). În majoritatea experimentelor, cantitatea optimă de ADN polimerază termostabilă (sau de amestec de ADN polimeraze) este cuprinsă între 0.5 și 0.25 U/50 μl volum de reacție.

c) **dNTP (deoxinucleotidtrifosfați = dATP, dGTP, dCTP, dTTP).** Deoxinucleotidtrifosfații introduși în reacție sunt folosiți de ADN polimerază în reacția de polimerizare. În amestecul de reacție se introduc cantități echimolare din cele patru tipuri de molecule; în caz contrar, scade fidelitatea ADN polimerazei. Concentrația optimă a dNTP variază între 50 și 500 μM (pentru fiecare dNTP), valoarea cea mai uzuală fiind 200 μM. Această concentrație trebuie corelată cu concentrația Mg^{2+} . În cazul în care se dorește obținerea unor produși de reacție PCR marcați (radioactiv sau neradioactiv), se introduc dNTP marcate.

d) **Tamponul de reacție** (conține tris-hidroxi-aminometan, ca substanță amfoteră, și MgCl_2 , necesar funcționării optime a ADN polimerazei termostabile). Există și variante în care tamponul de reacție nu conține Mg^{2+} , iar acesta este livrat separat, permițând optimizarea concentrației ionilor de Mg^{2+} . Ionii Mg^{2+} formează complexe solubile cu moleculele dNTP, pentru a produce substratul propriu-zis recunoscut de ADN polimerază. Concentrația ionilor de Mg^{2+} este un factor crucial ce afectează performanța oricărei ADN polimeraze. Astfel, o serie de componente ale reacției de PCR (matrița ADN, agenți chelatori prezenți în proba de ADN – cum sunt de exemplu

EDTA sau citrații – sau diverse tipuri de proteine) pot scădea cantitatea ionilor liberi de Mg^{2+} , ceea ce conduce la o activitate slabă sau chiar inactivitate a Taq polimerazei. Totodată, excesul ionilor de Mg^{2+} reduce fidelitatea enzimei și poate conduce la creșterea amplificărilor nespecifice. Concentrația optimă de $MgCl_2$ variază între 1 și 5 mM, valoarea cea mai frecvent folosită fiind 1.5 mM (cu dNTP la concentrația de 200 μ M fiecare). Mg^{2+} influențează activitatea enzimei și crește valoarea T_m a ADN. Excesul ionilor de Mg^{2+} într-o reacție PCR poate crește atașările nespecifice ale primerilor. Din aceste motive, este necesar a determina concentrația optimă de $MgCl_2$ pentru fiecare reacție PCR. Acest lucru poate fi realizat prin prepararea unei serii de reacții ce conțin diverse concentrații de Mg^{2+} , între 1.5 și 3.0 mM Mg^{2+} (cu incremente de 0.5 mM), prin adăugarea a 3, 4, 5 și, respectiv, 6 μ l dintr-o soluție stoc de 25 mM $MgCl_2$ la amestecuri de reacție de 50 μ l. Este important de reținut că în acest caz trebuie folosit un tampon de reacție ce nu conține $MgCl_2$.

e) **Primerii oligonucleotidici.** În general, dimensiunea primerilor folosiți în reacțiile PCR este cuprinsă între 15 și 30 bp și, de obicei, aceștia sunt complementari cu capetele 5' și, respectiv, 3' ale regiunii ce urmează a fi amplificată. Se recomandă ca primerii să aibă un procent molar de guanină + citozină (% mol GC) cuprins între 40% și 60% și să aibă o distribuție echilibrată a domeniilor bogate în A/T și G/C. Este recomandabil ca cei doi primeri să aibă valori T_m care să permită temperaturi de atașare între 55°C și 65°C (pentru specificitate maximă se folosesc temperaturi de 62-65°C). De asemenea, este ideal ca cei doi primeri să aibă valori T_m identice sau foarte apropiate și să nu prezinte secvențe cu complementaritate intracatenară (și care, deci, să determine structuri secundare interne). Totodată, pentru a se evita dimerizarea primerilor, este necesar ca aceștia să nu fie complementari unul cu celalalt. În general, concentrațiile optime ale primerilor într-o reacție PCR sunt cuprinse între 0.1 și 0.6 μ M.

Într-o reacție PCR, un parametru important este temperatura de atașare a primerilor la matrița ADN („primer annealing temperature”). Astfel, în cazul primerilor cu valori de T_m ridicate poate fi crescută temperatura de atașare a lor. Acest lucru conduce la minimizarea atașărilor nespecifice, la reducerea cantității de dimeri de primeri, precum și la creșterea cantității de produs PCR corect.

Există numeroase formule pentru a calcula valorile T_m ale acizilor nucleici. Pentru determinarea corectă a valorilor T_m ale primerilor, se recomandă efectuarea reacției PCR la diverse temperaturi de atașare, pornind de la o temperatură cu 5°C mai mică decât valoarea T_m calculată.

PCR a fost efectuată în 25 μ l soluție de reacție cu compoziția:

- a. 1x tampon de reacție (67 mM Tris-HCl (pH8.8));

- b. 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20;
- c. 0,25 μM de fiecare primer;
- d. 200 μM de fiecare dezoxinucleozidtrifosfat;
- e. 1 unitate de ADN polimerază termostabilă.

Concentrația MgCl₂ în 1x tampon de reacție și temperatura se aleg individual. În ultimii ani se utilizează ADN polimeraza termostabilă (Dream Taq), dezoxinucleotidtrifosfați, primeri oligonucleotidici, clorura de magneziu, Green buffer 10X (Fermentas).

a) *Metoda PCR multiplex (MPCR) pentru gena DMD*

Pentru a efectua o căutare directă a delețiilor extinse în gena DMD, a fost elaborată o metodă foarte eficientă – Multiplex PCR cu ADN-ul izolat al probantului din celulele sangvine periferice, ale vilozităților coriale sau amniotice.

Amplificarea a fost efectuată după metoda A. Chamberlain (1988) [155], S. Abbs (1991) [68], Koieng by Beggs ș.a. (1990) [156], E.J. Ashton (2008) [157], cu modificarea pentru aparate Techne Thermal Cycler PHC – 1A (Marea Britanie) [158], Tercik (Rusia), Eppendorf (Germania). Pe baza metodelor molecular-genetice eficiente elaborate au fost realizate 20 de acte de implementare în Laboratorul de Genetică Moleculară Umană al CSRGM.

În cercetarea noastră, reacția MPCR pentru detectarea delețiilor în gena DMD, a fost efectuată în microtuburi de tip Eppendorf în amplificatorul Eppendorf MastercyclerPro, utilizând următorul program de amplificare:

- 1) 95°C – 5:00 min.,
 - 2) 94°C – 00:45 min.,
 - 3) 58°C – 00:45 min.,
 - 4) 72°C – 00:50 min.,
 - 5) 72°C – 7:00 min.
- } 33- 35cicluri

MPCR s-a efectuat în 40 μl soluție de reacție cu compoziția:

- a. 0.2 mM de fiecare dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP);
- b. 4U DreamTaq DNA Polymerase;
- c. 0.5-1 μg de ADN-matriță;
- d. 1 mM de fiecare oligonucleotid (forward primer și reverse primer);
- e. 5 μl de 10X DreamTaq™ Green Buffer, care conține: KCl, (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgCl₂;
- f. H₂O nucleaze-free pentru volumul amestecului de reacție de 40 μl.

Pentru realizarea reacției au fost testați noi primeri, organizați în 3 seturi a câte 9 exoni:

I set:	II set:	III. set:
75 (492 bp)	66 (492 bp)	32 (488 bp)

34 (439 bp)	26 (430 bp)	19 (429 bp)
12 (405 bp)	35 (403 bp)	40 (398 bp)
22 (387 bp)	13 (384 bp)	55 (383 bp)
44 (360 bp)	67 (358 bp)	17 (354 bp)
30 (344 bp)	77 (337 bp)	56 (336 bp)
7 (315 bp)	15 (310 bp)	49 (310 bp)
57 (284 bp)	70 (283 bp)	73 (281 bp)
2 (243 bp)	24 (243 bp)	69 (242 bp)

b) *Efectuarea metodei PCR pentru gena SMN*

Condițiile reacției pentru exonii 7,8, polimorfismele *D5S557* și *D5S435*: volumul total – 25 μ l. 1 μ l mostră de ADN genomic se adaugă la 24 μ l compoziție (Tabelul 2.3):

- 75 mM Tris-HCl pH=8.8;
- 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- 0.01% Tween 20;
- 1.5 mM MgCl_2 ;
- 0.25 mM de fiecare dNTP;
- 1U Taq ADN polimerază recombinantă;
- 0.65 U optice de fiecare primer.

Compoziția se prepară ținând cont de numărul probelor, înmulțind cantitatea inițială a componentelor cu numărul de probe, iar apoi la fiecare 1 μ l probă ADN se adaugă câte 24 μ l compoziție.

Tabelul 2.3. Primeri și caracteristica produșilor PCR

Locus	Primeri	Lungimea fragmentelor, pb	T ^o C hibridizarea cu primer
7 exon SMN	5'AAAGCTAATCTATAATATAGCTATCGAT 5'TCACTTTCATAATGCTGGCAGAC	150	54°C - 0,7min
8 exon SMN	5'GTAATAACCAAATGCAATGTGAA 5'CTACAACACCCTTCTCACCGG	183	58°C - 0,7min
D5S557 2AE	5'GAATGACACAGTGCAGCAATC 5'CTGGAGAACCCTAATACAATGG	148-172	57°C - 0,7min
D5S435 CVS 19	5'CAAGAGCACAGTTTGGAGTGAG 5'ACACACATGCACGCTCTCTC	128-140	58°C - 0,7min

c) *Efectuarea metodei PCR pentru detectarea duplicării în gena PMP22*

Primerii oligonucleotidici au fost sintetizați corespunzător datelor lui I. Marseliana [71] (Tabelul 2.4). Condițiile reacției au fost: volumul total – 25 μ l. 1 μ l mostră de ADN genomic se

adaugă la 24 µl 1x PCR Bufer (67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20), 0,25 µM de fiecare primer, 200 µM de fiecare 1 mM; 3,5-5 U de activitate ADN polimerază.

Tabelul 2.4. Primeri și caracteristica produșilor PCR

Locus	Marker	Consecutivitatea oligonucleotidelor 5'→3'	Lungime, pb	T °C hibridizare
MCH1A 17p11.2 gena PMP22)	17S122	F: AGAACCACAAAATGTCTTGCATTC R: GGCCAGACAGACCAGGCTCTGC	153-167	58°C
	17S921	F: GTGTTGTATTAGGCAGAGTTCTCC R: CACCATAATCATGTTCAGACAATCC	109-127	58°C
	17S839	F: CAACAACAGCGAAACTCTGTCTC R: AGACCCTGGAAGATCAACTACC	123-143	58°C

Alelele pentru markerii-microsateliți polimorfi, utilizați pentru analiza înlănțuirii genetice, au fost separate prin electroforeză în geluri PAA de natură nondenaturantă de 8% (în raport AA:bisAA = 29:1,3), cu lungimea de 20 cm, preparat din 1x tampon TBE (0,089 M tris-borat, 0,089 M acid boric, 2,0 mM EDTA). Anterior aplicării pe gel, 10 µl de material amplificat s-a amestecat cu 3 µl de soluție-tampon de aplicare, în compoziția căreia intră coloranți marcați albastru de bromfenol și xilolcianol.

În această lucrare, pentru analiza molecular-genetică s-a utilizat metoda PCR-RFLP, care permite identificarea mutațiilor genice cauzate de deleții, inserții în forma homozigotă, precum și în cea heterozigotă. Metoda constă în amplificarea unui fragment de ADN care conține situsul de mutație cercetat prin metoda PCR și digestia produsului amplificat cu o enzimă de restricție, care clivează ADN-ul în funcție de prezența/absența situsului de restricție.

Este cert că situsurile polimorfe restricționale întotdeauna reprezintă un sistem bialele, de aceea chiar și la cea mai înaltă variabilitate a acestui sit, numărul indivizilor heterozigoți după locusul dat nu va depăși 50%.

d) *Condițiile reacției pentru locii din genele MTHFR, MTR, MTRR*

PCR pentru detectarea mutațiilor din genele *MTHFR, MTR, MTRR* a fost efectuată în 25 µl soluție de reacție cu compoziția:

- a) 22 µl tampon mix (compus din: H₂O – 410 µl; crezol – 200 µl; dNTP – 100 µl; Taq 10xPCR bufer – 100 µl; MgCl₂ – 120 µl);
- b) 0,5µl de fiecare primer;
- c) 0,3 µl de ADN polimerază termostabilă.

În fiecare eppendorf s-au adăugat câte 2 picături de ulei mineral (sigma) și câte 1-1,5 µl ADN genomic, după care s-a efectuat PCR cu următorii parametri: 94°C – 3 min., 35 cicluri: 94°C – 1 min.; 60°C – 1 min.; 72°C – 1 min.; 68°C – 6 min.

Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție a fost studiat în urma restricției fragmentului amplificat cu primerii corespunzători genelor *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, cu enzimele *Mbo II*, *Hinf I*, *Nde I*, *Hae III* (Tabelul 2.5).

Tabelul 2.5. Condițiile PCR pentru genele *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* și secvența primerilor utilizați în cercetare [158]

Locus/ mutație	Consecutivitatea oligonucleotidelor 5'→3'	T °C hibridizare	Enzima de restricție
<i>MTHFR</i> (C677T)	F:TGAAGGAGAAG GTGTCTGCGGGA R: AGGCGGTGC GGTGAGAGTG	60 °C	HinfI
<i>MTHFR</i> (A1298C)	F:CTTTGCGGAGCTG AAGGACTACTAC R: CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG	61 °C	MboII
<i>MTR</i> (A2756G)	F: GGTGCCAGGTATACAGTGACTCT R: GATCCAAAGCCTTTTACTACTCCTC	58 °C	HaeIII
<i>MTRR</i> (A66G)	F: AAGGCCATCGCAGAAGACAT R: CACTTCCAACCAAATTCTTCAAAG	58 °C	NdeI

Produsul amplificării este supus digestiei cu o restrictază specifică pentru determinarea mutației. Amestecul de reacție include 10–8 μl de amplicon, 5 U de restrictază, 3 μl H₂O și 1 μl soluție-tampon pentru restrictaza dată:

10X Orange Buffer – 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl și 0.1 mg/ml BSA pH 7.5;

10X Red Buffer – 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl și 0.1 mg/ml BSA pH 8.5.

Reacția are loc la temperatura de 37⁰C timp de 12 ore, după care se efectuează electroforeza pentru vizualizarea rezultatelor.

e) *Condițiile reacției pentru locusul 4a/4b a genei eNOS*

Primerii și condițiile PCR folosite pentru analiza polimorfismului genei eNOS sunt prezentate în tabelul 2.6.

Sucesiunea primerilor utilizați a fost aleasă în baza succesiunii nucleotidice a fragmentelor de ADN utilizate, date care se păstrează în baza de date Gene Bank.

Tabelul 2.6. Condițiile PCR pentru locusul 4a/4b a genei *eNOS*

Genă/ marker	Sucesiunea primerilor, 5'-3'	Lungime, pb	T° de aliniere
<i>eNOS</i> intron 4a/4b	F: AGGCCCTATGGTAGTAGTGCCTTTT R:TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT	420 393	60 60

Restricția s-a efectuat în următoarele condiții: la 10 μl amplicon s-au adăugat 3 μl apă, 1,7 μl tampon de reacție, 0,3 μl enzimă de lucru. Restricția s-a efectuat la 37°C timp de 12 ore.

3. Efectuarea electroforezei și vizualizarea rezultatelor

Pentru a vizualiza rezultatele după amplificare, folosim diferite metode. Una dintre cele utilizate mai frecvent astăzi este metoda de electroforeză pe bază de separare a moleculelor de ADN după dimensiune sub acțiunea unui curent electric constant. În acest scop, se pregătește un gel de poliacrilamidă și se toarnă într-o cameră specială cu volumul de 40 ml. Gelul se prepară din următoarele componente: acrilamidă (29:1), soluție tampon – 10XTris-Borat-EDTA (TBE), 10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ și TEMED. În cercetare am utilizat gel de poliacrilamidă de 7.5% de lungimea 20 cm, iar în calitate de soluție-tampon am folosit 1xTBE. Gelul este turnat în camera specială și se polimerizează în ~ 15 minute.

Camera cu gel se conectează la sursa de curent electric la aparatul Serva Electrophoresis GMH (Germania). Gelul este asemeni unei site moleculare ce permite moleculelor mai mici să se deplaseze mai rapid, iar celor mai mari – să înainteze mai lent.

Rata de circulație a ADN-ului în gel este influențată de concentrația gelului de PAA, intensitatea câmpului electric, compoziția, temperatura soluției-tampon și compoziția GC al ADN-ului. Toate moleculele de aceeași mărime migrează cu viteză egală. După electroforeză, care durează de la 10 minute la câteva ore, gelul este plasat pe filtrul transiluminator, emițător de lumină ultravioletă (254, 310 nm). Lumina ultravioletă absorbită de ADN este de 260 nm, colorarea cu EtBr îl face să fie fluorescent în regiunea portocaliu-roșu a spectrului vizibil (590 nm).

Pentru a determina calitatea ADN-ului izolat, se ia o parte de acizi nucleici și se efectuează hidroliza cu enzime de restricție și electroforeza. ADN-ul este încărcat negativ, migrarea va avea loc spre polul opus, adică pozitiv. Intensitatea curentului depinde de tipul soluției-tampon, de lungimea camerei și de masa materialului cercetat, dar de obicei se află între valorile de 100-120 V. Rezultatul se vede atunci când banda de migrare se va afla la 4-7 cm de la locul expunerii probei.

În funcție de lungimea fragmentelor, s-a ales gelul corespunzător. Pentru diferențierea exonilor din gena distrofinei (Figura 2.2), locusului *D5S557*, *MTFHR 677CT*, *MTHFR 1298*, *MTR A2756G*, *MTRR A66G* (Figura 2.1), *eNOS3 4a/4b* (Figura 2.3) a fost utilizat gelul poliacrilamidic cu concentrația de 7.5%; pentru exonii 7 și 8 ai genei *SMN*, mutația *D5S435*, concentrația gelului a fost de 8%.

Pentru interpretarea rezultatelor obținute în urma electroforezei, s-au utilizat electroforeogramele din figurile ce urmează:

1. Din Figura 2.1A se observă banda de 197 pb, ce coincide cu genotipul normal (*677CC*). Prezența celor două benzi (175 și 197 pb) indică genotipul heterozigot (*677CT*). Pentru cel de-al

2-lea polimorfism (*A1298C*), genotipul normal (*I298AA*) este indicat de benzile de lungimea 56 pb, cel heterozigot (*I298AC*) – de benzile 56, 80 pb, iar cel mutant (*I298CC*) – de prezența benzilor de 30, 80 pb (Figura 2.1B) [159].

2. *MTR A2756G* – ampliconul de mărimea 501 pb este hidrolizat de restrictaza *Hae III* folosind Red Buffer. În cazul purtătorului homozigot mutant, vom observa fragmentele de 268 pb, 152 pb și 81 pb; în cazul heterozigoților – fragmentele 420 pb, 268 pb, 152 pb și 81 pb; în cazul homozigoților după alela normală – 420 pb și 81 pb (Figura 2.1C) [159].

3. *MTRR A66G* – ampliconul de mărimea 145 pb este hidrolizat de restrictaza *Nde I*, folosind Orange Buffer. În cazul purtătorului homozigot mutant, vom observa fragmentele de 127 pb și 18 pb; în cazul heterozigoților – fragmentele 145 pb și (127 pb și 18 pb); în cazul homozigoților după alela normală – 145 pb (Figura 2.1D) [159].

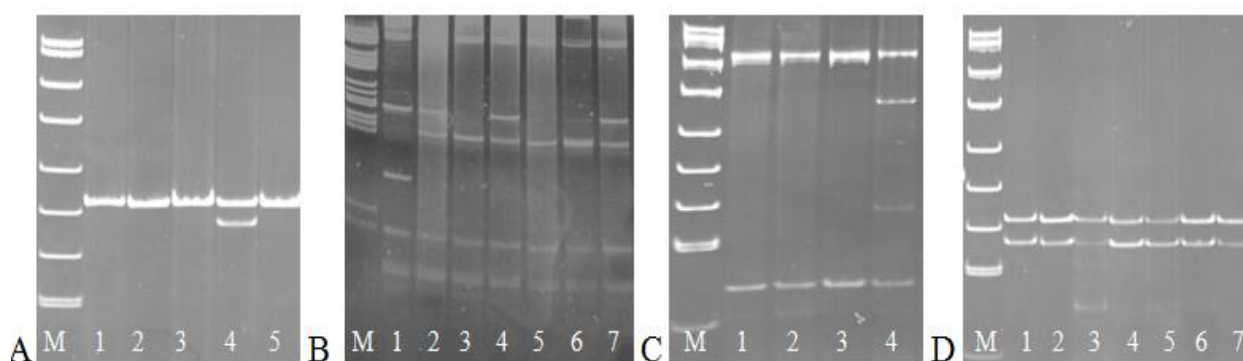


Fig. 2.1. Electroforeogramele polimorfismelor studiate

- A.** Polimorfismul *MTHFR C677T*: M – marker pUC19/MspI; 677CC - 1, 2, 3, 5 (197 pb); 677CT - 4 (175 pb și 197 pb); **B.** Polimorfismul *MTHFR A1298C*: M – marker pBR322; 1298AA - 5, 3 (56 pb); 1298AC - 2, 4, 6, 7 (56, 80 pb); 1298CC - 1 (30 și 80 pb); **C.** Polimorfismul *MTR A2756G*: M – marker pUC19/MspI; 2756AA - 1, 2, 3 (420, 83 pb); 2756GA - 4 (420, 268, 152, 83 pb); 2756GG - (268, 152, 83 pb); **D.** Polimorfismul *MTRR A66G*: M – marker O'GeneRuler DNA Ladder, pUC19/MspI (Thermo scientific); 66AA - (145 pb); 66AG - 1, 2, 4, 5, 6, 7 (127, 145 pb).

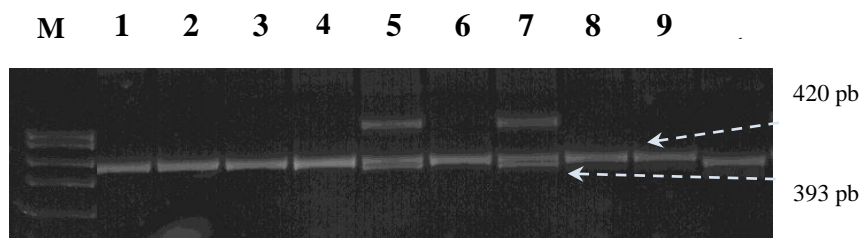


Fig. 2.2. Electroforeograma amplificării intronului 4a al genei eNOS cu primerii corespunzători

2.3. Metodele de analiză a rezultatelor obținute

Pentru calculul și compararea mărimilor cantitative, precum și pentru evaluarea veridicității rezultatelor obținute, au fost utilizate formule general acceptate din statistica variațională.

În scopul obținerii unor rezultate calitative, am determinat frecvențele în %. Pentru identificarea diferențelor dintre indicatorii calitativi, am utilizat metoda χ^2 cu corecția Yates pentru continuitate, pentru calculul căreia s-a recurs la construcția de tabele de conjugare «2x2» și «3x2». Analiza asocierii cu utilizarea testului alelic de bază și calcularea indicatorului OR (odds ratio) pentru alela minoră a fiecărui locus analizat, diferența statistic semnificativă între frecvențele alelice și genotipice ale grupurilor a fost realizată cu ajutorul formulei:

$$OR = a/b/c/d. \quad (2.1)$$

Intervalul de încredere (\hat{I}) pentru OR l-am calculat în modul următor [160]:

1. Se determină eroarea standardă m pentru logaritmul natural al OR:

$$m = \sqrt{\frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}} \quad (2.2)$$

2. Se calculează limitele \hat{I} pentru logaritmul natural al OR:

$$\hat{I}^l = \ln(OR) - t \times m; \quad (2.3)$$

$$\hat{I}^u = \ln(OR) + t \times m, \quad (2.4)$$

unde $\ln(OR)$ – logaritm natural pentru valoarea OR; \hat{I}^l – limita inferioară \hat{I} pentru $\ln(OR)$, \hat{I}^u – limita superioară \hat{I} pentru $\ln(OR)$, t – valoarea testului t , m – eroarea-standard pentru $\ln OR$.

Pentru determinarea veridicității frecvențelor alelelor, a fost utilizat criteriul lui Pearson – χ^2 . Evaluarea veridicității s-a efectuat după tabelele general acceptate. Raportul șanselor (OR – odd ratio) s-a calculat după formula-standard:

$$OR = a/b*d/c, \quad (2.5)$$

unde: a , b – numărul de bolnavi care au sau nu au genotipul mutant corespunzător; d , c – numărul persoanelor din grupul de control. OR este indicat cu 95% interval de încredere (Confidence interval – CI).

Testarea grupurilor pentru corespunderea echilibrului Hardy-Weinberg (HWE) a fost realizată utilizând testul exact al lui Fisher [161]. Principalele caracteristici ale structurii genetice a grupelor examinate se calculează după cum urmează:

Calculul alelelor genelor studiate

$$P = (2np + npq)/2N, \quad (2.6)$$

unde: N – volumul eșantionului; np – numărul de homozigoți pentru alela p ; npq – numărul de heterozigoți.

Heterozigozitatea reală (observată)

$$H_{obs} = N_0/N, \quad (2.7)$$

unde N_0 – numărul heterozigoților.

Heterozigozitatea teoretică (așteptată)

$$H_{exp} = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2, \quad (2.8)$$

unde p_i – frecvența alelei i .

Raportul dintre devierile heterozigozității reale și cele teoretice

$$F = (H_{exp} - H_{obs})/H_{exp}. \quad (2.9)$$

Prelucrarea statistică a datelor am efectuat-o cu ajutorul tabelelor electronice în Microsoft Excel, aplicațiilor StatDirect, programului on-line SISA (Figura 2.3) și www.gen-exp.ru, program de prelucrare statistică a datelor [301].

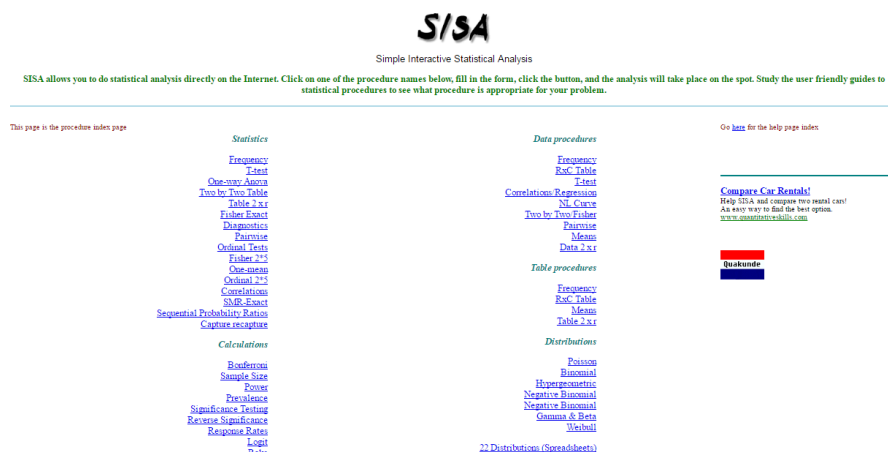


Fig. 2.3. Programul SISA [300]

Metoda regresiei logistice se utilizează pentru aprecierea particularităților dezvoltării maladiei și influenței locilor polimorfi ai genelor modificatoare asupra riscului de plasare în scaunul cu roțile în cazul miodistrofiei [302].

Cu ajutorul metodei regresiei logistice multinominale au fost create modele statistice, utilizate pentru prezicerea probabilității apariției unor evenimente, în special privind influența diferitor factori asupra perioadei de plasare în scaunul cu roțile în cazul bolnavilor cu DMD/B. În cercetarea noastră, perioada de plasare în scaun (începutul etapei a IV-a a miodistrofiei Duchenne/Becker, după Clasificarea din 2010) este considerată variabilă dependentă, iar factorii

(forța musculară la prima examinare, tipul delețiilor din gena distrofinei, genotipul genelor ciclului folat și celui metioninic) – ca variabile independente.

Este de menționat că variabila dependentă – „ *timpul de plasare în scaunul cu roțile*” – a fost clasificată în două categorii: 1 – *până la 9 ani*; 2 – *până la 12 ani*.

Variabila independentă 1 – aprecierea „*puterii musculare la prima examinare*”: mușchii biceps și triceps au fost evaluați într-un sistem de 3 puncte în timpul examinării inițiale a pacientului:

0 puncte – volumul total al mișcărilor active ale articulației, cu ușurarea greutateii membrului afectat, adesea mișcarea în plan orizontal, fără a ridica mâinile/picioarele de pe masa/patul pe care se află, cu depășirea forței de frecare cu suprafața mesei;

1 punct – mișcări totale active în articulații, cu depășirea greutateii membrelor, dar puterea musculară nu este suficientă, astfel încât, la efectuarea mai multor repetiții scurte, amplitudinea mișcărilor scade (oboseală rapidă), acești mușchi nu pot rezista opunerii mâinilor examinatorului în timpul deplasării;

2 puncte – mișcări totale active în articulații, mușchii slăbiți suportă opunerea mâinilor examinatorului; mișcarea mușchilor slăbiți este în limitele normei, dar, în comparație cu colegii sănătoși, puterea musculară a pacientului este redusă.

Variabila independentă 2 – *tipul de limită exon – intron*, în funcție de poziția în tripletul de codificare și identificarea prezenței sau absenței abaterii de la cadrul de citire – „*deleții in-frame și out-of-frame*”.

A fost efectuată analiza delețiilor independente la 171 de pacienți cu DMD/DMB și am încercat să apreciem severitatea bolii pe viitor în funcție de tipul deleției. Depistând o deleție specifică, tipul limitei exon-intronice a fost stabilit ținând cont de poziția tripletelor de codificare și am identificat prezența sau absența abaterii de la cadrul de citire după Programul „frame checking”, prezentat pe site-ul <http://www.dmd.nl/>.

Variabilele independente: 3, 4, 5, 6, 7 – „*variantele polimorfice ale genelor, testate ca modificatori, genele ciclului folat – MTHFR C677T, A1298G; sinteza metioninei – MTR A2756G, MTRR A66G și gena funcției endoteliale eNOS 4a/4b*”, care au fost împărțite în stare heterozigotă sau homozigotă.

De asemenea, a fost investigată variabila independentă 8 – „*diagnosticul clinic de DMD sau DMB*”.

La verificarea ipotezei despre factorii independenți, am folosit coeficientul de regresie și nivelul de semnificație (p-value) pentru coeficientul b (beta). Exponentul coeficientului de regresie β a fost interpretat ca raportul șanselor (OR) pentru modelul logistic la calcularea

intervalului de încredere de 95%. Diferențele au fost considerate statistic semnificative la $p < 0,05$.

Pentru cercetarea interacțiunilor intergenice, am recurs la metoda MDR (Multifactor Dimensionality Reduction). 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. Metoda MDR a fost utilizată cu scopul de modelare a interacțiunii genelor ciclului folat, metioninic (CFM) și a genei funcției endoteliale în cazul DMD/B [303].

Cercetare epidemiologică. Analiza statistică a datelor și construirea graficelor au fost realizate prin aplicarea limbajului și a mediului de programare R (www.r-project.org). Graficele privind repartiția numărului de cazuri de patologie și numărul populației din fiecare raion au fost ajustate, deoarece dependența posibilă dintre acești doi parametri nu este una liniară, ci una logaritmică. Astfel, graficul include forma logaritmată a valorilor pentru liniarizare:

pe axa OX se află numărul de locuitori exprimat prin:

$$\log(\text{populație}) = 3 + \log(\text{nr_populație}), \quad (2.10)$$

unde nr_populație este numărul de oameni ai unității teritoriale respective.

Fiecare dintre grafice include modelul dependenței liniare sub forma $Nr_cazuri \sim \log(\text{populație})$. Pentru a estima asocierea dintre acești parametri, am utilizat corelația în baza coeficientului Spearman, ρ :

$$\rho = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}}. \quad (2.11)$$

Pentru demonstrarea semnificației corelației, am calculat și valoarea p .

Datele privitoare la populația fiecărui raion reprezintă datele statistice de la Biroul Național de Statistică (www.statistica.md). Populația raioanelor, cu excepția raioanelor de Est (Transnistria), este dată pentru anul 2011. Ultimele date ale populației raioanelor din stânga Nistrului înregistrate la BNS sunt din 1997. Denumirile raioanelor au fost prescurtate pentru utilizarea lor în grafic astfel [162]:

AN – Anenii Noi	CM – Cimișlia	ED – Edineț
BL – Bălți	CN – Cantemir	FL – Fălești
BR – Briceni	CR – Criuleni	FR – Florești
BS – Basarabeasca	CS – Chișinău	GL – Glodeni
CA – Căușeni	DB – Dubăsari	HC – Hâncești
CH – Cahul	DD – Dondușeni	IL – Ialoveni
CL – Călărași	DR – Drochia	LE – Leova

NS – Nisporeni	SO – Soroca	UG – Gagauz YERI
OC – Ocnîța	SR – Sângerei	UN – Ungheni
OR – Orhei	ST – Strășeni	TN – Transnistria
RS – Râșcani	SV – Ștefan-Vodă	
RZ – Rezina	TL – Telenești	
SD – Șoldănești	TR – Taraclia	

Din cauza lipsei datelor privind populația raioanelor din stânga Nistrului, acestea au fost grupate într-o singură regiune – Transnistria (TN):

BD – Bender	TN2 – Slobozia
TH – Tiraspol	TN3 – Camenca
TN1 – Grigoriopol	RB – Râbnița

Regiunea Gagauz YERI include raioanele:

CT – Comrat
CG – Ceadâr-Lunga
VL – Vulcănești

Frecvența bolilor s-a raportat ca numărul de bolnavi la 100.000 de locuitori.

2.4. Concluzii la capitolul 2

1. Cercetarea de față include două tipuri de studii: un studiu retrospectiv de cohortă și un studiu caz-control.

2. Cercetarea s-a efectuat în patru etape. În I-a etapă a fost determinată problema studiului: scopul și domeniul cercetării. Cea de-a II-a etapă constă din colectarea și prelucrarea materialului. Apoi, în cea de-a III-a etapă, materialul colectat a fost prelucrat statistic prin intermediul programelor 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. În etapa finală au fost analizate rezultatele obținute și a fost argumentată strategia cercetării.

3. Sunt descrise materialele studiului, inclusiv mostrele de ADN ale persoanelor cercetate – 1587 de pacienți cu suspiciune la prezența patologiilor ereditare ale sistemului nervos – colectate în cadrul CSRGM în perioada 1991-2018. A fost efectuată o caracterizare generală a participanților la studiul dat. De asemenea, a fost prezentat echipamentul de laborator, au fost caracterizați reactivii, enzimele și biopreparatele utilizate. Au fost descrise detaliat metodele molecular-genetice folosite, inclusiv extragerea ADN-ului, reacția de polimerizare în lanț, electroforeza.

4. Rezultatele obținute au fost prelucrate la calculatorul personal cu ajutorul StatDirect, programului on-line SISA, www.gen-exp.ru, www.r-project.org și prin metoda neparametrică de modelare statistică MDR 3.02.

5. Luând în considerare obiectivele proiectate și centrate pe realizarea sarcinilor propuse pentru ameliorarea rezultatelor cercetării, au fost aplicate instrumente moderne de prelucrare statistică a datelor obținute. Metoda regresiei logistice a oferit informații necesare pentru aprecierea particularităților dezvoltării maladiei și a influenței locilor polimorfi ai genelor modificatoare asupra riscului de plasare în scaunul cu rotile în cazul DMD/B. Această metodă este deosebit de utilă în elaborarea modelelor predictive, prognozarea bolii, a rezultatelor posibile ale unei afecțiuni cu consecințele sale, precum și pentru estimarea frecvenței cu care se pot dezvolta afecțiunile.

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

Patologiile ereditare și congenitale formează un capitol important al medicinei contemporane. De fapt, nu există disciplină medicală și biologică ce nu ar avea relații directe sau indirecte cu bazele fundamentale ale geneticii. Genetica își are locul binemeritat în medicina teoretică și practică, în special în ceea ce vizează rezolvarea problemelor de ordin diagnostic și profilactic al patologiilor ereditate și viciilor congenitale. Ponderea semnificativă a patologiilor ereditare, în speță a retardului mintal și intelectual, reduc longevitatea medie a populației.

Patologia monogenă reprezintă baza geneticii clinice și este studiată de știința mondială de circa o sută de ani. Anul de debut al geneticii clinice este considerat anul 1902. În acest an medicul englez Harrod A., împreună cu savanții Halton F. și Bathson U., au publicat primul comunicat privind afecțiunea recesivă – alcaptonuria.

Conform datelor Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), la momentul actual sunt identificate mai mult de 300 de gene responsabile de apariția patologiilor ereditare neuromusculare (PENM) [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim]. Utilizarea metodelor de analiză a ADN-ului, direcționate spre identificarea mutațiilor în aceste gene, permite nu doar de a concretiza diagnosticul patologiei ereditare, dar și oferă posibilitatea de a identifica portajul mutației în etapa preclinică, ceea ce are o importanță principială în profilaxia PENM cu început tardiv. Consilierea medico-genetică (CMG) stă la baza profilaxiei patologiilor ereditare și poartă un caracter regional orientativ [163]. Eficacitatea acestei consilieri depinde în mare măsură de nivelul de cunoștințe despre prevalența, spectrul, particularitățile manifestărilor fenotipice ale anumitor entități clinice ale PENM, precum și de informațiile cu privire la spectrul de mutații patologice în genele responsabile pentru apariția bolilor frecvente într-o anumită regiune.

3.1. Spectrul nozologic al bolilor ereditare ale sistemului nervos

În prezent sunt cunoscute peste 20 mii de forme nozologice ale patologiilor umane, clasificarea cărora este dificilă. Dintre ei 870 sunt bolile neuromusculare, cauzate de mutații în 483 de gene diferite. În sistemul internațional de clasificare al Organizației Mondiale a Sănătății versiunea 10, maladiile genetice sunt incluse în diferite compartimente, corespunzător sistemului afectat, dar nu există un compartiment separat pentru boli ereditare. Bolile congenitale și cele ereditare, în corespundere cu metodologia general acceptată, sunt incluse fie în categoria „anomalii înnăscute” (anomalii congenitale), fie la cele corespunzătoare organelor sau sistemelor

corpului uman. Acest fapt determină dificultăți legate de estimarea cotei bolilor ereditare în populație [162].

Frecvența de detectare a anomaliilor congenitale în Republica Moldova s-a majorat în mod considerabil în ultimii ani, fapt pentru care studierea problemelor viciilor de dezvoltare reprezintă nu numai un interes științifico-teoretic, ci și un mare interes practic în planul alcătuirii criteriilor de optimizare și diagnosticare antenatală a viciilor de dezvoltare, profilaxiei și tratamentului lor [164].

În cadrul maladiilor ereditare, un loc special îl ocupă dereglările sistemului nervos, cel din urmă fiind afectat într-o anumită măsură în majoritatea patologiilor genetice – cromozomiale, metabolice ereditare, dar și în cazul altor sindroame genetice. În patologiile cu afectarea unei grupe de sisteme de organe, manifestările neurologice (de ex., dezvoltarea psihomotorie retardată, episoade convulsive epileptiforme, dereglări motorii, afectarea analizatorului vizual, analizatorului auditiv ș.a.) sunt adesea responsabile de starea gravă, gradul de invalidizare și prognosticul la acești pacienți. Numeroase forme ale retardului dezvoltării neuropsihice sunt definite de mutații genice, când sistemul nervos central (SNC) este afectat ca urmare a dereglării metabolismului substanțelor și celui energetic. În calitate de exemple ce confirmă cele relatate pot servi fenilcetonuria (PKU), unele maladii mitocondriale, peroxisomice [165], [166]. În cazul fenilcetonuriei, diagnosticul timpuriu și tratamentul adecvat previn instaurarea retardului mintal și fizic, ceea ce îi permite copilului să se dezvolte până la calitatea de membru deplin al societății și să se integreze reușit în viață [183], [181].

În fiecare an, în lume se nasc peste două milioane de copii cu boli ereditare. Cea mai mare parte din aceștia vor muri în primii ani de viață sau vor deveni invalizi. Alții vor avea nevoie de îngrijire medicală și socială constantă [167].

O particularitate a maladiilor ereditare este neregularitatea distribuției acestora în diverse populații. Cu ajutorul analizei mecanismului de repartizare a acestora, devine realizabilă planificarea activităților de profilaxie. Ținta majorității studiilor epidemiologice populaționale este elaborarea metodelor de prevenire a maladiilor ereditare. În momentul de față există câteva metode de acest fel: consultul medical genetic, diagnosticul prenatal, screeningul nou-născuților cu scopul aprecierii frecvenței maladiilor metabolice, dispensarizarea (cu consultul ulterior al medicului-genetician), regimul de control al factorilor mutageni proveniți din mediul înconjurător [168].

Pentru aprecierea structurii nozologice a grupului bolilor ereditare ale sistemului nervos (BESN) a fost efectuată analiza a 1587 cazuri de BESN, care au fost diagnosticate în LGMU al IMSP IMC de la anul 1991 până la anul 2018.

BESN constituie o parte semnificativă (2-5%) din totalul maladiilor neurologice în societatea modernă, fiind o miză majoră într-un transfer de boli monogenice și în structura patologiei neurologice, în special la copii și tineri [169]. Prevalența înaltă a BESN are multe semnificații medico-sociale ca urmare a severității, nivelului ridicat de handicap, limitării semnificative a speranței de viață, infertilității și lipsei unui tratament eficient, cu excepția unor boli individuale. Profilaxia genetică bazată pe consiliere medico-genetică are importanță deosebită [163][23].

BESN sunt caracterizate prin diversitatea extremă a entităților care au marcat eterogenitatea genetică și polimorfismul clinic, ceea ce împiedică diagnosticul clinic și

În ultimii ani, datorită progreselor semnificative în tehnologia molecular-genetică și noilor posibilități de analiză moleculară a bolilor ereditare, s-au schimbat abordările pentru consultul medico-genetic – a devenit posibil diagnosticul prenatal, preclinic și diagnosticul purtătorilor heterozigoți [170]. În acest sens, studiile epidemiologice privind BESN și crearea registrelor regionale au o relevanță deosebită pentru acordarea serviciilor medicale neurologice și genetice. În prezent, acumularea datelor cu privire la bolile ereditare neurologice este o metodă răspândită în multe țări, inclusiv cele ex-sovietice [4]. Acestea reprezintă o cotă majoră în cazul maladiilor ereditare monogenice și în structura patologiei neurologice, în special la copii și tineri [169].

Prevalența înaltă a BESN cuprinde multe aspecte medico-sociale, ca urmare a severității și nivelului ridicat de handicap, tratamentul fiind conceput doar pentru bolile individuale. Astfel, profilaxia genetică bazată pe consiliere medico-genetică capătă o importanță deosebită. Profilaxia maladiilor congenitale și ereditare începe cu ocrotirea sănătății familiei și a femeilor de vârstă reproductivă, fiindcă rolul dominant în apariția invalidității infantile aparține patologiei ereditare, congenitale și perinatale – factori ce sunt legați de concepere, purtarea sarcinii și naștere [171].

Răspândirea formelor severe ale retardului dezvoltării neuropsihice în populația Europei poate fi redată prin raportul 1:1.000 persoane, iar a formelor medii sau ușoare – de la 2% la 10%. Formele severe ale retardului mintal sunt definite preponderent de mutații cromozomiale și malformații congenitale, cota mutațiilor genice fiind sub 20% în cadrul manifestării severe a retardului dezvoltării, dar cifrele sunt mai sporite în cazul formei medii sau ușoare.

Studiul dat arată că spectrul de BESN în Republica Moldova cuprinde 18 forme nozologice, dintre care 15 sunt tradiționale pentru majoritatea populației (Tabelul 3.1).

Spectrul nozologic BESN în Moldova (Anexa 1) se bazează pe cinci grupe:

- Două grupe sunt de tipul moștenirii autozomal-dominante (AD) în cazul neuropatiei senzorial-motorii ereditare (NSME) și ataxiei spinocerebelare (SCA).

- O grupă mare este reprezentată de moștenirea recesivă X-linkată, cu miodistrofie progresivă forma Duchenne/Becker.

- Alte două grupe sunt reprezentate de tipul moștenirii autozomal-recesive (AR) – amiotrofia spinală de tipurile I-III și miopatiile progresive ale centurilor.

Ponderea maladiei neuromusculare constituie 67% pentru BESN.

Rezultatele analizei conduse au arătat că cele mai frecvente forme maladiilor neuromusculare ereditare în eșantionul de pacienți cercetat sunt: neuropatie senzorial-motorie ereditară (NSME) (n=276 – 17,39%), miodistrofie Duchenne/Becker (n=274 – 15%) și amiotrofie spinală (n=252 – 12,98%).

Tabelul 3.1. Spectrul de BESN în Republica Moldova (1991-2018), datele NSRGM.

N/o	Formele nozologice	Tipuri de ereditate	Numărul de pacienți	Cota în structura BESN, %
1.	Neurofibromatoză	AD	13	0,81
2.	Paraplegie spastică Strumpel	AD	15	0,95
3.	Distrofie miotonică	AD	28	1,76
4.	Amiotrofie spinală	AR	252	12,98
5.	Distonie de torsiune	AD	12	0,38
6.	Miastenie	sporadic	8	0,44
7.	Ataxie Friedreich	AR	17	1,07
8.	Miodistrofie Landouzy-Dejerine	AD, AR	23	1,45
9.	Ataxie spinocerebelară (SCA)	AD, AR	40	2,21
10.	Miopatii congenitale structurale	AD, AR, X-linkat	50	2,52
11.	Leicodistrofii		48	2,58
12.	Boli metabolice cu miopatii		95	3,15
13.	Miopatii mitocondriale		67	3,53
14.	Miopia centurilor	AR	160	10,08
15.	Miodistrofie Duchenne/Becker	X-linkat	274	15,00
16.	Neuropatie senzorial-motorie ereditară (NSME)	AD*, AR**	276	17,39
17.	Maladia Wilson	AR	89	4,28
18.	Fenilcetonurie	AR	120	5,48
Total			1587	

Notă: AD* – autozomal-dominant; AR** – autozomal-recesiv.

Printre maladiile menționate sunt trei grupuri de boli neurologice mai cunoscute și incluse tradițional în structura „cota de bază” sau „nucleul” BESN ale mai multor populații investigate [162].

Este important de menționat că au mai fost identificate și alte șase forme rare: mioplegii paroxistice, mio-tonia Thomsen, mio-tonia Becker, NSME AR, NSME X-linkate și amiotrofia spinal-bulbară Kennedy. Ponderea formelor rare a reprezentat 12,5% din eșantionul analizat.

Datele epidemiologice populaționale demonstrează perspectiva efectuării cercetărilor asupra unor maladii precum *miopatia centurilor*, *bolile metabolice cu dereglarea sistemului nervos*, *bolile mitocondriale* și crearea unui registru de Bolile Rare în vederea implementării metodelor noi de diagnostic molecular în R. Moldova [162].

Frecvența bolilor ereditare neuromusculare se află pe locul întâi. În literatura de specialitate autohtonă și în cea străină sunt prezentate variațiile maladiilor genetice neuromusculare, care se diferențiază după tipurile de moștenire, în funcție de severitatea simptomelor individuale și decurgerea patologiei. Cu scopul determinării formei (nivelul leziunii) maladiilor neuromusculare pentru ultimii ani, este folosită frecvent electromiografia, metodă care evaluează starea sistemului neuromuscular la bolnavi și la rudele acestora. Instituirea programelor contemporane de analiză statistică, prelucrarea datelor studiate, posibilitatea monitorizării pe termen îndelungat sunt pași care au majorat evident calitatea diagnosticului maladiilor ereditare [169].

3.2. Prevalența bolilor neuromusculare ereditare frecvent întâlnite în Republica Moldova

Pe parcursul cercetării date în centrul nostru au fost înregistrate 1078 de pacienți cu maladii ereditare neuromusculare care locuiesc pe teritoriul Republicii Moldova. Potrivit registrului familiilor cu patologii neurogenetice, a fost stabilit că patologiile ereditare neuromusculare constituie 67% din totalul BESN.

Frecvența bolilor neuromusculare în lume variază 2,4–33,8 cazuri la 100.000 de populație [31]. Frecvența sumară a bolilor neuromusculare constituie 27,2 la 100.000 de persoane. Analiza efectuată arată că răspândirea totală a patologiilor neuromusculare constituie 23,5:100000 de locuitori în RM, ceea ce corespunde cu datele din alte țări.

În funcție de gradul degenerării sistemului neuromuscular, cazurile au fost clasificate în trei categorii: distrofie musculară progresivă, atrofie musculară neurogenă (amiotrofie) și neuropatie ereditară [165]. În acest studiu au fost calculate frecvențele a celor mai răspândite

forme a bolilor neuromusculare și este făcută asocierea frecvenței întâlnirii maladiei cu mărimea și compoziția națională a populației din raioane.

Analiza diapazonul vârstei pacienților în grupa cercetată a variat de la 3 luni la 65 de ani, marea majoritate având vârsta sub 25 de ani.

La 457 de pacienți s-a înregistrat distrofie musculară progresivă, cu frecvența de $15,2 \pm 0,18$ cazuri la 100.000 locuitori. Maladiile ereditare neuromusculare din această categorie reprezintă 46% și includ pseudohipertrofia X-linkată, afectarea centurii membrului, mușchilor umăr-scapulo-faciale și oftalmoplegice. Pseudohipertrofia la copii se întâlnește mai frecvent în cazul subgrupe de miodistrofie X-linkată, ce progresează la forma Duchenne/Becker (274 bolnavi) cu frecvența $9,13 \pm 0,27$ la 100.000 locuitori care corespunde datelor de la Orphanet (4,78-15,1) (Orphanet Report Series, Jan, 2019), în Rusia - 1,35-11,23 la 100.000 persoane, conform datelor Ахмидова П., 2015. Maladia se caracterizează prin progresare continuă, cu diminuarea activității motorii grave. Creșterea concentrației de creatinkinază în sânge a fost determinată la toți pacienții, iar creșterea lactat dehidrogenazei a avut loc de 6-20 de ori, în comparație cu valorile normale [172]. Studiul EMG a indicat un nivel primar de afectare musculară. Forma benignă Becker se deosebește de cea severă prin gradul de afectare a aparatului muscular [162].

Formele *autozomale ale centurilor* sunt cel mai frecvent întâlnite la adolescenții cu moștenire autozomal-recesivă a *miodistrofiei Erb-Roth*, care actualmente se numește „limb-girdle muscular dystrophies” (LGMD). Distribuția frecvențelor în R. Moldova este de $5,3 \pm 0,61$ la 100.000, care depășește datele Orphanet (2,85) și corespunde cu datele din Rusia (1,15-5,79). Au fost depistați 160 de pacienți cu vârsta cuprinsă între 6 și 35 de ani. În majoritatea cazurilor, boala a progresat lent; cinci femei au dat naștere la copii sănătoși. Forma autozomal-recesivă de tip Leiden-Mobius a fost stabilită la trei pacienți [172]. Boala a progresat rapid și la vârsta de 7-10 ani a dus la imobilitate și dezvoltarea deformărilor [162]. Tabloul clinic se aseamănă cu cel din cazul miodistrofiei Duchenne.

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). Grupul dat este caracterizat prin polimorfism genetic și clinic. Cercetarea răspândirii atrofiei la pacienții care se aflau sub observație pe o perioadă mai îndelungată a dus la depistarea apariției mai multor tipuri de atrofii. La unele persoane a fost observat procesul de atrofiere la nivelul mușchilor faciali, al brațului și al umărului. În acest caz, primar în proces au fost implicați mușchii peronieri. În două cazuri, maladia progresează din primii ani de viață, iar în

procesul de atrofiere erau afectați mușchii faciali, ai brațelor, progresând treptat spre mușchii tipici ai toracelui/trunchiului, bazinului și până la nivelul mușchilor membrelor inferioare [172]. Maladia sporadică evoca în majoritatea cazurilor un mod autozomal-recesiv de moștenire sau de mutație spontană.

Amiotrofia spinală (SMA) s-a înregistrat la 252 de pacienți. Prevalența în populația R. Moldova constituie $8,43 \pm 0,15 : 100\ 000$ de 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. Frecvența SMA în bolile neuromusculare ereditare a fost de 12,98%. În baza rezultatelor analizelor clinice, toate tipurile de amiotrofie au fost împărțite în trei categorii: amiotrofia la copii foarte mici, amiotrofia Verdnic-Hoffmann (SMA I), amiotrofia la copii cu vârsta mai mare (SMA II), la tineri – amiotrofia Kugelberg-Welander (SMA III) [162]. În cazul copiilor și tinerilor, amiotrofia spinării s-a caracterizat prin moștenire autozomal-recesivă. La 231 pacienți cu vârsta cuprinsă între 2 luni și 5 ani a fost observată amiotrofia autozomal-recesivă Verdnic-Hoffmann tip I. Toții copiii au fost diagnosticați în primul an de viață. Maladia a progresat deosebit de rapid, astfel că nici unul dintre copii nu a început să meargă fără susținere. O mare parte din pacienți au decedat în primii ani de viață. Identificarea tipului II a amiotrofiei spinale a fost evidențiat la 17 dintre copiii cercetați. Boala a început la 2-3 ani, apoi odată cu vârsta s-a dezvoltat mai încet. Pacienții au pierdut capacitatea de deplasare individuală la vârsta de 10 ani. Amiotrofia spinală autozomal-recesivă Kugelberg-Welander (tipul III) s-a înregistrat la 4 adolescenți. Boala s-a manifestat la 4-8 ani și progresează destul de lent, evoluția clinică fiind similară cu cea din miodistrofia Erba [162].

Neuropatii senzorial motorii 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. Printre bolile ereditare neuromusculare, ponderea lor a constituit 30%. După caracteristicile clinice, electrofiziologice și genetice s-au identificat cinci forme clinice ale neuropatiei ereditare: autozomal-dominantă CMT de tip I, autozomal-dominantă și autozomal-recesivă CMT de tip II și tip III (maladia Degerina-Sotta) și forma X-linkată [162].

Totuși, în cadrul condițiilor actuale în Republica Moldova, unele analize nu pot fi efectuate și din aceste considerente, am creat parteneriate cu diferite laboratoare din străinătate, precum Departament of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, UK; „Getotek”, „Genomed” și Centrul de genetică moleculară din Moscova, Rusia ș.a.

Astfel, un exemplu de asemenea cooperare poate servi cazul unui pacient cu MDP forma Erba, căruia i s-a stabilit un nou tip de mutație în gena *CAPN3* (c.550delA (4 exon) și c.1302C>T (10 exon)) (Figura 3.1) ce nu era cunoscută la acel moment [173].

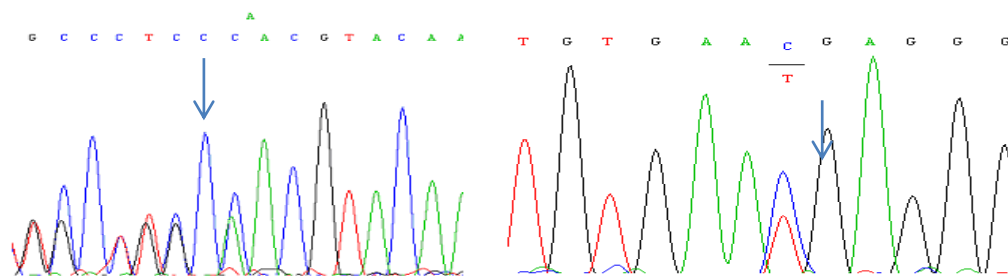


Fig.3.1. Detectarea mutațiilor (c.550delA (4 exon) și c.1302C>T(10 exon)) prin secvențiere directă [179]

În cadrul unui alt caz, au fost depistate două mutații în stare heterozigotă în exonul 10 (c.1331delCinsTCGTACCCAG) care provoacă deleția aminoacidului din poziția 444 din proteină și în exonul 13 (c.1696G>A) în cadrul genei *CAPN3*, nedescrise până la moment. Analiza a fost efectuată în parteneriat cu “Centrul Molecular Genetic” (Moscova, Rusia).

Unui alt pacient cu clinica de neuropatie moto-senzorială, nu i s-a putut depista vreo mutație din rândul celor mai frecvent întâlnite în populația R. Moldova pe care noi le analizăm. Prin secvențiere, cu utilizarea panelului “Maladii neuro-musculare”, a fost determinată mutația în exonul 11 în stare heterozigotă, descrisă anterior în gena *SH3TC2* (chr5:148406435G>A, rs 80338933), ce conduce spre apariția site-ului terminării timpurii a translației în codonul 954 (p.Arg954Ter, NM_024577.3). Totuși, a fost identificată altă mutație în stare heterozigotă c.679C>T, nedescrisă anterior în exonul 6 al aceleiași gene *SH3TC2* (chr5:148421031G>A, rs532463685), ce provoacă substituția aminoacizilor în poziția 227 (pArg227Trp, NM_024577.3). Această mutație în stare homozigotă sau compound heterozigotă împreună cu alte mutații a fost descrisă la pacienții cu maladia Charcot-Marie Tooth tip 4C (OMIM:608206.0005). Analiza a fost efectuată în parteneriat cu laboratorul de patologie moleculară „Genomed”, Rusia. În acest sens, în conformitate cu exemplele descrise, observăm că metoda secvențierii permite stabilirea diagnosticului cu o precizie înaltă.

Menționez, că prezența paneelelor de diagnostic pentru maladiile neuro-musculare, care includ 341 gene responsabile de apariția diferitor maladii ereditare, ușurează stabilirea unui diagnostic corect, în temeiul faptului că tabloul clinic la diverse patologii neuro-musculare poate fi deosebit de asemănător.

Studierea caracteristicilor genetico-epidemiologice și molecular-genetice ale bolilor neuromusculare frecvent întâlnite la populația Republicii Moldova este primul studiu de acest gen. Pentru 3 forme nozologice: DMD/B, SMA și NSME tip 1A a fost realizată asocierea frecvenței maladiei cu mărimea și compoziția națională a populației din raioane. A fost creat un sistem de monitoring și Registru Național a bolilor neuromusculare frecvent întâlnite (DMD, SMA și CMT) și Biobăncii ADN a pacienților cu acest boli din Republica Moldova. Acest registru ne-a permis să analizăm și distribuția patologiilor neuromusculare frecvente în diferite raioane ale republicii în ultimii 25 de ani.

Pe durata studiului, nu a fost posibilă determinarea cazurilor de DMD, SMA sau CMT în raioanele Basarabeasca, Vulcănești și Drochia din cauza lipsei datelor în registru [189].

În Transnistria a fost depistate un număr mai mare de cazuri de DMD și CMT, comparativ cu celelalte raioane, exceptând municipiul Chișinău.

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 (Anexa 2). 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 [162].

Cel mai mare număr de cazuri SMA a fost înregistrat în municipiul Chișinău, Transnistria, r. Soroca, r. Taraclia, UTA Găgăuzia. (Anexa 3). Explicația faptului că SMA se întâlnește mult mai frecvent în aceste raioane, ca maladie cu transmitere autozomal-recesivă, poate fi că acestea reprezintă teritorii populate de bulgari și găgăuzi, la care se poate observa fenomenul (căsătorie asortată etnică) căsătoriilor dintre membrii aceleiași etnii. Faptul dat duce la izolarea populației și, ca urmare, determină formarea structurii sale genetice.

Preponderența cazurilor CMT cu transmitere autozomal-dominantă a fost evidențiată în special în mun. Chișinău, Transnistria, Bender și Ungheni; în raioanele Ștefan Vodă, Strășeni, Soroca, Edineț, Criuleni, Cimișlia, Râbnița și mun. Bălți s-au înregistrat câte 8-12 cazuri [162] (Anexa 4).

În linii generale, a fost demonstrată existența unei legități în distribuția frecvențelor, cu excepția numărului populației în raioanele cercetate.

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, $p=0,0018-0,0047$ (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Asocierea dintre numărul de cazuri de patologii și populația în raioane [162]

Patologia	Valoarea ρ	Valoarea p
DMD	0,49	0,0027
SMA	0,50	0,0018
CMT	0,46	0,0047

Este important de menționat că, deși asocierea este medie, indicii sunt statistic semnificativi, fiind necesară utilizarea lor în studiile epidemiologice ale BESN. În acest sens, studii respective în diferite regiuni și crearea Registrului național BNME are o importanță deosebită pentru serviciile medicale neurologice și genetice. Registrul de evidență a bolilor ereditare neuromusculare, creat din 1992, care a cuprins toate datele despre cazurile diagnosticate și despre familiile cu patologie ereditară, permite utilizarea informațiilor în scopurile practice ale consilierii medicale genetice.

Rezultatele studiului spectrului nozologic al bolilor ereditare neuromusculare în Republica Moldova au făcut posibilă alcătuirea listei maladiilor pentru elaborarea și implementarea metodelor de diagnostic molecular.

În acest mod, pentru prima dată a fost demonstrată repartiția patologiilor pe teritoriul R. Moldova. S-a stabilit asocierea medie semnificativă ($\rho=0,49$, $p=0,0018-0,0047$) dintre numărul de cazuri ale patologiilor cu componența și mărimea populația raioanelor.

Astfel, generalizând rezultatele cercetării epidemiologice a fost stabilită agravarea ponderii patologiilor autozomal-recesive (SMA), autozomal-dominante (CMT 1A) și X-linkate (DMD) în dependența de raionul republicii.

Rezultatele obținute au importanță în practică medicală și pot fi aplicate în monitoringul patologiilor respective în raioane și consultul medical genetic al familiilor, inclusiv în baza diagnosticului molecular-genetic.

3.3. Caracteristica molecular-genetică a bolilor neuromusculare frecvent întâlnite.

Ultimii ani ai secolului trecut au fost marcați de progrese rapide în genetica moleculară umană. Acest lucru se datorează în principal efortului depus pentru codificarea genomului uman, efectuată în cadrul programelor naționale și internaționale. Prima versiune (proiect) a genomului uman (care a oferit informații despre structura primară a 90% din genom) a fost publicată în anul 2001 de către Lander ș.a., Venter ș.a. și a devenit clar faptul că multe idei despre caracteristicile

de organizare a genomului sunt greșite. Astfel, chiar și acest proiect de secvențiere a genomului uman a redus drastic estimarea numărului de gene în genom – cu 80%, de la sute de mii de gene la puțin peste 30.000, după datele Kisselev L. L., în anul 2000. Activitatea de secvențiere a genomului a contribuit la stabilirea unei structuri primare a ADN-ului, dar nu a fost stabilită și informația cu privire la numărul de proteine codificate de pe genele genomului uman.

O comparație a diferite baze de date cu privire la structura primară a ADN-ului și secvența exprimată a genomului uman (cum ar fi UCSC, RefSeq, Ensembl) sugerează că numărul de proteine codificate de gene este în jur de 30.000. Astfel, baza de date RefSeq (a 4-a versiune) oferă informații privind 27000 transcripții, iar baza de date Ensembl – cu privire la aproximativ 29.800 transcripții. Circa 10% din transcripții au fost reprezentate doar în una din bazele de date. În plus, este necesar să se ia în considerare faptul că nu este cunoscută funcția pentru aproximativ jumătate din toate transcripțiile descrise în prezent.

Determinarea secvenței primare a genomului uman a servit ca baza pentru dezvoltarea unor domenii ca genomica structurală și cea funcțională, care se ocupă cu analiza transcriptomului (studiul spectrului de ARNm în diferite tipuri de celule), și proteomica (studiul de recrutare a proteinei pentru diferite țesuturi) [174]. Cercetările metabolomicii – o serie de metaboliți celulari – sunt în curs de dezvoltare rapidă. Analiza comună a transcriptomului, proteomicii și metabolomicii în diferite tipuri de țesuturi și celule în timpul ontogenezei reprezintă un obiectiv principal al fazei actuale de studiere a genomului uman [65].

Genomica structurală și genomica funcțională pot fi considerate ca un analog al anatomiei și fiziologiei normale a medicinei clasice. Deci, la fel ca și în medicină, anatomia normală este baza pentru studiul anatomiei patologice și genomica structurală este baza pentru anatomia patologică a genomului – examinarea rolului în patologia umană a diferitor modificări apărute în structura genomului [175].

Prima anatomie patologică a genomului a permis identificarea și caracterizarea genelor bolilor ereditare monogenice. Rezultatele acestor studii au fost nu numai obținerea unui volum imens de informații despre mutații ce cauzează boli mendeliene, dar și dezvoltarea testelor noi eficiente ale ADN-ului, crearea și stocarea informațiilor în baze de date, pentru a păstra volume mari de rezultate.

Este evident că pentru a rezolva problema abordată era nevoie de compararea datelor obținute despre structura genomului cu cele ale genomului funcțional. Astfel, au apărut genomica comparativă (compararea structurilor omoloage în diferite gene ale speciilor de animale), genomica etnică (analiza structurală a ADN-ului reprezentărilor diverselor grupuri

etnice), farmaco-genomica (studiul se caracterizează prin organizarea genomului în metabolizarea xenobioticelor diferite, inclusiv a medicamentelor).

Numeroasele probleme apărute au condus la o creștere semnificativă a zonelor de interes în domeniul științei moleculare și în domeniul geneticii, precum și la extinderea abordărilor și metodelor sale în zonele științifice adiacente. Este vorba, în primul rând, de genetica medicală, iar întrepătrunderea acestor două domenii ale științei a condus la crearea unui domeniu nou de cercetare – *genomica medicală*.

Genomica medicală definește defectele genetice, bolile ereditare, se ocupă cu studiul genelor mutante și de dezvoltarea noilor metode de diagnostic, tratament și prevenire. În acest context, un interes special se acordă bazelor molecular-genetice ale bolilor neurologice și neuropsihiatrice multifactoriale. S-a constatat că, studiind acest grup de boli, se pot identifica și caracteriza noi gene implicate în sistemul nervos, care se exprimă în mare măsură în aspect genetic, punând bazele pentru studiul principiilor moleculare ale funcționării sistemului nervos.

A. Particularități molecular-genetice în cazul distrofiei musculare forma Duchenne/Becker (DMD/B)

Una dintre sarcinile studiului a constat în cercetarea incidenței delețiilor în gena distrofinei la bolnavii cu DMD din Republica Moldova și în analiza repartizării delețiilor în interiorul genei *DMD*. Astfel, în 60% cazuri, deleții în gena distrofinei s-au depistat la bolnavii cu DMD de sex masculin. Deleții și duplicații apar peste tot în această genă. Totuși, se depistează deleții ample de obicei concentrate în două puncte „fierbinți”: în regiunea extremității- 5' (exonii 2-20) și în partea centrală (exonii 44-55) a genei, regiuni care cuprind de la 1 până la câțiva exoni alăturați. Potrivit datelor din literatura mondială de specialitate, 30% din deleții sunt localizate în partea proximală a genei, iar 70% – în partea distală [176].

Au fost menționate particularități populaționale ale tabloului tipic al delețiilor la diferite populații europene, precum și în populația Rusiei și țărilor CSI.

În prezenta cercetare, cota depistării delețiilor la bolnavii DMD/B în R. Moldova este destul de ridicată și constituie 85% (181 din 213), ceea ce corespunde datelor cercetărilor din populația europeană, în special celor din Italia – 78% (după datele *Politano L. ș.a., 1998*), Ungaria – 73% (*Herczegfalvi A. ș.a., 1999*), Belgia (Leuven) – 81,8% (*Gert Matthijs, Annemie Meertens, 2004*), Canada – 73% (*Stockley ș.a., 2006*) [172]. Totuși, în unele populații, frecvența de detectare a delețiilor la pacienții cu DMD/B este mai mică decât în Moldova. De exemplu, în cercetările din Argentina, conform datelor datele lui *Giliberto ș.a., 2004*, au fost detectate doar 84 deleții la 174 pacienți neînruțiți (48%); în Chili, *Rocco P. ș.a.*, publică în anul 2001 date cu

privire la identificarea delețiilor extinse la 47% din pacienții cu DMD/DMB; în Coreea au fost depistate 58,6% cazuri de deleții [177]; în China, 65% din bolnavi prezentau deleții (*Lo ș.a., 2006*); în Australia – 58% (*Taylor ș.a., 2007*) [<http://www.dmd.nl/>]. În opinia noastră, indicatorul obținut în R. Moldova este relativ bun și se datorează criteriilor evidente în diagnosticul clinic și introducerii unor motoare avansate de căutare a delețiilor în cei 32 de exoni ai genei DMD (Anexa 5).

Mutațiile identificate au fost verificate în baza de date Leiden [298], care a fost creată pe data de 29 iulie 1997. Rezultatele noastre au fost comparate cu datele din actualizări, 5 august 2016 (LOVD2) și 8 decembrie 2018 (LOVD3). Această bază de date este deschisă și conține toate mutațiile publicate în literatura de specialitate [178], ceea ce le permite cercetătorilor din întreaga lume să înregistreze toate mutațiile care au fost identificate în gena *DMD*.

Prin efectuarea unei analize de cluster a tuturor exonilor delețați la pacienții cercetați, a fost determinată contribuția fiecărui exon în procesul patologic (Anexa 6). 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%). Această analiză a identificat trei picuri în partea centrală a genei (exonii 45, 47 și 48) – 6,11%, 8,55% și, respectiv, 10,08%, și picuri în regiunea exonilor 50, 51, 52, 53 (7,02%, 4,27%, 3,97%, 2,29%). Astfel, la eșantionul pacienților cu DMD din R. Moldova, la fel ca în cercetările anterioare, s-a remarcat prevalența implicării părților centrale și distale ale genei *DMD* în procesul de deleție [172].

Rezultatele analizei efectuate a delețiilor ne-au permis să identificăm deleții cu implicarea unui singur exon la 81 (44,75%) din pacienți, ceilalți aveau deleții extinse de la 2 la 45 exoni. Pacienții cu deleția unui exon au fost împărțiți în funcție de formele clinice după cum urmează: 12 (14,8%) bolnavi cu forma DMBecker și 69 (85,2%) cu DMDuchenne. Primul loc după raportul procentual îl ocupă exonul 48 (10%), urmat de exonul 47 (8,5%) și exonii 50 și 45 (7,02%, 6,11%) [172].

Analizând datele delețiilor în funcție de prezența sau lipsa schimbării cadrului de citire, au fost identificate deleții in-frame la 30 (37,0%) din pacienții examinați. În majoritatea cazurilor – la 50 pacienți (61,7%) – au fost observate deleții out of frame și într-un singur caz s-a detectat deleția în primul exon (Anexa 11). În baza de date Leiden DMD, acest tip de deleție poate avea efecte la nivel de transcripție (ARN) și translație (proteina) [172].

Este de menționat, că patru mutații nu erau înregistrate în baza de date LOVD, actualizată la 17 mai 2013, dar care au fost depistate în eșantionul de pacienți cu DMD/B din Moldova până

la acea dată. Totuși, în actualizarea din anul 2016, delețiile exonilor 3, 52, 53 și 62 ai genei DMD deja au fost introduse în baza de date.

Implicarea a doi exoni a fost identificată la 17 pacienți (9,4%), dintre care 16 cu diagnosticul DMDuchenne și unul cu DMBecker. În majoritatea cazurilor (15 pacienți – 88%) au fost detectate deleții in-frame, adică fără schimbarea cadrului de citire. Doar în două cazuri (12%) delețiile au atins cadrul de citire. Este de menționat, că în particularitățile eșantionului din Moldova se numără prezența mutațiilor neextinse, dar cu întreruperi (delețiile duble). Astfel, la 8 pacienți s-au identificat deleții în doi exoni, cu prezența mai multor exoni între cei absenți. Această situație se remarcă prin implicarea a trei și mai mulți exoni (Anexa 7). Interpretarea severității în acest caz se bazează pe prezența schimbării de cadru, adică cea mai nefavorabilă variantă. Acest tip de deleții nu era cunoscut și descris în literatură un timp îndelungat. Modificarea (double deletion) a fost descoperită de cercetătorii din India abia în 2010, [179], [180]. Deleții duble au fost identificate la doar 16 pacienți din RM, ceea ce constituie 8,8% din totalul delețiilor identificate.

Deleții a trei exoni în gena *DMD* s-au observat la 23 pacienți (10,3%), dintre care 18 băieți (74%) cu diagnosticul DMD și 6 băieți (26%) cu forma benignă – DMB. 16 deleții au fost identificate ca fiind out of frame (schimbarea cadrului de citire), celelalte 8 deleții fiind in-frame (Anexa 7). Toate delețiile identificate în eșantionul pacienților din Moldova sunt descrise în baza de date Leiden. Este de remarcat polimorfismul clinic al celei mai numeroase grupe de bolnavi cu deleția exonilor 45-47. Deși acest tip de deleții este descris ca fiind fără schimbarea cadrului de citire, la trei pacienți din opt se presupune o formă malignă.

La 12 (6,1%) pacienți cu DMD/B a fost identificată deleția a patru exoni. În cea mai mare parte, aceștia erau bolnavi cu DMD. În patru cazuri ei prezentau deleții in-frame, în opt cazuri s-au observat deleții cu schimbarea cadrului de citire (Anexa 7).

La șase (3,3%) persoane a fost identificată deleția a cinci exoni. La trei copii s-a observat forma DMD malignă, cu invaliditate timpurie, și doar la un bărbat cu DMB s-a menținut mișcarea independentă până la vârsta de 45 de ani. La două persoane din șase s-au observat deleții out of frame. Aceste exemple de discrepanță între tabloul clinic și tipul deleției demonstrează lipsa valabilității „teoriei cadrului de citire” la unii pacienți, ceea ce indică necesitatea căutării factorilor genetici care posedă anumite efecte asupra progresării procesului miopatic. Toate aceste mutații sunt descrise în baza de date Leiden.

La 11 bolnavi a fost stabilită deleția cu implicarea a șase exoni, toți fiind diagnosticați cu DMD. Analizând tipul delețiilor, în trei cazuri au fost identificate deleții fără schimbarea cadrului de citire și în opt cazuri – schimbarea cadrului de citire.

Deleția a 14 exoni (ex08ex21del > c.650-?_2803+?del) a fost identificată în R. Moldova și confirmată prin metoda MLPA (Germania). Această deleție în frame se presupune a fi benignă.

Cu toate acestea, trebuie remarcată mulțimea de variante rare* identificate în grupul pacienților din Moldova (Anexa 7). Mai jos enumerăm delețiile descrise în baza de date Leiden (LOVD v 2.0), ultima actualizare din 5 august 2016, în secțiunea „variante rare”:

- ✓ Deleția a 9 exoni (ex44ex52del -> c.6291-?_7660+?del) în gena distrofinei, cu schimbarea cadrului de citire, a fost observată la un băiat cu evoluție severă a bolii DMD și deces la 13 ani.
- ✓ Deleția a 10 exoni (ex44ex53del -> c.6291-?_7872+?del), cu schimbarea cadrului de citire, a fost identificată la doi pacienți neînruțiți cu o formă dificilă a DMD.
- ✓ Deleția a 16 exoni (ex45ex60del -> c.6439-?_9084+?del), care cuprinde regiunea distală a genei, a fost identificată la un copil.
- ✓ Deleția a 13 exoni (ex31ex43del -> c.4234-?_6290+?del) cuprinde partea centrală a genei (out of frame), identificată la doi frați, unul dintre ei a fost plasat în scaunul cu roțile la 8 ani și a decedat la 15, celălalt la 12 ani încă mergea la corecție metabolică
- ✓ O deleție extinsă, nedescrisă, cu implicarea a 20 exoni (ex01ex19del -> c.-244-?_2380+?del), a fost identificată la un băiat de șase ani [172]. Analiza mutației a evidențiat dificultăți în prognozare, din motivul implicării fragmentului de inițiere a transcripției.
- ✓ Deleția ce cuprinde 46 exoni – de la 1 până la 45 (ex01ex45del -> c.-244-?_6614+?del) – a fost detectată la doi verișori; este greu de presupus severitatea din cauza implicării în proces a începutului genei (exonul 1) [172]. Această mutație a fost confirmată în laboratorul din Marea Britanie.

În baza de date LOVD3 de la 8 decembrie 2018 [298] 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 (Anexa 7).

În anul 2018, datorită cooperării internaționale, pacienților la care nu au fost găsite deleții prin metoda MPCR, am reușit să realizăm o secvențiere a 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.5697del, p.Lys1899Asnfs*2). Într-un caz, s-a găsit o microdelecție în exonul 15 (c .1716_1738de (p.Ser572Argfs * 12). A fost găsită și o duplicație lungă de la exonul 8 până la exonul 17. Frecvența mutațiilor punctiforme astfel constituie 2,4%.

Având în vedere recomandările actuale privind diagnosticul DMD [153] și echipamentul modern al Laboratorului de Genetică Medicală Umană din R. Moldova, s-a decis efectuarea secvențierii genei *DMD* în scopul confirmării diagnosticului și elaborarea unui algoritm de cercetare (Anexa 10).

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 noastră), apoi până la 36 (*E.J. Ashton*), sporind astfel rata de identificare a delețiilor de la 78,4% până la 85%.

Rezultatele cercetărilor molecular-genetice proprii au arătat că la bolnavii cu DMD/B din Moldova predomină deleții egali sau mai mult de 2 exoni (46,95%) și deleții out-of-frame (61,7%), sunt prezenți 6 deleții rare (2,8%), mutațiilor punctiforme (2,4%) și 4 deleții, care nu sunt descrise în baza de date DMD – LOVD v3.0; și 16 deleții duble (7,5%), tot nedescrise în baza de date DMD. Procentajul delețiilor egali sau mai mari de 1 exon în eșantion cercetat constituie 84,98%, ce este diferit de la datele, publicate anterior (*Bladen ș.a., 2015*) care au raportat rata delețiilor egale sau mai mari de 1 exon ca 68%. 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.

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

Pentru a evalua posibilitățile de efectuare a analizelor de linkage genetic (diagnostic indirect), am investigat frecvențele alelelor locilor polimorfi *D5S557* și *D5S435* din gena *SMN* în populația sănătoasă și în grupul de cercetare.

• *Analiza polimorfismului locusului D5S557. Caracteristica incidenței alelei în grupul de control și în familiile cu SMA.* Una dintre sarcinile lucrării noastre a fost studierea polimorfismului locilor *D5S557* și *D5S435* în grupul de control, pentru a estima răspândirea acestui fenomen în populația sănătoasă a Republicii Moldova [181].

Pentru diferențierea polimorfismului alelic al locusului *D5S557*, ne-am bazat pe datele obținute în Federația Rusă privind polimorfismul în grupul de control (Tabelul 3.3) [181].

Tabelul 3.3. Incidența alelei D5S557 [181]

Alele	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
Grupul de control Republica Moldova, %	3,23	51,61	43,54	1,61
Federația Rusă, %	2,5	42,5	53,3	1,7
χ^2	3,98			

Notă: A₁ – alelă cu lungimea 148 pb, A₂ – alelă cu lungimea 160 pb, A₃ – alelă cu lungimea 166 pb, A₄ – alelă cu lungimea 172 pb.

În scopul determinării incidenței alelei au fost investigate 40 de mostre de ADN ale persoanelor sănătoase (grupul de control – pe 80 cromozomi neînruđiți). Incidența alelei a fost calculată din raportul numărului de cromozomi polimorfi față de numărul total de cromozomi neînruđiți [181]. Astfel, analiza efectuată a evidențiat o diferență statistic veridică între grupul de control și populația Rusiei (df=3, p=0,05).

Luând în calcul repartiția alelică, a fost calculată incidența posibilă a genotipurilor locusului D5S557 în grupul de control și în populația Federației Ruse (Tabelul 3.4).

Analiza incidenței genotipice a evidențiat o diferență statistic veridică în grupul de control între incidența reală și cea teoretică (df=9, p=0,001). În același timp, în acest grup lipseau patru genotipuri (A₁A₁, A₄A₄, A₁A₄, A₂A₄). Alela A₂ era dominantă în grupul de control și se întâlnea cu frecvența de 51,61%.

Tabelul 3.4. Incidența genotipurilor locusului D5S557 [181]

Genotip	A ₁ A ₁	A ₂ A ₂	A ₃ A ₃	A ₄ A ₄	A ₁ A ₂	A ₁ A ₃	A ₁ A ₄	A ₂ A ₃	A ₂ A ₄	A ₃ A ₄
R. Moldova:										
Inc. reală, %	0	38,70	32,63	0	3,22	3,22	0	19,35	0	3,22
Inc. teoretică	0,1	26,63	18,96	0,02	3,33	2,81	0,1	44,94	1,66	1,40
χ^2	0,1	5,48	5,34	0,02	0,003	,05	0,1	14,57	1,66	2,36
Federația Rusă:										
Inc. teoretică	0,06	18,06	8,40	0,02	2,12	2,66	0,08	45,3	1,14	1,81

Cu scopul studierii polimorfismului alelic D5S557 în familiile cu SMA, a fost efectuată reacția PCR pentru 15 mostre de ADN al bolnavilor cu SMA neînruđiți.

Incidența alelei A₁ a fost identificată la 3 (10%) persoane, a alelei A₂ – la 46%, A₃ – 40%, iar a alelei A₄ – la 3,33%. Având în vedere repartiția frecvențelor claselor genotipice în populație, se poate spune că frecvența homozigoților corespunde frecvenței alelice (Tabelul 3.5).

Deosebiriile dintre frecvențele alelelor sunt statistic veridice: $\chi^2=14,83$, df=3, p=0,001.

Tabelul 3.5. Incidența alelelor locusului D5S557 la bolnavii cu SMA [181]

Locusul D5S557	Alele			
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
Numărul depistat	3	14	12	1
%	10	46,66	40	3,33
Frecvența alelelor	0,1	0,47	0,40	0,03
χ^2	13	0,55	0,4	0,88

Frecvențele probabile au fost comparate cu rezultatele obținute privind aceste genotipuri (Tabelul 3.6).

Așadar, putem trage următoarea concluzie: incidența alelei A₂ este mai mare decât incidența alelelor A₁, A₃, A₄ de 4,7; 1,17 și 14 ori (alela A₂ este dominantă la bolnavii cu SMA) și, respectiv, se poate deduce ideea despre asocierea prezenței alelei A₂ cu SMA. Frecvența teoretică a heterozigoților în populație constituie 59,6%, ceea ce indică o informativitate înaltă a acestui polimorfism.

Tabelul 3.6. Frecvențele genotipice ale membrilor familiei probandului [181]

Indici	A ₁ A ₁	A ₂ A ₂	A ₃ A ₃	A ₄ A ₄	A ₁ A ₂	A ₁ A ₃	A ₁ A ₄	A ₂ A ₃	A ₂ A ₄	A ₃ A ₄
Numărul depistat	1	6	3	0	3	0	0	11	1	1
%	3,8	23,1	11,5	0	11,5	0	0	42,3	3,8	3,8
Ind. teoretic,%	1	22	16	0,9	9	8	0,6	38	2	2
Frecvența alelelor	0,1	0,47	0,40	0,03						
χ^2	7,84	0,06	1,26	0,9	0,69	8	0,6	0,48	1,62	1,62

• *Analiza polimorfismului D5S435. Caracteristica incidenței alelei în grupul control și în familiile a căror membri suferă de SMA.* Următoarea sarcină a lucrării noastre a constat în studierea polimorfismului D5S435 în grupul de control și la membrii bolnavi ai familiilor incluse în studiu.

În scopul studierii polimorfismului alelic D5S435, în grupul de control au fost investigate 28 de persoane (în total 56 cromozomi neînruđiți). Incidența alelelor F₁ (128 pb), F₂ (130 pb), F₃ (132 pb), F₄ (134 pb), F₅ (136 pb), F₆ (138 pb), F₇ (140 pb), F₈ (142 pb), F₉ (144 pb) s-a calculat din raportul numărului de cromozomi polimorfi față de numărul total de cromozomi neînruđiți; ea alcătuiește respectiv 0,18; 0,017; 0,00; 0,017; 0,25; 0,071; 0,375; 0,071; 0,017 [181].

Având în vedere repartiția incidenței claselor genotipice în populație, se poate conchide că frecvența homozigoților corespunde frecvenței alelei. Frecvența heterozigoților, calculată după

formula Hardy-Weinberg, constituie 0,7536, adică 75,36%, ceea ce indică o informativitate înaltă a acestui polimorfism pentru identificarea purtătorilor heterozigoți și pentru diagnosticul prenatal (Tabelul 3.7).

Tabelul 3.7. Incidența alelelor locusului D5S435 [181]

Locus	Alele	Grupul de control (MD)	GC (Rusia)
D5S435	F ₁	0,18	0,26
	F ₂	0,017	0,008
	F ₃	0,00	0,004
	F ₄	0,017	0,005
	F ₅	0,25	0,24
	F ₆	0,071	0,06
	F ₇	0,375	0,37
	F ₈	0,071	0,08
	F ₉	0,017	0,04
χ^2	7,96		

Rezultatele obținute au arătat o discordanță neînsemnată între frecvențele polimorfismului alelic în grupul de control din Republica Moldova și în populația din Rusia. Au fost stabilite diferențe statistic veridice între incidența alelelor polimorfe ale locusului dat cu cel din populația rusă ($\chi^2=7,96$, $df=8$, $p=0,05$) [181].

Datele obținute de noi referitor la incidența genotipurilor după locusul D5S435 în grupul de control denotă, în primul rând, predominarea genotipului F₅F₇ (21,42%) (Tabelul 3.8).

Astfel, analiza locusului D5S435 efectuată în grupul dat a evidențiat diferențe statistic veridice în incidența locusului D5S435 și a stabilit predominarea genotipului F₇F₇. În acest grup alela F₇ este dominantă (37,5%).

Tabelul 3.8. Incidența genotipurilor în locusul D5S435 în grupul de control

Indici	F ₁ F ₁	F ₂ F ₂	F ₃ F ₃	F ₄ F ₄	F ₅ F ₅	F ₆ F ₆	F ₇ F ₇	F ₈ F ₈	F ₉ F ₉	Heter.
Numărul depistat	1	0	0	0	1	1	4	1	0	20
%	3,57	0	0	0	3,57	3,57	14,28	3,57	0	71,42
Ind. teoretic, %	3,24	0,03	-	0,03	6,25	0,5	14,06	0,5	0,03	75,36
Frecvența alelelor	0,18	0,017	0,00	0,017	0,25	0,071	0,375	0,071	0,17	
χ^2	0,03	0,03	0	0,03	1,42	18,8	0,003	18,8	0,03	0,2

Incidența alelei F₇ a constituit 30%, F₅ – 30%, F₄ – 15%, F₃ – 5%, F₁ – 20%. Astfel, frecvența alelelor este, respectiv, egală cu 0,3; 0,3; 0,15; 0,05; 0,2 (Tabelul 3.9).

Interpretând datele obținute, putem concluziona că incidența alelei F_7 este egală cu incidența alelei F_5 . În familiile cu bolnavi de amiotrofie spinală, cel mai frecvent genotip este F_7F_7 , care constituie 14,3%. Frecvența teoretică a heterozigoților în populație este de 75,36%, ceea ce indică o informativitate înaltă a acestui polimorfism pentru identificarea purtătorilor heterozigoți și pentru diagnosticul prenatal.

Tabelul 3.9. Incidența genotipurilor în locusul D5S435 la bolnavii cu SMA

Locusul D5S435	F₁	F₂	F₃	F₄	F₅	F₆	F₇	F₈	F₉
Numărul depistat	4	0	1	3	6	0	6	0	0
%	20	0	5	15	30	0	30	0	0
Frecvența alelelor	0,20	0	0,05	0,15	0,30	0	0,30	0	0
χ^2	19,51								

A fost investigat polimorfismul alelic pe cromozomii la grupul bolnavilor și cei grupul control. La compararea repartiției frecvențelor alelelor polimorfe de pe cromozomii ce poartă mutații în gena *SMN* și pe cromozomii fără mutații, s-au evidențiat deosebiri considerabile. Conform datelor expuse în Tabelul 3.10, frecvența alelei A_1 pe cromozomii din grupa bolnavi este de aproape trei ori mai mare decât cea de pe cromozomii din grupa control (10% versus 3,33%).

În locusul D5S435, frecvența alelei F_4 de pe cromozomii cu mutații în gena *SMN* este de aproape nouă ori mai mare decât cea de pe cromozomii fără mutații în gena *SMN* (15% versus 1,7%). Astfel, din cele expuse se poate trage următoarea concluzie: deosebirile indicate mai sus permit, în cadrul diagnosticului indirect al familiilor cu SMA, de a stabili asocierea unei anumite alele cu maladia și a efectua monitoringul moștenirii acestei alele mutante în familii (Tabelul 3.10) [181].

Tabelul 3.10. Datele privind polimorfismele alelice [181]

Loci	Alele	Grupul control, %	Grupul bolnavi, %
D5S557	A_1	3,23	10
	A_2	51,61	46,66
	A_3	43,54	40
	A_4	1,61	3,33
D5S435	F_1	18	20
	F_2	1,7	0
	F_3	0	5
	F_4	1,7	15
	F_5	25	30
	F_6	7,1	0
	F_7	37,5	30
	F_8	7,1	0
	F_9	1,7	0

Căutarea directă a delețiilor extinse în gena SMN1.

În corespundere cu schema determinării naturii genetice a maladiei într-o familie anume și având în vedere frecvența ridicată a delețiilor exonilor 7 [95] și/sau 8 [182] ai genei *SMN1* la bolnavii cu SMA I-IV, a fost efectuată analiza acestei mutații la pacienții cu forme tipice sau atipice de SMA. În acest scop am utilizat o variantă a metodei de detectare a mutației date, elaborată în cadrul Laboratorului de diagnostic la nivel de ADN al Centului de Genetică Moleculară din or. Moscova, Federația Rusă [15].

Identificarea delețiilor extinse prin metoda PCR-RFLP a fost efectuată la 142 bolnavi cu SMA din Republica Moldova, fiind depistate: deleția exonului 7 la 86 (60%) bolnavi, deleția exonului 8 – la 75 (52%) bolnavi. Datele lui Syed Shafia Aalam ș.a., publicate în anul 2018 arată că la nivel mondial, deleția exonului 7 este prezentă cu rata de la 32 până la 100% de pacienți. Datele noastre sunt similare cu cele primite de Glotov ș.a. în 2001 (65%). Prin urmare, deleția exonului 7 este mai frecventă decât deleția exonului 8 în populația Republicii Moldova. Totuși, în populația iraniană frecvența deleției exonului 8 este mai mare și constituie 70%, însă în același timp este mai mică decât frecvența deleției exonului 7 (90%), iar frecvența delețiilor duble constituie 18% după datele Seyed Reza Kazemi Nezhad, 2011.

Delețiile exonilor 7 și 8 a genului *SMN1* concomitent au fost depistate la 40 de pacienți (28%) din Republica Moldova. În populația indiană, datele Rashna S. Dastur, 2006 sugerează că nu au fost depistate delețiile izolate ale exonului 8. Eficiența utilizării diagnosticului direct – căutarea delețiilor exonilor 7 și 8 la pacienții cu SMA – în R. Moldova este de 85,0% [172]. În cazul familiilor informative, după deleții e posibilă efectuarea diagnosticului prenatal prin metoda directă. Pentru familiile complet informative e posibilă efectuarea diagnosticului prenatal atât prin metode directe, cât și prin metode indirecte (Figura 3.10) [183].

Astfel, luând în considerare rezultatele obținute, putem concluziona: algoritmul investigațiilor moleculare selectat de noi permite determinarea informativității în 85% cazuri și, respectiv, efectuarea diagnosticului prenatal în aceste familii.

Așadar, procentul de identificare a delețiilor exonilor 7 și 8 ai genei *SMN1* la pacienții cu amiotrofie spinală din Republica Moldova constituie 85%, ceea ce corespunde cu datele internaționale [184], iar locusurile D5S435, D5S435 sunt informative în populația Republicii Moldova. La 28% de pacienții din Republica Moldova este găsită deleția concomitentă a exonilor 7 și 8 în gena *SMN1*, fapt ce diferă la populațiile iraniene sau indiene. 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 în cazul neuropatiilor senzorial-motorii ereditare tip IA (boala Charcot-Marie-Tooth)

Cercetarea a fost efectuată pe 106 mostre de ADN ale bolnavilor cu NSME și ale membrilor familiilor acestora. Pacienții proveneau din 79 de familii din Republica Moldova.

Neuropatiile senzorial-motorii ereditare reprezintă o grupă genetic omogenă a maladiilor ereditare ale sistemului nervos. La baza lor se află afectarea multiplă a nervilor motorii și senzitivi periferici [185]. Maladiile din această grupă se clasifică în funcție de tipul de ereditate, particularitățile clinice, gravitatea evoluției și caracterul modificărilor electromiografice și histomorfologice [186].



Fig.3.7. Bolnavă de CMT (picioare de cocoș) [experiență personală] [186]

Semnele majore ale afecțiunii la pacienții incluși în studiu au fost: slăbiciuni cu evoluție lentă și atrofia musculaturii segmentelor distale preponderent ale membrilor inferioare, formarea „picioare de cocoș”, formarea „picioare cav” (pes cavus), modificarea specifică a mersului (stepaj) și diminuarea sau dispariția reflexelor tendinoase ahilian și carporadial (Figura 3.7) [186].

În grupul de studiu, maladia s-a manifestat în medie la vârsta de $12,2 \pm 6,3$ ani. Toți pacienții au avut dereglări ale sensibilității superficiale (mecanice și termice) în segmentele distale ale membrilor.

Subtipurile patologiei CMT cu mod autozomal-dominant de transmitere sunt formele cele mai des întâlnite din toate subtipurile patologiei. Analiza eredocolaterală în selectarea dată a evidențiat în 56% cazuri modul autozomal-dominant de moștenire.

Pentru analiza înlănțuirii cu locii autozomali-dominanți cunoscuți ai NSME s-au folosit markerii-microsateliți (Tabelul 3.11) înalt polimorfi, strâns înlănțuiți cu locusul cartat NSME 1A 17p11.2-p12 (PMP22).

Tabelul 3.11. Caracteristica markerilor analizați [186]

Locus	Localizarea cromozomială	Markerii flancați	Coordonatele	Markerii analizați	Coordonatele
NSME 1A	17p11.2-p12	D17S921 D17S122	36.14 cM 41.12 cM	D17S921 D17S839 D17S122	36.14 cM 37.80cM 41.12cM

În 1989 au fost obținute date privind cartografierea locusului NSME 1A în regiunea pericentromerică a cromozomului 17 [187]. Ulterior, s-a demonstrat că la baza patogenezei NSME 1A se află restructurarea cromozomială submicroscopică – duplicarea tandemă cu dimensiunea de 1,5 mil. pb pe cromozomul 17p11.2-p12 [188]. S-a constatat că deleția reciprocă a aceluiași fragment de ADN duce la neuropatie ereditară cu predispoziție spre paralizii, cauzată de comprimarea nervilor (HNPP) [186].

Fragmentul ADN duplicat în cazul NSME 1A include genele codificatoare ale proteinei mielina periferică *PMP22* (peripheral myelin protein-22). Mutațiile missens în gena *PMP22* la cobaii Trembler și Trembler provoacă apariția neuropatiilor demielinizante, cu formarea „capului bulbar” specific din celulele Schwann, similare cu NSME 1A umană [189]. În virtutea acestora, Vance (1991) a presupus că ar putea fi vorba de aceeași afecțiune. Totodată, în aceeași categorie cu NSME 1A a fost constatată mutația punctiformă în gena *PMP22*, similară cu cea depistată la cobaii Trembler [116]. Acest fapt a confirmat ipoteza că anume gena *PMP22* este responsabilă de NSME 1A. În această ordine de idei, menționăm că două mecanisme diferite – modificarea dozei genei și mutația punctiformă – pot duce la același fenotip [190].

Incidența duplicațiilor în gena *PMP22* (17p11.2-p12) la bolnavii cu NSME IA din R. Moldova constituie 69%. Potrivit diferitor autori, acest indicator variază de la 34,3% (Spania, Barcelona) până la 85% (Israel) [172]. Datele Consorțiului european de investigare a bolii Charcot-Marie-Tooth arată că duplicația *de novo* se constată la 76,5% din pacienți cu NSME IA, părinții cărora nu au avut semne clinice și EMG de neuropatie, iar deleția *de novo* este cauza a 86% din cazurile sporadice de HNPP.

Incidența înaltă a apariției *de novo* a duplicației HNPP sau a deleției în caz de NSME 1A, precum și aceeași dimensiune a porțiunii duplicate sau deletate în majoritatea absolută a cazurilor, au sugerat ideea despre existența anumitor capacități specifice ale genomului. Cartografierea fizică a domeniului respectiv al cromozomului 17 a dus la depistarea a două porțiuni înalt omoloage cu dimensiunile de circa 30 mii b.p. [185]. Acestea reprezintă succesiuni palindromice extragenice (NSME 1A – REPs, *receptive extragenic palindroms*). Două REPs au flancat o regiune cu dimensiunile de 1,5 mil. b.p., duplicată în caz de NSME 1A și deletată în caz de HNPP [185].

Rolul REPs în restructurările cromozomiale a fost demonstrat anterior la procariote. Omologia dintre NSME 1A – REPs distală și proximală constituie 98%. Astfel, probabil, cauza apariției NSME 1A-duplicației/HNPP-deleției constă în încrucișarea cromozomială (*crossing-*

over) inegală, care are loc în meioză, în urma împerecherii eronate dintre cromozomii omologi ai NSME 1A – REPs distale și proximale (Figura 3.8) [117].

Secvențierea ulterioară a porțiunii ce aderă la „punctul-limită” al recombinării în NSME 1A-duplicației (HNPP-deleția) a permis depistarea în regiunea respectivă a elementului *mariner* inactiv transpozon-asemănător [185]. Se presupune că elementul dat poate servi în calitate de sit al transpozazei active sintetizate din alte elemente transpozon-asemănătoare active existente în genomul uman [186].

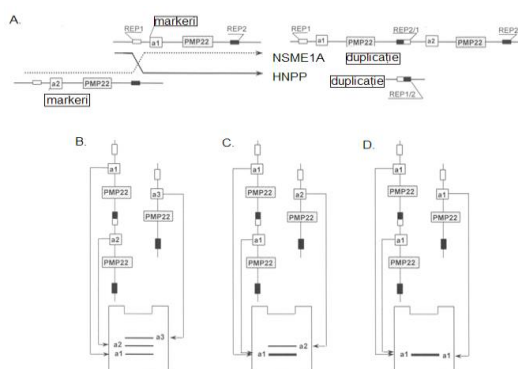


Fig. 3.8. Geneza NSME A-duplicație și HNPP-duplicație în urma încrucișării cromozomiale inegale B-D. Diagnosticul NSME A prin metoda analizei numărului de copii ale markerilor polimorfi în regiunea duplicației [186]

Gena *PMP22* (ale cărei mutații sunt asociate cu NSME) este localizată pe cromozomul 17, codifică proteina mielina periferică. *PMP22* se exprimă în celulele Schwann ale sistemului nervos periferic (SNP), acest produs constituind 2-5% din totalul mielinei periferice [191].

Analiza markerilor *DI7S921*, *DI7S122* și *DI7S839* la pacienții incluși în studiu a evidențiat următoarea frecvență: 23,88% duplicații pentru locusul *DI7S921*, 32,83% pentru locusul *DI7S122* și 24,62% pentru locusul *DI7S839* [172]. De asemenea, s-a constatat că unul și același individ poate avea mutații în doi loci [186], frecvența depistării duplicației la pacienții din Republica Moldova este de 69%.

În figura 3.9 este reprezentată electroforeograma uneia dintre familiile cercetate, M. Indivizii (numerele 2, 3, 4) sunt purtători a duplicației în locusul dat.

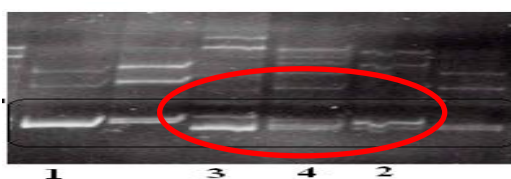


Fig. 3.9. Determinarea prezenței duplicației genei *PMP22* la membrii familiei M. cu NSME 1A [186]

În concluzie, frecvența duplicației în gena *PMP22* (17p11.2-p12) la pacienții din Republica Moldova este de 69%, mai frecvent decât în Coreea (46,9%), Italia (57,6%), Australia (60,7%), Japonia (23,3%), Marea Britanie (28,2%), Statele Unite (51,6%), Rusia (53,6) (Rune Oestern, 2013).

3.4. Diagnosticul prenatal al maladiilor neuromusculare (DMD/B și SMA) în Republica Moldova. Studiul retrospectiv și prospectiv al metodelor utilizate în diagnosticul prenatal

Bolile genetice înainte erau considerate rarități, cu care practicianul se confrunta întâmplător în cursul activității sale. Actualmente tehnologiile de studiu și cunoștințele în genetică au progresat. A devenit evident impactul patologiei genetice în practica medicinei moderne. Bolile genetice sunt numeroase, se cunosc peste 10.000 de boli determinate genetic, ele au o mare diversitate, se manifestă la orice vârstă, la orice sistem de organe și, de aceea, se regăsesc în aproape toate specialitățile medicale.

Patologia ereditară și congenitală constituie o parte esențială în morbiditatea și mortalitatea populației, îndeosebi a copiilor. Conform datelor OMS, circa 5% din nou-născuți suferă de unele sau alte dereglări ereditate, 40% din mortalitatea infantilă și invaliditatea din copilărie sunt condiționate de factorii ereditari.

În cazul maladii studiate (DMD/B, SMA), este foarte importantă prevenirea apariției lor, deoarece niciun tratament curativ nu este disponibil momentan. Femeile ce prezintă risc au acces la consultație genetică și la teste în baza cărora se poate determina dacă ele sunt purtătoare de mutație sau nu. Opțiuni pentru femeile purtătoare sunt diagnosticul prenatal, diagnosticul genetic în cazul preimplantării sau folosirii unui ovul de donator. În continuare vom descrie în special diagnosticul prenatal al acestor două maladii, cu referire la etapele realizării, eficiența și necesitatea schimbării atitudinii populației și a medicilor în scopul realizării acestui pas.

Diagnosticul prenatal (DPN) este un act medical complex, înalt informativ, care permite depistarea a numeroase anomalii congenitale și boli genetice în cursul vieții fetale [192]. Acest serviciu este realizat corect numai printr-o strânsă colaborare multidisciplinară, în care medicul-genetician are un rol esențial în evaluare, diagnostic și consiliere genetică [193].

Anual, în lume se nasc peste două milioane de copii cu maladii ereditare. Mai mult de jumătate din ei vor muri în primii ani de viață sau vor deveni invalizi. Ceilalți vor necesita îngrijire medicală și socială permanentă.

Obiectivele principale ale diagnosticului prenatal sunt:

✓ Prezentarea pentru viitorii părinți a unei informații detaliate privind riscul de a se naște un copil bolnav.

✓ În cazul unui risc crescut – informarea părinților eventual despre necesitatea de a întrerupe sarcina și despre urmările deciziei luate de ei, întreruperea sarcinii sau nașterea unui copil bolnav.

✓ Efectuarea diagnosticului timpuriu al unei patologii intrauterine și elaborarea unei tactici optime de gestionare a sarcinii.

✓ Determinarea prognozei sănătății viitorilor copii.

În Republica Moldova, diagnosticul prenatal și cel postnatal al maladiilor ereditare neuromusculare se bazează pe metode ca PCR, M-PCR, RFLP, electroforeză, care pot detecta mutațiile punctiforme, delețiile sau mutațiile ce afectează matisarea, de exemplu pentru distrofia musculară Duchenne sau pentru amiotrofia musculară spinală.

Noi dispunem de posibilitatea de a efectua diagnosticul prenatal (DP) conform celor două abordări de DP existente: diagnostic direct și diagnostic indirect.

Diagnosticul direct este bazat pe identificarea nemijlocită a mutațiilor în gena de interes. Acesta are o precizie ridicată (până la 100%), nu necesită prezența bolnavului pentru DP și analiza informativității familiei. Este util pentru identificarea mutațiilor majore, frecvența cărora este ridicată și prezintă valoare de diagnostic mare, dar nu și în cazul mutațiilor minore (sporadice).

Diagnostic indirect are la bază analiza siturilor polimorfe intra- și intergenice. Condiția esențială pentru acest tip de diagnostic este prezența copilului bolnav și/sau posibilitatea investigării ADN-ului său. Determinarea informativității presupune identificarea sitului polimorf ce poate fi utilizat ca marker molecular pentru discriminarea alelelor mutante de cele normale. În cazul patologiilor autozomal-recesive, părinții vor fi heterozigoți după acest polimorfism, iar bolnavul – homozigot [194]. Heterozigotivitatea după polimorfismele moleculare determină informativitatea familiei cu risc sporit de naștere a unui copil bolnav. În funcție de amplasarea alelică a markerilor pe cromozomii omologi la pacient și părinții săi, familia poate fi deplin informativă, parțial informativă sau neinformativă. Metoda indirectă are avantajul diagnosticului fără a identifica mutația în gena respectivă, dar este imposibilă în absența copilului bolnav, întrucât nu este determinată alela polimorfă cu care e linkată gena mutantă. Fiecare diagnostic prenatal se soldează cu două opțiuni finale (naștere sau întrerupere de sarcină).

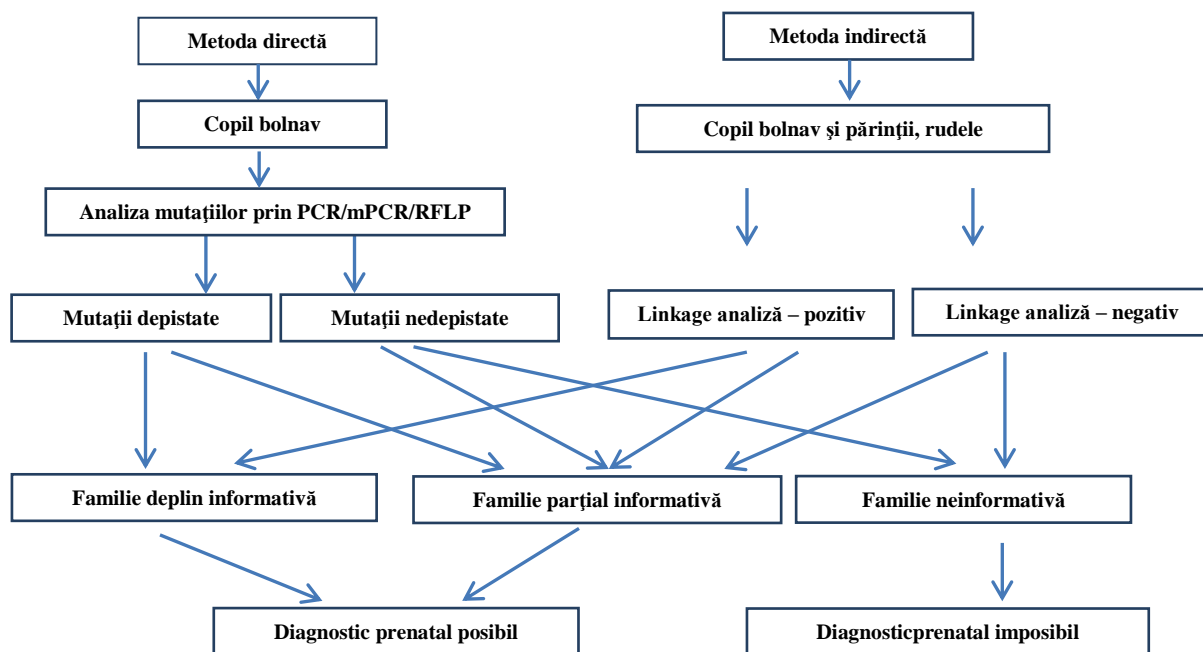


Fig. 3.10. Algoritm diagnosticului prenatal al patologiilor monogenice neuromusculare (schemă proprie) [195]

În perioada 1996-2017 au fost realizate 74 de diagnostice prenatale molecular-genetice a două boli, și anume a anomaliilor monogenice, X-linkate și, respectiv, autozomal-recesive: miodistrofia Duchenne (37 DP) și amiotrofia musculară spinală (37 DP).

În procesul diagnosticului prenatal noi utilizăm algoritmul prezentat în Figura 3.10. În scopul realizării eficiente a analizei ADN și economisirii reactivilor utilizați, prima etapă de diagnostic prenatal al DMD/B este determinarea sexului fetei. În cazul patologiilor X-linkate, analizele ulterioare sunt realizate pentru fetei de sex masculin.

Totuși, în Republica Moldova ca și în alte țări în curs de dezvoltare, diagnosticul molecular-genetic al DMD/B este efectuat atât pentru fetei de sex masculin, cât și pentru cei de sex feminin, aceasta realizându-se pentru a se stabili existența purtătorilor heterozigoți în cazul familiilor informative [196].

Diagnosticul prenatal pentru distrofia musculară Duchenne (perioada 2011-2017)

Analizând datele obținute, din 14 DP efectuate în ultimii șase ani pentru DMD/B, am constatat că 7 fetei erau de sex feminin și 7 de sex masculin. Am determinat de asemenea că doi din fetei masculini sunt afectați de maladie. În aceste două cazuri s-a realizat întreruperea sarcinii, astfel având loc prevenirea nașterii unor copii bolnavi (Tabelul 3.12).

Analizele efectuate pe parcursul primilor șase ani au arătat că fetele sunt purtători de mutație. Acest fapt a fost confirmat prin diagnosticul indirect al polimorfismelor, diagnosticul direct, MPCR, teste ce nu au depistat deleții evidente. Prin urmare, maladia DMD/B poate fi cauzată și de duplicații, mutații punctiforme ș.a. Din aceste considerente, aceasta nu poate fi depistată prin metoda MPCR.

Tabelul 3.12. Rezultatele diagnosticului prenatal pe perioada 2011-2017 pentru DMD/B

Anul	Număr pacienți	Rezultate		Diagnostic		
		MPCR	RFLP pERT87-8/pERT87-15	Sexul fătului	Prenatal	Resultat
2011	1	N	A2 (alela mutantă)	46XY	afectat	întrerupere sarcină
	1	n/a	A1A2/A1A2 (alela heterozigotă)	46XX	purtător	naștere
2012	1	N	A2 (alela mutantă)	46XY	afectat	întrerupere sarcină
	1	n/a	A2/A2 (informativă)	46XX	purtător	naștere
	1	n/a	A2/A1A2 (informativă 17)	46XX	purtător	naștere
2013	1	N	A1 (informativă)	46XY	neafectat	naștere
2014	1	n/a	A2/A2	46XX	purtător	naștere
	1	N	A2 (informativă)	46XY	afectat	întrerupere sarcină
	1	n/a	A1A2/A1A2 (informativă)	46 XX	purtător	naștere
2015	1	N	A1/A1 (neinformativă)	46XY	neafectat	naștere
2016	1	N		46XY	neafectat	naștere
	1	N		46XY	neafectat	naștere
2017	1	n/a	A2/A2	46XX	purtător	naștere
	1	N	A1 (informativă)	46XY	neafectat	naștere

Notă: n/a – nu a fost efectuat; XX – sex feminin; XY – sex masculin; N – absența delețiilor; A1, A2 – alele ale polimorfismelor.

Analizând experiența altor țări în ceea ce ține de DP al DMD/B (Tabelul 3.13) și posibilitatea utilizării diferitor metode, noi propunem creșterea eficacității și exactității acestui diagnostic prin utilizarea secvențierii genei distrofinei [197].

Tabelul 3.13. Strategii de diagnostic în diferite populații

Populația	Protocol de diagnostic	Discuții
Indiană	Analiza conformației unei singure catene și analiza heteroduplex, urmată de secvențierea ADN-ului	Din 50 de pacienți clinic confirmați cu DMD/B fără deleții confirmate, la 3 pacienți s-au confirmat mutații punctiforme.
Franceză	Testul de trunchiere a proteinelor (PTT)	Detectează mutații ce cauzează boli la 90% din pacienți, cu o eficiență semnificativ mai mare comparativ cu strategiile bazate pe ADN. Identifică

		mutații în cazuri de nedeletii sporadice.
Indiană	Analiza lipidelor din serul pacienților cu DMD, bazată pe rezoluția mare a NMR	Concentrația colesterolului liber și a esterilor colesterolului este semnificativ mai crescută la pacienții cu DMD în comparație cu subiecții sănătoși. Aceste date sunt importante pentru diagnosticul DMD, mai ales când diagnosticul genetic nu se reușește.
Americană	Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), urmată de Single condition amplification/internal primer sequencing (SCAIP)	Delețiile și duplicațiile ce nu sunt depistate prin MLPA se supun analizei mai sensibile. Cu ajutorul SCAIP se pot detecta mutațiile punctiforme.
Chineză	Metoda MLPA combinată cu mPCR și/sau analiza de linkage	Metoda MLPA detectează 10 mutații ce nu se observă prin mPCR. Protocolul oferă diagnosticul a 70-80% din toate cazurile menționate.
Americană	Hibridizare genomică comparativă de înaltă rezoluție plus tehnica microarray	Este o metodă de diagnostic sensibilă și rapidă.
Europeană	Fluorescența Multiplex QPCR, urmată de electroforeza capilară confirmată senzitiv	Este aplicabilă pentru gene de mărimi mari, în special pentru mutații necunoscute, eterogene.
Italiană	Tehnica Log-PCR	Protocol neinvaziv, senzitiv, cost-eficientă, care detectează mai mult de 85% din mutațiile genice.
Suedeză	Hibridizarea fluorescentă in situ interfazică. (FISH) este o analiză ce utilizează un singur nucleu din blastomer ic pentru detecția delețiilor.	Detectează embrionii purtători, împreună cu cei afectați și cei neafectați.
Olandeză	Scanarea semiautomată a gelului de electroforeză cu gradient de denaturare (DGGE) împreună cu PCR, ce acoperă 95 de ampliconi	Schimbări subtile în procesul de codificare și splicing al purtătorilor care nu au deleții largi sau duplicații. Astfel s-au depistat 15 mutații unice.
Multicentrică [americană și olandeză]	Electroforeza gelului de denaturare de înaltă performanță și secvențierea directă	S-a efectuat screeningul a 86 de ampliconi din gena distrofinei. Permite depistarea majorității schimbărilor în structura genei, cum ar fi: deleții, duplicații, mutații punctiforme și alte restructurări.

Diagnosticul prenatal pentru atrofia musculară spinală (perioada 2011-2017)

Pentru DP al SMA nu este necesară determinarea sexului, deoarece ea este o maladie autozomal-recesivă, în cazul ei se impune căutarea directă a delețiilor exonilor 7 și 8 ai genei SMN. În peste 95% din cazuri, această boală este determinată de anomalii ale genei *SMN1* (Survival Motor Neuron 1), ce antrenează un deficit major de proteină SMN1.

Persoanele cu SMA sunt fie homozigote pentru deleția exonului 7 din *SMN1* ($\Delta 7$ *SMN1*), fie heterozigote pentru $\Delta 7$ *SMN1* și o mutație intragenică a *SMN1*. Deleția copiei telomerice a *SMN* (*SMN1*) este direct implicată în SMA, deoarece absența exonului 7 sau a exonilor 7 și 8 este detectabilă la mai mult de 95% din persoanele afectate, indiferent de forma clinică de manifestare [198]. La pacienții cu mutații, aproximativ 70-80% din produsul genei *SMN* este sub

forma proteinei scurtat [199]. Toți pacienții cu atrofie musculară spinală păstrează cel puțin o copie a SMN2, însă aceasta este capabilă să genereze doar 10% din cantitatea de SMN full-length necesară, comparativ cu SMN1. Din 12 DP efectuate, doar trei feți au fost depistați ca fiind afectați (Tabelul 3.14), restul feților fiind sănătoși.

Tabelul 3.14. Rezultatele diagnosticului prenatal al SMA (2011-2017)

Anul	№	PCR/RFLP	Rezultate DP	
2011	1	del exon 7; 8	<i>afectat</i>	întrerupere sarcină
2012	1	del exon 7; 8	<i>afectat</i>	întrerupere sarcină
	1	N	<i>sănătos</i>	naștere
2013	1	N	<i>sănătos</i>	naștere
2014	1	N	<i>sănătos</i>	naștere
	1	N	<i>sănătos</i>	naștere
2015	1	N	<i>sănătos</i>	naștere
	1	del exon 7	<i>afectat</i>	întrerupere sarcină
2016	1	N	<i>sănătos</i>	naștere
2017	3	N	<i>sănătos</i>	2 naștere

Datele din literatura de specialitate demonstrează, că implementarea metodelor molecular-genetice de DP contemporan are o eficacitate de 98 % [200]. Conform datelor obținute de noi, eficacitatea DP al acestor două maladii ereditare în Republica Moldova este de 73,4% [183].

Vom menționa că numărul de femei supuse DP diferă de la an (2 în 2011) la an (7 în 2014), însă odată cu trecerea timpului se observă un nivel de informare mai înalt și o atitudine mai responsabilă a femeilor însărcinate. Acest fapt se datorează atât activității intense a medicilor, a întregului sistem medical, posibilității de a oferi tuturor persoanelor de orice nivel social a unei consultații, cât și interesului familiilor de a avea un copil sănătos [183]. Diagnosticul prenatal pentru ambele afecțiuni se face în mod standardizat, conform consultului genetic, deoarece la momentul actual nu este posibil de a prezice dacă o femeie însărcinată care este heterozigotă după o mutație va prezenta sau nu anumite semne ale afecțiunii [201].

În alte țări, ca și în țara noastră, diagnosticul prenatal al acestor patologii este privit ca o șansă de a avea o populație sănătoasă și de a scădea cota copiilor ce se nasc grav bolnavi, care poate atinge aproximativ o jumătate din copiii analizați, în familiile cu risc crescut, în alte țări există și metode non-invazive de diagnosticare [202-204].

O serie de alte metode și strategii au fost concepute pentru detectarea delețiilor mici sau a inserțiilor, depistarea mutațiilor ce provoacă DMD/B, SMA și pentru a ameliora sensibilitatea testului de diagnostic [205, 206]. Metodele utilizate pentru analizele molecular-genetice în diagnosticul prenatal diferă de la o populație la alta, de la o etnie la alta. Diferențele depind de nivelul economic al țării, de religie, cultură și politică. Vom menționa totodată că multe dintre aceste tehnici au limite. De exemplu, hibridizarea probelor prin amplificarea multiplexă (MAPH), deși este simplă și efektivă, necesită o cantitate mare de ADN, iar în aspect tehnic este o procedură laborioasă [207]. FISH, analiza CA repetată a markerilor și qPCR sunt valabile în cazul confirmării persoanelor purtătoare de mutație, însă nu sunt eficiente pentru screeningul direct al pacienților [206].

Menționăm că unele metode, cum ar fi SSCP (DOVAM-S) și SCALP, sunt îndelungate, laborioase și nu pot detecta cu precizie duplicațiile [194]. De asemenea, testul ce determină dacă o femeie este purtătoare de mutație este dificil în cazul în care băiatul afectat nu este disponibil (în cazul miodistrofiei Duchenne). La rândul ei, tehnica PTT pentru diagnosticul de purtător de mutație are limite practice [194, 208].

În continuare prezentăm cazurile a trei familii în care s-au înregistrat bolnavi de DMD (familia A, B) și SMA (familia C).

Familia A. Femeie în vârstă de 25 de ani, gravidă la termenul de opt săptămâni, s-a adresat la Centru pentru efectuarea diagnosticului prenatal, având în anamneză o rudă (băiat) diagnosticat anterior cu maladia Duchenne. Femeia este una dintre cele trei fiice ale unei familii în care mama este purtătoare de mutație și, conform investigațiilor efectuate, surorile sunt de asemenea purtătoare de sit de mutație. Băiatul născut cu mutație este feciorul uneia dintre surori. Conform algoritmului, băiatului afectat de maladie i s-a efectuat diagnosticul direct de depistare a delețiilor în gena distrofinei prin metoda MPCR, care a permis determinarea spectrului de deleții presupuse. Prin metoda diagnosticului indirect s-a stabilit că familia este informativă după locii 16intron/TaqI și pERT87-8/TaqI [209]. La termenul de 17 săptămâni a fost realizată amniocenteza, fiind extras ADN-ul fetal. Prin PCR s-a determinat sexul *feminin* al fătului (Figura 3.11- A).

În electroforeograma prezentată în figura 3.11-B, sibul diagnosticat cu DMD conține situl de restricție în locusul 16intron/TaqI. Fătul a moștenit de la mamă alela cu situl de restricție, linkată cu patologia, aceeași configurație a alelelor o deține și probandul. Însă, deoarece patologia este X-linkată, fătul de sex feminin nu poate fi decât purtător de mutație

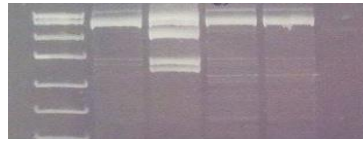


Fig.3.11- A: Electroforegrama analizei PCR a locilor AZF pentru determinarea sexului celulelor fetale extrase prin amniocenteză: 1 – control feminin; 2 – control masculin 3, 4 – celulele fetale din familia A – sex feminin; 5 – control negativ



Fig.3.11-B. Electroforegrama analizei linkage a familiei după locusul pERT87-8/*TaqI* și locusul al 16-lea intron; Track 2 – mama fătului, Track 3 – tata fătului, Track 4 – proband DMD, Track 6 – ADN fetal.

Rezultatul diagnosticului prenatal: fătul este de sex feminin, cu statutul molecular-genetic de purtător de mutație ce provoacă maladia Duchenne în proporție de 99,9%.

Familia B. Familia se afla în evidența Centrului de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală având un copil diagnosticat cu DMD la vârsta de șase ani. Următoarele două sarcini de asemenea nu au avut un rezultat benefic, deoarece o sarcină a fost pierdută la 20 de săptămâni, iar următoarea a fost supusă diagnosticului prenatal, care a demonstrat că fătul este de sex masculin și este purtător de mutație (Figura 3.12).

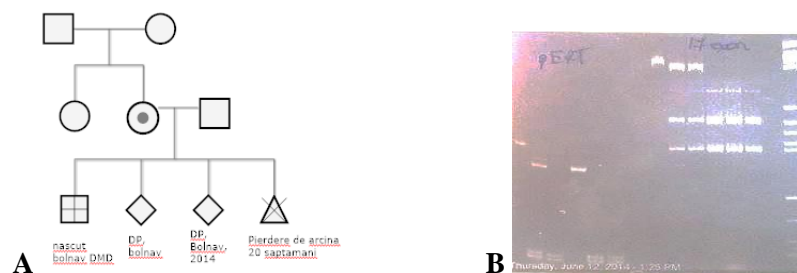


Fig. 3.12. *Familia B* – deplin informativă (date proprii). A- Arborele genealogic al familiei B și B- electroforegrama analizei de linkage a familiei după locusul pERT87-8/*TaqI* și al 16-lea intron M-marker; Track 1 – amplicon; 2- control heterozigot, 3 – mama bolnavului DMD, 4 – bolnavul DMD; 5,6 – ADN fetal; 7 – control negativ.

Sarcina următoare de asemenea a fost una planificată. A fost realizată amniocenteza la termenul de gestație de 16 săptămâni și extras ADN-ul fetal, însă și de data aceasta analiza PCR de determinare a sexului a arătat că fătul era băiețel. Conform algoritmului, a doua etapă este căutarea directă a delețiilor dacă fătul era de sex masculin. Diagnosticul direct prin analiza MPCR nu a identificat deleții în exonii genei, la fel ca și la fătul precedent și de asemenea la proband.

În etapa diagnosticului indirect, analiza markerilor polimorfici – pERT87-8/TaqI și 16 intron/TaqI – a relevat că familia este informativă și după electroforeograma prezentată în Figura 3.12B, deci fătul posedă situl de restricție la polimorfismul 16intron/TaqI. Conform rezultatelor diagnosticului prenatal, fătul este afectat de DMD cu o probabilitate de 98%.

În urma consultărilor cu medicul-genetician, părinții au primit informația cu privire la rezultatele diagnosticului prenatal și au decis întreruperea sarcinii.

Testarea genetică a Amiotrofiei Spinale se realizează prin: PCR cantitativ cu stabilirea numărului de copii ale genei *SMN1* și ale pseudogenei *SMN2*, secvențierea genei *SMN1* cu identificarea mutațiilor intragenice, analiza mutațională direcționată (PCR-RFLP) cu identificarea delețiilor în gena *SMN1*.

În cadrul Laboratorului Centrului de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală putem realiza doar diagnosticul direct al maladiei SMA și identifica delețiile exonilor 7 și 8 ai genei *SMN1* prin metoda PCR-RFLP.

Familia C. Familia se afla în evidență la Centrul nostru cu o fetiță diagnosticată cu SMA de tip II, care a decedat la vârsta de șase ani. Diagnosticul a fost confirmat prin analiza PCR/RFLP cu identificarea delețiilor exonilor 7 și 8. Mostra de ADN a probantului este păstrată în banca de ADN a Centrului. Familia cu sarcina în termen de 16 săptămâni s-a adresat pentru efectuarea diagnosticului prenatal (Figura 3.13A). În urma amniocentezei s-a extras ADN-ul fetal din amniocite și a fost realizat diagnosticul direct prin metoda PCR/RFLP. Rezultatele diagnosticului direct nu au confirmat deleții ale exonilor 7 și 8 în gena *SMN1* (Figura 3.13B: prezența fragmentelor de 151 bp și, respectiv, 119 bp), deci fătul este sănătos în proporție de 98%.

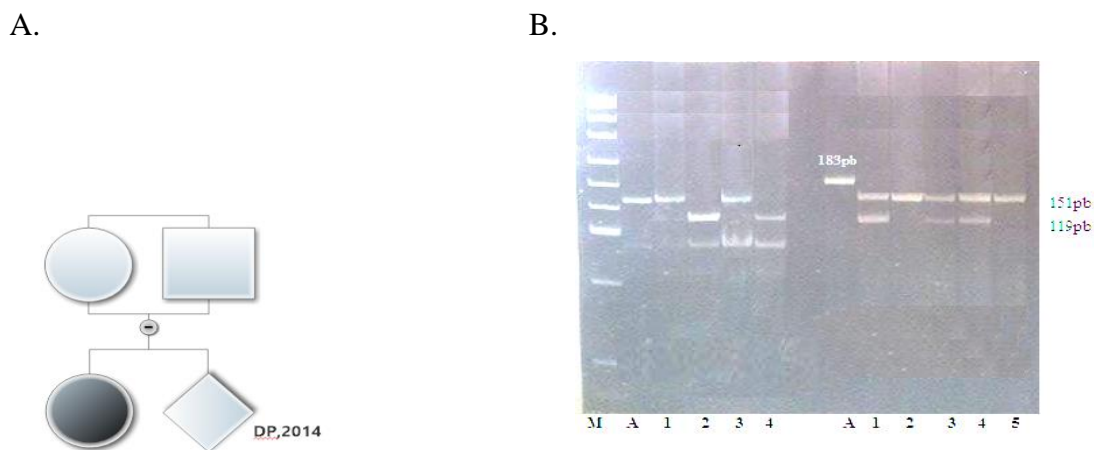


Fig. 3.13. A – arborele genealogic al *familiei C*; B – electroforeograma (date proprii). Analiza PCR/RFLP pentru determinarea delețiilor în exonii 7 și 8 în gena *SMN*. M – marker; Track 1 – amplicon; 1– control sănătos, 2 – ADN al copilului afectat, 3 – ADN fetal

3.5. Concluzii la capitolul 3

1. Utilizând baza de date pentru perioada 1991-2018, a fost stabilit că cele mai frecvente patologii neuromusculare întâlnite în eșantionul de pacienți din Republica Moldova (n=1587) sunt: neuropatia motosenzorială (17,39%), miodistrofia Duchenne-Becker (15%), amiotrofia spinală (12,98%), care constituie nucleul bolilor ereditare neuromusculare.

2. Frecvența relativă patologiilor neuromusculare în cadrul populației Republicii Moldova constituie 23,5:100000 de locuitori. Frecvența miodistrofiei Duchenne/Becker este 9,13:100000 de locuitori, amiotrofie spinală 8,43:100000 de locuitori și neuropatii senzorial motorii 7,2:100000 de locuitori. A fost determinată o asocierie medie semnificativă ($\rho=0,48$) între numărul cazurilor de patologii DMD/B, SMA și NSME tip 1A cu mărimea și compoziția națională a populației din raioane.

3. Particularități molecular-genetice la bolnavii cu DMD/B din Moldova: procentajul delețiilor egali sau mai mari de 1 exon în eșantion cercetat constituie 84,98%, ce este diferit de la datele, publicate anterior, predomină deleții mai mari de 1 exon (46,95%) și deleții out-of-frame (61,7%), sunt prezenți 6 deleții rare (2,8%) și 4 deleții, care nu sunt descrise în baza de date DMD – LOVD v3.0; și 16 deleții duble (7,5%), tot nedescrise în baza de date DMD.

4. Procentul de identificare a delețiilor exonilor 7 și 8 ai genei *SMN1* la pacienții cu amiotrofie spinală din Republica Moldova constituie 85%, ceea ce corespunde cu datele internaționale; locusul D5S435 este înalt informativ în populația republicii. La 28% de pacienții

din Republica Moldova este găsită deleția concomitentă a exonilor 7 și 8 în gena SMN1, ce este diferit de la populațiile iraniene sau indiene.

5. Frecvența duplicației în gena *PMP22* la pacienții cu NSME 1A din Republica Moldova este de 69%, mai frecvent decât în Coreea (46,9%), Italia (57,6%), Australia (60,7%), Japonia (23,3%), Marea Britanie (28,2%), Statele Unite (51,6%), Rusia (53,6%).

6. Algoritmul elaborat în scopul cercetării complexe a familiilor cu risc de maladii ereditare ale sistemului neuromuscular mărește considerabil eficacitatea identificării maladii.

7. Dezvoltarea sistemului centralizat de acordare a asistenței medicale și genetice contribuie la îmbunătățirea calității diagnosticului prenatal și la creșterea amplitudinii serviciului de diagnosticare din R. Moldova.

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

Polimorfismul genetic reprezintă apariția într-o populație a două sau mai multe alele pentru un locus cu o frecvență mai mare decât cea pe care o poate menține mutația. Polimorfismele sunt diferențele genetice care realizează variațiile din interiorul speciilor. În practică este dificil să se cunoască ce frecvență poate fi menținută pentru o alelă prin mutație. Diferența dintre aberația întâlnită în populație și polimorfismul genetic este că aberația cu o frecvență sub 1% rămâne a fi o mutație (deleție, inserție ș.a.), iar aberația cu o frecvență peste 1% reprezintă un polimorfism genetic. Polimorfismul este general, mai ales în regiunile necodificatoare ale ADN-ului.

Markerul genetic este un caracter cu transmitere ereditară cu alele ușor de cunoscut. Un marker genetic implică un polimorfism ușor detectabil. Markerul poate sau nu poate să fie parte a unei gene structurale. În general, cei mai valoroși markeri genetici sunt cei mai polimorfi [210]. Aceștia sunt cei pentru care un individ prezintă două forme diferite și pentru fiecare formă – diferite variante cu frecvențe apreciabile în populație.

Polimorfismul genetic poate fi *calitativ*, atunci când există substituții de nucleotide, sau *cantitativ*, când numărul de repetiții ale nucleotidelor, de diferită lungime, din ADN variază. Acestea și alte tipuri de polimorfism se întâlnesc atât în regiunea codificatoare, cât și în secvențele necodificatoare.

Polimorfismul genetic calitativ este reprezentat în special de substituția unui singur nucleotid, fiind numit în engleză *single nucleotide polymorphism (SNP)* [211]. Este cel mai frecvent polimorfism genetic. Deja primul studiu comparativ al genomurilor reprezentanților diferitor rase și grupuri etnice nu numai că a arătat o rudenie profundă a tuturor oamenilor (asemănarea genomurilor = 99.9%), dar și a permis obținerea informației despre apariția omului, direcțiile sale de dispersie pe planetă, modurile de etnogeneză etc. Clarificarea multor aspecte ale genogeografiei legate de apariția omului, evoluția genomului în filogeneză și etnogeneză – acestea sunt problemele fundamentale ce stau în fața domeniilor științei cu dezvoltare rapidă [212].

Polimorfismul genetic cantitativ este reprezentat prin variația numărului repetițiilor în tandem (*STR – Short Tandem Repeats*) ca 1-2 nucleotide (microsatelit ADN) sau 3-4 și mai multe nucleotide pe care se repetă unitatea [75]. Repetările ADN pot avea o lungime mare și variabilă după compoziția nucleotidelor, fiind numite *VNTR (Variable Number Tandem Repeats)*. De regulă, polimorfismul genetic cantitativ se referă la regiunile necodificatoare ale

genomului. Excepție fac numai repetițiile trinucleotidelor. Dintre acestea este frecvent atestat tripletul CAG (citozina-adenina-guanina), ce codifică acidul glutamic. Trinucleotidele se pot întâlni și în secvențele codificatoare ale genelor. În particular, aceste polimorfisme genetice sunt caracteristice pentru genele „bolilor extinse”.

În aceste cazuri, pentru atingerea unui număr de copii al repetițiilor de trinucleotide (polinucleotide), polimorfismele genetice încetează să mai fie neutre funcțional și se afirmă ca un tip deosebit de „mutații dinamice” [213]. Ultimele sunt caracteristice pentru o grupă mare de boli neurodegenerative (coreea Huntington, boala lui Kennedy, ataxia spinocerebeloasă ș.a.). Particularitățile clinice ale acestor boli sunt: manifestare târzie, efect de anticipare (consolidarea severității bolii în ultimele generații), lipsa metodelor eficiente de tratament.

În prezent, este bine cunoscut faptul că polimorfismul este caracteristic practic pentru toate genele umane. Mai mult decât atât, s-a demonstrat că el are un specific etnic și populațional. Această particularitate permite utilizarea largă a genelor-markeri polimorfe în cercetările etnice și populaționale [214]. Polimorfismul, afectând regiunea codificatoare a genelor, poate duce la modificarea aminoacizilor și apariția proteinelor cu noi proprietăți funcționale. Influența semnificativă asupra expresiei active a genelor poate produce substituții sau repetări de nucleotide din regiunile reglatoare ale genelor (promotori). Polimorfismele ereditare de schimbare a genelor joacă un rol decisiv în definirea amprentelor fiecărui om, în aprecierea predispoziției ereditare spre diferite boli multifactoriale [215].

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

Ciclul folat este un proces în cascadă controlat de enzime, iar în calitate de coenzime servesc derivații acidului folic. Etapa principală în acest proces este sinteza metioninei din homocisteină. Aceasta se realizează prin conversia acidului folic: restaurarea 5,10-metilentetrahidrofolatului la 5-metilentetrahidrofolat, purtând o grupare metil, care este necesară pentru conversia homocisteinei la metionină. Așadar, restaurarea acidului folic are loc cu participarea enzimei metilentetrahidrofolat reductază (MTHFR). Gruparea metil este transferată vitaminei B12, apoi este transmisă homocisteinei pentru a forma metionina cu ajutorul enzimei metionin-sintază (MTR). În unele cazuri, vitamina B12 se poate oxida, având ca rezultat suprimarea activității metionin-sintazei. Pentru a menține activitatea enzimei, este necesară restabilirea metilării cu ajutorul enzimei metionin-sintază reductază (MTRR) [123], [216].

Studiile recente demonstrează importanța procesului de metilare în etiologia și patogeneza multor boli, fapt ce deschide noi posibilități de tratament [175].

Unul dintre obiectivele studiului de față a fost utilizarea asociațiilor de tip caz–control pentru detectarea polimorfismelor *C677T* (rs1801133) și *A1298C* (rs1801131) ale genei *MTHFR* și cercetarea potențialului cu efect modificador al acestora asupra procesului miopatic.

În scopul analizei polimorfismului alelic după exonul 4 în populația Republicii Moldova și pentru analiza eficacității utilizării acestui polimorfism, au fost efectuate analiza incidențelor alelelor C și T, estimarea frecvenței alelelor și genotipurilor în grupul control (la 165 persoane – 330 cromozomi) și la bolnavii cu DMD/B (la 165 persoane – 330 cromozomi).

Incidența alelelor C și T ale locusului *MTHFR677* la pacienții cu DMD/B din Republica Moldova este de 212 și, respectiv, 118. Prin formula Hardy-Weinberg au fost identificate următoarele trei clase genotipice: $C677C=0,41$; $C677T=0,46$; $T677T=0,13$, valoarea lui alela C fiind = 0,63, iar valoarea lui alela T = 0,37.

Prin estimarea frecvenței genotipului homozigot pentru alelele C (alela sălbatică), T (alela mutantă) și celui heterozigot, la 165 de persoane din grupul pacienților cu DMD/B am obținut următoarele rezultate: 13,94% erau posesori ai genotipului homozigot după alela T, la 43,64% s-a identificat genotipul heterozigot *C677T* și la 42,42% – genotipul *C677C*.

La compararea repartiției frecvenței genotipurilor observate și celor teoretic așteptate prin testul χ^2 nu s-a determinat o deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg – $\chi^2=0,41$ ($p=0,52$) (Anexa 8).

La cele 165 de persoane sănătoase din grupul control investigate a fost evidențiată următoarea frecvență a genotipurilor $C677C = 0,47$, $C677T = 0,43$, $T677T = 0,1$., frecvența alelică: C = 0,68; T = 0,32; iar frecvențele observate a trei clase genotipice sunt: 49,7% – genotip homozigot dominant *C677C*, 37,6% – genotip heterozigot *C677T* și 12,7% – genotip homozigot *T677T* (Anexa 8) [234].

Pentru a identifica dacă există diferențe statistic semnificative între frecvențele genotipurilor *CC*, *CT* și *TT* ale genei *MTHFR* în poziția 677, s-a recurs la compararea repartiției frecvenței genotipurilor observate și celor teoretic așteptate prin testul χ^2 , în urma căruia nu a fost determinată o deviație de la echilibrul Hardy-Weinberg între grupuri; datele nu sunt statistic sugestive ($\chi^2 = 2,76$; $p=0,09$).

Pentru evaluarea asocierii genotipului *677CT* cu riscul agravării procesului miopatic, a fost calculat raportul șanselor – OR (odd ratio). Datele au fost analizate prin aplicarea modelului multiplicativ. Alela C a genei *MTHFR* în poziția 677 a fost identificată la 70 (42%) pacienți cu

miodistrofie Duchenne/Becker, pe când în grupul de control această alelă era prezentă la 82 (50%) persoane. Genotipul C677T a fost identificat la 72 (39%) bolnavi cu DMD/B și la 62 (38%) persoane din grupul de control. Genotipul T677T s-a atestat la 23 pacienți (11%) cu DMD/B și la 21 (13%) din grupul de control. Nu au fost identificate diferențe statistice semnificative între grupuri ($p=0,47$; $\chi^2 = 0,53$).

La indivizii homozigoți după această mutație a fost evidențiată o termosensibilitate a genei *MTHFR* și o scădere a activității enzimei in vitro cu 70%, iar la heterozigoți – cu 35%. În plus, la indivizii homozigoți după această mutație se produce o dereglare a repartizării folatului în eritrocite, care se exprimă prin acumularea poliglutamatumului formilic, tetraglutamatumului și a derivaților metilați ai tetrahidrofolatului. Această mutație este însoțită de creșterea nivelului de homocisteină în sânge [127].

Astfel, se dereglează metabolismul acidului folic și sinteza metioninei, ca rezultat nu are loc producerea creatinei, care este sursa de energie pentru mușchi [216].

Polimorfismul A1298C duce la substituirea acidului glutamic cu alanină în domeniul regulator al enzimei (p.Glu429.Ala). În mod similar, această mutație reduce activitatea enzimei, dar nu atât de semnificativ ca alela 677T [123].

Pentru studierea polimorfismului genei *MTHFR* A1298C, au fost cercetați 165 de copii cu semne de miodistrofie și grupa control. Frecvența alelică și genotipică identificată în grupul de studiu și control (Anexa 8).

În grupul de control, au fost calculate frecvențele probabile ale trei clase genotipice: A1298A=0,43; A1298C = 0,45; C1298C = 0,12, precum și frecvența alelică: A = 0,65, C = 0,35, ceea ce demonstrează că alela A este dominantă, în comparație cu alela C [234]., alela C apare cu o frecvență considerabil mai mică (0,35), decât alela A, care apare cu o frecvență destul de înaltă (0,65), adică alela C apare de două ori mai rar în populația Republicii Moldova care nu prezintă procese miopatie. Distribuția frecvențelor genotipice în grupul de control corespunde echilibrului Hardy-Weinberg, $p=0,91$ [217]. Genotipul homozigot A1298A în grupul de control apare cu o frecvență de 43,03%, spre deosebire de genotipul homozigot C1298C, a cărei frecvență este de 12,2%.

Pentru studierea polimorfismului genei *MTHFR* A1298C la pacienții cu DMD/B, au fost cercetate 165 de persoane care prezentau procese miopatie.

În acest caz, după formula Hardy-Weinberg, frecvența alelică la grupul bolnavilor cu DMD/B a fost următoarea: A = 0,60, C = 0,40, frecvența genotipică observată: A1298A=0,35, A1298C = 0,48, C1298C= 0,17, iar în concluzie nu s-au identificat abateri de la echilibrul

Hardy-Weinberg. Analizând frecvențele genotipice ale polimorfismului *MTHFR* A1298C dintre grupurile bolnavilor cu DMD și cu DMB, nu s-au identificat diferențe statistic veridice între acești parametri.

Estimarea asociativă prin raportul șanselor a identificat că frecvența genotipului heterozigot *MTHFR* A1298C în grupul de pacienți cu DMD/B 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). 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 (Anexa 8).

Conform datelor din literatura de specialitate, în populația din Europa, frecvența homozigoților constituie 10–12%, iar frecvența heterozigoților – aproximativ 40%. Există diferențe considerabile interrasiale și interetnice la parametrul dat. Alela 677T este răspândită în populație cu o heterogenitate ridicată. Frecvența acesteia la europeni variază de la 0,19 (Marea Britanie) până la 0,55 (Spania) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4524>). În populația asiatică, alela mutantă are o frecvență de la 0,02 (Indonezia) la 0,38 (China); pe continental african – de la lipsa acestei alele în tribul dandy la 0,09 la naționalitatea Berben. În America, alela se întâlnește cu frecvența de la 0,11 (la afroamericani din Carolina de Sud) până la 0,45 (la indienii din Brazilia). Frecvența alelei 677T constituie 0,29 la locuitorii din regiunea Moscovei, Rusia, 0,32 – la locuitorii Siberiei [218]. Indiferent de regiune, prezența alelei 677T este asociată cu creșterea nivelului de homocisteină în plasmă. La homozigoți, nivelul homocisteinei este mai ridicat decât la heterozigoți.

Frecvența înaltă a alelei 677T sugerează ideea că purtătorii acestei mutații pot avea anumite avantaje în selecția naturală. Există o ipoteză că, în timpul foamei, reducerea activității enzimei *MTHFR* conduce la scăderea remetilării homocisteinei, fapt ce salvează radicalii monocarboxilici ai metabolismului tetrahidrofolatului, vital pentru sinteza ADN-ului și ARN-ului. Conform unei alte ipoteze, purtătorii de alele mutante prezintă un risc mai mic de cancer de sân, având ca rezultat creșterea treptată a frecvenței mutației în populație [219].

Prin intermediul acestui studiu, s-a constatat că frecvența genotipurilor polimorfismului C677T (rs.1801133) al genei *MTHFR* în grupul control (populația sănătoasă a Republicii Moldova) este de: C677C – 82 (49,7%), C677T – 62 (37,6%), T677T – 21 (12,7%). (Anexa 8)

Frecvența genotipului C677T (37.6%) în populația R. Moldova nu se deosebește statistic semnificativ de majoritatea populațiilor europene și asiatice studiate anterior (p>0,05) (Figura

4.1). O frecvență asemănătoare a heterozigoților se observă în populația din Germania (47%), Anglia (54%), Suedia (48%), Austria (48%) [220], România (41%) [221], Croația (40%) [222].

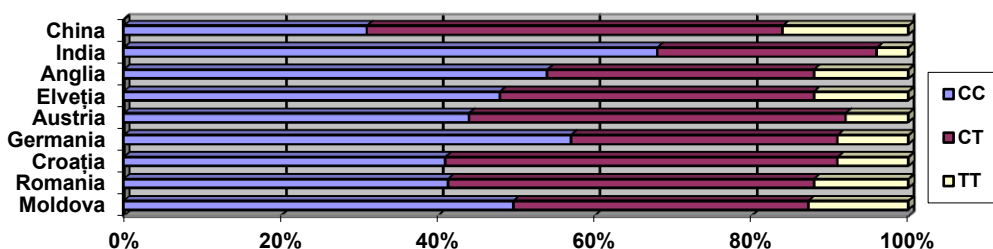


Fig. 4.1. Frecvența genotipică a polimorfismului rs1801133 în Republica Moldova și în diferite populații

După frecvența genotipului homozigot C677C (49,7%), populația R. Moldova este similară cu datele populațiilor din Suedia, Marea Britanie, dar se observă o diferență (purătorii tipului sălbatic C677C) față de populația Chinei [223] și cea din România [221]. Frecvența genotipului T677T (12,7%) în populația Moldovei se deosebește semnificativ de majoritatea datelor obținute anterior despre populațiile europene și asiatice, cu excepția Indiei ($p > 0,05$) [224].

S-a constatat că frecvența genotipică a polimorfismului A1298C (rs1801131) al genei *MTHFR* în populația Republicii Moldova este următoarea: A1298A – 71 (43,03%); A1298C – 74 (44,85%); C1298C – 20 (12,12%). Analiza comparativă a frecvențelor enumerate în populația țării noastre față de alte populații sănătoase este prezentată în Figura 4.2.

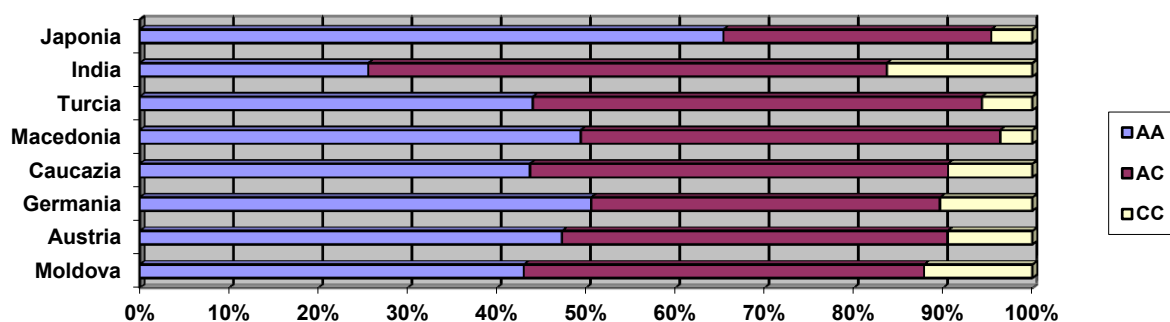


Fig. 4.2. Frecvența genotipică a polimorfismului rs1801131 în Republica Moldova și în diferite populații

Analiza comparativă a frecvenței genotipice a polimorfismului A1298C al genei *MTHFR* a evidențiat frecvența înaltă a genotipului heterozigot A1298C în populația R. Moldova,

comparativ cu populația din Japonia (30%). Au fost observate diferențe semnificative la compararea frecvențelor genotipului homozigot A1298A din populația Republicii Moldova (43.02%) cu populația Indiei (25.6%) și similarități cu datele din populația Turciei (39.62%), regiunea caucaziană (44.03%), Macedonia (49.4%).

Astfel, populația Republicii Moldova se caracterizează printr-un nivel sporit al heterozigozității după polimorfismele C677T ($H_o=0,43$) și A1298C ($H_o=0,45$), fapt ce denotă un grad ridicat 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* și *MTRRA66G* în grupul de control și la bolnavii cu DMD/B

Gena *MTR* codifică o enzimă care este implicată în conversia homocisteinei în metionină. S-a demonstrat că polimorfismul A2756G (rs1805087) conduce la dereglarea remetilării homocisteinei, fapt ce duce la creșterea cantității de homocisteină în sânge. Aceasta, la rândul său, sporește riscul de apariție a bolilor cardiovasculare, ca urmare a dezvoltării coagulopatiei. *MTR* este o enzimă de transfer al grupării metil și catalizează conversia aminoacidului homocisteina în aminoacidul metionina [127].

A fost cercetat polimorfismul A2756G (rs1805087) al genei *MTR* în grupul de control – 165 de persoane ce nu prezentau simptome de miodistrofie. 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 control, alela G apare cu o frecvență considerabil mai mică (0,26) decât alela A (0,74). La compararea repartiției frecvenței genotipurilor observate și celor teoretic așteptate prin testul χ^2 nu s-a determinat deviații statistic semnificative de la echilibrul Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1,6778$, $p>0,05$) [217].

Studiul polimorfismului A2756G al genei *MTR* a fost realizat și la 165 de pacienți cu DMD/B. 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. În grupul DMD/B, alela 2756G apare cu o frecvență de 3,6 ori mai mică (0,22) decât alela 2756A (0,78). La compararea repartiției frecvenței genotipurilor observate cu cele teoretic așteptate, nu s-au elucidat deviații statistic semnificative de la echilibrul Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,88$, $p>0,05$). Compararea frecvențelor alelice dintre grupurile de bolnavi DMD și DMB nu a identificat diferențe statistic semnificative.

La compararea frecvenței genotipice pentru polimorfismul *MTR* A2756G între cele două grupuri, se observă o frecvență mai mare a genotipului A2756A în grupul DMD/B. Totodată, frecvența heterozigoților în grupul de control este de 38,54%, ceea ce indică o informativitate medie a acestui polimorfism la identificarea purtătorului heterozigot. Mutația din gena *MTR* conduce la dereglarea metabolismului homocisteinei, prin dereglarea biosintezei metioninei, deoarece se cunoaște că genotipul heterozigot A2756G al genei *MTR* scade cu 35% activitatea enzimatică.

Asociere statistic semnificativă a genotipului A2756G a fost determinată prin modelul recesiv al moștenirii (Anexa 8). 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, 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 (cealaltă enzimă – MTR). Proteina codificată de alela rs1801394 se aseamănă puțin cu MTR [225] și este în legătură directă cu nivelul de homocisteină [226].

Frecvența genotipică a polimorfismului genei *MTRR* A66Ga fost cercetată în grupul de control la 165 de indivizi, care nu prezentau simptome de miodistrofie. Astfel, în grupul de control, frecvența alelei dominante a fost: 66A = 0,68, iar a alelei recesive 66 G= 0,32; frecvența genotipică: A66A = 0,46, A66G = 0,43, G66G = 0,11 [217]. Compararea repartiției frecvenței genotipice observate cu valorile teoretic așteptate prin testul χ^2 a indicat o deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 32,74$, $p < 0,05$).

În grupul de studiu, frecvențele alelelor au fost: 66A = 0,62, 66G = 0,38; frecvențele genotipurilor observate: A66A = 0,39, A66G = 0,47, G66G = 0,14 [217]. Compararea repartiției frecvenței genotipice observate cu valorile teoretic așteptate prin testul χ^2 a evidențiat o deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 39,68$, $p < 0,05$).

Raportul de șanse pentru genotipul G66G a constituit OR = 7,20 (95% CI – 1,84-61,81, $\chi^2 = 5,02$, $p = 0,04$) (Anexa 8). 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*. Din datele obținute rezultă că genotipul G66G al genei *MTRR* are o acțiune negativă asupra procesului miopatic și, prin urmare, este asociat cu un risc crescut de agravare a stării bolnavilor cu DMD/B.

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% (Anexa 8).

Analiza comparativă a rezultatelor frecvenței genotipice a polimorfismului A2756G al genei *MTR* în populația țării noastre (Figura 4.3) a evidențiat o frecvență înaltă a genotipului homozigot mutant GG (4,85%), în comparație cu datele din China (1,36%) [130], SUA (3,7%) [227], regiunea caucaziană (2,6%), continentul african (2,7%) [216], dar similară cu indicele din Germania (4%). Totodată, frecvența genotipului homozigot A2756A (52,75%) depistată în populația Moldovei este mai mică, comparativ cu cea din China (85,45), SUA (71%), Africa (66,4%), Germania (65%). După frecvența genotipului heterozigot A2756G, populația R. Moldova (42,42%) înregistrează un indice mai mare față de populația din regiunea caucaziană (35%), Africa (30,9%), Germania (31%), SUA (26,5%), China (13,18%). Frecvența înaltă a genotipului heterozigot poate servi drept temei pentru studiul acestui polimorfism în cadrul cercetărilor populaționale.

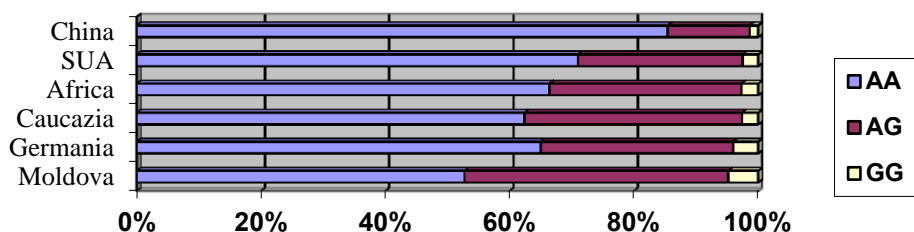


Fig. 4.3. Repartiția frecvenței genotipice după polimorfismul *MTR*A2756G în R. Moldova și în diferite populații.

Populația din Republica Moldova se caracterizează printr-un nivel mediu al heterozigoției observate ($H_o = 0,38$) după polimorfismul rs1805087, iar rata reală a heterozigoției după polimorfismul A2756G a fost semnificativ mai mare decât cea așteptată ($H_e = 0,34$).

Cercetând polimorfismul A66G al genei *MTRR* în populația sănătoasă a R. Moldova, s-a constatat că frecvența genotipurilor este următoarea: A66A – 36,36%; A66G – 63,03%; G66G – 0,61%. Analiza comparativă a frecvenței genotipice a polimorfismului A66G al genei *MTRR* în

populația R. Moldova a evidențiat o frecvență joasă a genotipului G66G (0,61%), în comparație cu datele referitoare la populația din Caucaz (20,1%), SUA (29,9%), Africa (17%) [216], Australia (10%), China (5,91%). [130]. Nu există diferențe mari privind frecvența genotipului A66A (36,36%) față de populația din regiunea caucaziană (35,2%), Africa (32,4%), Australia (38%), dar sunt diferențe mari comparativ cu SUA (22,4%) și China (53,64%) (Figura 4.4) .

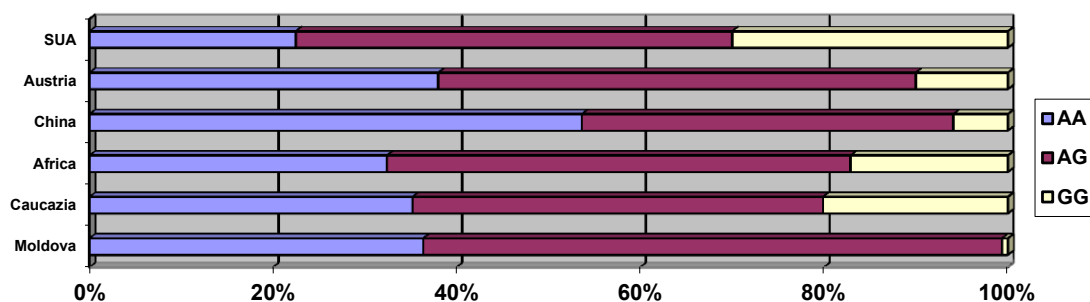


Fig. 4.4.Repartiția frecvenței genotipice după polimorfismul *MTRRA66G* în Republica Moldova și în diferite populații

La compararea frecvenței genotipului *MTRR A66G*, populația R. Moldova se deosebește de toate regiunile, având cel mai ridicat indice de heterozigoție – 63,03%

În urma cercetării s-a identificat o creștere statistic semnificativă a frecvenței genotipului *MTRR A66G* (63,03%) în populația Republicii Moldova, ceea ce reprezintă un indice sporit de heterogenitate a populației. Populația țării noastre se caracterizează printr-un nivel sporit de heterozigozitate după polimorfismul *rs1801394* ($H_o=0,43$).

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 al unei secvențe, formate din 27 pb în intronul 4 al genei, este asociat cu o scădere a nivelului de NO în plasma sangvină și s-a dovedit a fi un factor ce provoacă o schimbare a nivelului de nitriți și de nitrați în plasmă. Studiarea polimorfismului genei *eNOS* a demonstrat că la persoanele homozigote după alela 4a este ridicat nivelul nitriților și al nitraților în sânge, el fiind direct asociat cu viteza de producere a oxidului nitric de către endoteliul vaselor [135]. Numeroase studii epidemiologice indică faptul că polimorfismul ar putea afecta funcțional nivelul de NO-sintază [228].

Una dintre sarcinile prezentei lucrări a fost identificarea polimorfismului genei *eNOS*, pentru aceasta au fost cercetate 128 de persoane care nu prezentau semne de miodistrofie, prin amplificarea intronului 4 utilizând metoda PCR, cu primerii corespunzători.

În urma studiului genotipului acestor persoane, s-a evidențiat următoarea frecvență a haplotipurilor respective: $4b/4b = 88$, $4b/4a = 32$, $4a/4a = 8$ (Anexa 8).

Conform legii Hardy-Weinberg, frecvența alelică în grupul de control a fost următoarea: $4b=0,81$, $4a=0,19$, iar frecvența genotipică observată: $4b/4b=0,66$, $4a/4b=0,31$, $4a/4a=0,03$. Prin urmare, a existat o deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 4,21$, $p=0,04$).

Factorii genetici pot condiționa disfuncția endotelială, care este prezentă în mai multe patologii, inclusiv în miopatii [132, 229], în boli cardiovasculare ș.a. Un polimorfism în intronul 4 al genei *eNOS* a fost raportat în mai multe populații sănătoase [230], dar are și asocieri cu diferite maladii [231].

Republica Moldova are o populație eterogenă, de aceea a fost comparată frecvența alelică și genotipică după intronul 4 al genei *eNOS* în diferite populații, obținând diferențe față de datele din populațiile poloneză, japoneză, braziliană, irakiană și indusă (Tabelul 4.1). Diferențe semnificative statistic în ceea ce privește frecvența alelei *4a* în Moldova, Polonia, India și Brazilia nu s-au depistat, însă, s-au constatat diferențe statistice esențiale la populațiile japoneze și irakiene. De asemenea, s-a constatat o sporire evidentă a frecvenței genotipului heterozigot *eNOS 4a/4b* în populația Moldovei, Poloniei, Braziliei și Indiei [130, 141] (Figura 4.5).

Tabelul 4.1. Distribuția genotipurilor și frecvența alelei mutante *4a* în populațiile sănătoase

Țara	<i>4a/4a</i> , n(%)	<i>4a/4b</i> , n(%)	<i>4b/4b</i> , n(%)	Alela <i>4a</i>	Referințe
Brazilia (n=94)	5 (5,3)	29 (30,9)	60 (63,8)	0,207	Bellini ș.a.
Polonia (n=321)	4 (1,0)	81 (25,0)	236 (74,0)	0,140	Buaczynska ș.a.
Japonia (n=248)	0 (0,00)	47 (19,0)	201 (81,0)	0,095	Nagase ș.a.
Iran (n=158)	1 (0,6)	29 (18,4)	128 (81)	0,098	Salami ș.a.
India (n=283)	13 (4,6)	89 (31,4)	181 (64)	0,31	Munshi ș.a.
Moldova (n=128)	8 (6,25)	32 (25,0)	88 (68,75)	0,19	Studiu propriu

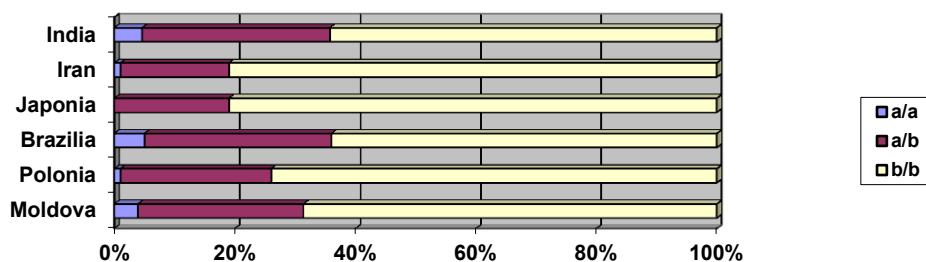


Fig. 4.5. Frecvențele genotipice ale polimorfismului *4a/4b* al genei *eNOS* în Republica Moldova și în diferite populații

În acest studiu a fost cercetat ADN-ul la 148 de persoane cu DMD/B pentru polimorfismul 4a/4b al genei *eNOS*. Testele au evidențiat următoarea frecvență a haplotipurilor respective: 4b/4b = 87 persoane, 4b/4a = 43, 4a/4a = 18 (Anexa 8).

Calculând frecvența alelei *a* din intronul 4 al genei *eNOS* după formula Hardy-Weinberg, a fost stabilită că alela dată apare cu o frecvență considerabil mai mică (0,27) decât alela *b* (0,73), frecvența genotipică înregistrată fiind: 4a/4b = 0,39, 4b/4b = 0,54, 4a/4a = 0,07. Se observă o deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 9,8$) [234].

Acest fapt sugerează ideea că gena *eNOS* poate fi un factor genetic modificator în procesul de miopatoză și indică o informativitate înaltă a acestui polimorfism, ceea ce permite includerea acestei gene în complexul de gene și factori modificatori pentru pronosticarea miopatiilor prin metoda PCR.

Analizând datele obținute, a fost constatată o diferență între frecvența alelică și cea genotipică în grupurile investigate. Indicele frecvenței alelei mutante *eNOS4a* și al incidenței genotipului 4a/4a erau mai mari la pacienții cu miopatoză. Analiza asocierii polimorfismelor genei *eNOS* a identificat o creștere statistic semnificativă a frecvenței genotipului 4a/4a (OR = 2,28; 0,94-5,51 95%CI; $\chi^2 = 3,45$, p=0,06) la bolnavii cu DMD/B, comparativ cu grupul de control (Anexa 8). De asemenea, după modelele multiplicativ și aditiv, au fost depistate abateri statistic semnificative ale indicilor riscului de progresare a procesului miopatic (OR = 2,08; 0,87-4,95 95%CI; $\chi^2 = 3,96$, p=0,05) la pacienți cu DMD/B, comparativ cu cei din grupul de control [217].

Aceste rezultate demonstrează ipoteza că alela *eNOS4a* conduce la creșterea nivelului de NO bazal în celulă, care este în cantități mari, are efect nociv asupra celulei, iar celulele musculare au deja un metabolism modificat înlănțuit cu genele declanșatoare de miopatii. Așadar, alela *eNOS4b* are un efect dăunător în cazul miopatiilor.

Din datele analizate rezultă faptul că incidența alelei *eNOS4a* și a genotipului heterozigot *eNOS4b/4a* este mai înaltă în grupul de cercetare. Totodată, a fost stabilit că gena *eNOS* este un factor genetic care participă în miopatoză. Conform datelor obținute, alela *eNOS4b* este caracterizată prin cinci repetiții cu lungimea de 27pb, iar alela *eNOS4a* este asociată cu patru repetiții VNTR, ce reprezintă patru segmente de micro-ARN ce participă la reglarea nivelului de funcționalitate a genei responsabile de sinteza enzimei NO-sintazei.

Așadar, prezența alelei *eNOS4a* determină un nivel cu 25% mai ridicat de nitriți și nitrați în sânge, ceea ce este legat direct de nivelul de NO bazal în celulă. Ca rezultat, la persoanele purtătoare de alelă *eNOS4a*, nivelul de Ca^{2+} în celulă se restabilește mai greu, deoarece în mod

normal NO, prin activarea guanilat ciclazei, duce la creșterea pătrunderii ionilor de K și scăderea nivelului de calciu. În cazul homozigoților după alela mutantă a genei eNOS, la care nivelul de NO este de circa două ori mai ridicat decât cel normal, și al heterozigoților, care ocupă o poziție intermediară, restabilirea nivelului ionilor de calciu în celulă este mai dificilă, ceea ce, la rândul său, provoacă relaxare sau slăbiciune musculară.

Corelația genotip – fenotip la persoanele cu DMD/B evidențiază faptul că pacienții cu DMD/B homozigoți după alela *4b* a genei *eNOS* prezintă particularități fenotipice mai favorabile în raport cu patologia respectivă, adică procesul miopatic la aceștia este mai redus; la pacienții cu DMD/B heterozigoți (*eNOS 4a/4b*), procesele miopatice sunt mai grave, comparativ cu cei homozigoți (*eNOS 4b/4b*), dar vizibil mai reduse decât la cei cu DMD/B homozigoți recesivi după alela *4a/4a* a genei *eNOS*. Legătura acestui polimorfism cu etiopatogeneza miopatiilor este evidentă.

Având în vedere rezultatele cercetărilor, se recomandă administrarea preparatelor de Ca și arginină pacienților cu genotipul homozigot după alela *4a* și celor cu genotipul heterozigot.

S-a demonstrat faptul că miopatiile sunt de tip ereditar și polimorfismul genei *eNOS* ar putea fi considerat un factor implicat în apariția proceselor miopatice și care sporește patogeneza miopatiilor prin efectele produsului său în organism, așa ca sinteza macroergilor, care sunt principalele surse de energie celulară, prin împiedicarea eliminării noradrenalinei din terminațiile neuronilor, scăderea nivelului de calciu în celule și mărirea concentrației de cGMP, ce duce la relaxarea celulară.

4.4. Concluzii la capitolul 4

1. Conform rezultatelor obținute, am stabilit că frecvența alelică a genelor *MTHFR* (rs 1801133, rs1801131) și *MTR* (rs1805087) în grupul control și de studiu corespunde frecvențelor teoretice, conform legii Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).
2. Analiza frecvențelor alelice ale polimorfismelor *MTHFR* (rs1801133, rs1801131), *MTRR* (rs1801394), *eNOS4a/4b* la grupul control din Republica Moldova și la cea din alte state nu a relevat diferențe semnificative statistice, spre deosebire de polimorfismul *MTR* (rs1805087). La compararea frecvenței genotipului *MTRRA66G*, populația R. Moldova se deosebește de toate regiunile investigate, înregistrând cel mai ridicat indice (63,03%).
3. Analiza raportului de șanse a demonstrat o asociere statistic semnificativă a genotipului *MTRRG66G* cu un risc crescut de 7,2 ori; genotipului *MTHFR A1298C* cu un risc crescut de 1,7 de înrăutățire a manifestărilor clinice ale pacienților cu DMD/B și de 2,3 ori pentru gena *eNOS* la purtătorii *4a/4a*. Genotip *MTR A2756G* are un efect protector.
4. A fost optimizată metoda de screening molecular-genetic al polimorfismelor *MTHFR C677T*, *A1298G*, *MTR A2756G* și *MTRR A66G* prin tehnica PCR-RFLP (panel de diagnostic), fiind elaborat un act de implementare.
5. Nivelul de informativitate al tuturor polimorfismelor este sporit, iar datele pot fi utilizate și în alte cercetări în populația din Republica Moldova.

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

5.1. Evaluarea impactului polimorfismelor genelor ciclurilor folat, metioninic și genei funcției endoteliale asupra evoluției proceselor miopatie

În prezent se acordă o atenție sporită cercetării proceselor genetice și biochimice care se produc în țesutul muscular în cazul DMD [232]. Se studiază rolul diferitor gene care ar putea determina severitatea DMD [233]. Astăzi, cercetările se axează pe căutarea explicației faptului existenței a două tipuri de evoluție a maladiei DMD și a factorilor ce determină debutul procesului miodistrofic. Aceste probleme se discută la conferințe de nivel mondial (MDA, ESHG, EFNS etc.), atenția prioritară acordându-se mecanismelor moleculare în miodistrofii, studierii expresiei genelor [73] și elaborării algoritmului terapiei [234 - 236].

În anii 1970-1980 a fost descoperită gena DMD, ce codifică proteina distrofina. S-a stabilit că gena este localizată în mijlocul brațului scurt al cromozomului X, pe segmentul Xp 21; a fost depistată partea codificatoare a genei și determinată secvența de nucleotide (G. Leisti, 1975; Koenig, 1987; A. Monaco, 1986). S-a constatat că 65% din pacienți cu DMD prezentau o deleție a genei, iar 6% – duplicarea de diferită lungime și localizare (J. Chamberlian, J. Den Dunner, X. Hu).

În anul 1988, A. Monaco 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 sau ea este absentă. 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 [237].

Ulterior s-a stabilit că la aproximativ 92% din pacienți se poate explica diferența în evoluția clinică a miodistrofiei prin această ipoteză, dar în caz de deleție a exonilor 3-7 și în cazul devierii cadrului de citire se dezvoltă tabloul clinic al miodistrofiei Becker [238,3]. 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 [239, 240].

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

Cercetarea eşantionului de pacienți cu DMD a arătat că manifestarea clinică a delețiilor mici a prezentat o variabilitate mare pentru aceiași exoni. De exemplu, cele 16 persoane cu DMD și deleția exonului 45 prezentau diferite grade de tulburări de mișcare la momentul consultului nostru (adresare primară) și diferită vârstă de plasare în scaunul cu roțile – unii la 8-9 ani, alții la 12-13 ani. Au existat și cazuri în care la 16 ani bolnavii mergeau independent. De asemenea, am atestat un pacient cu deleție extinsă a exonilor 45-49, fapt ce nu a condus la schimbarea cadrului de citire, persoana în cauză păstrându-și capacitatea de deplasare independentă până la vârsta de 49 de ani (Figura 5.1 A, B) [241].



Fig. 5.1. A – pacient DMB, 49 ani, merge independent [241]; B – pacient DMD, 9 ani, nu se poate deplasa independent (experiență personală)

S-au făcut încercări de a clasifica pacienții în funcție de etapele maladiei. Thompson și Vignos au propus, în 1959, a se distinge 11 etape de dezvoltare a bolii. Svinard, Deaver și Greenspan (1957), evaluând activitatea motorie zilnică a pacienților cercetați, au evidențiat 8 etape de dezvoltare.

În scopul de a facilita monitorizarea procesului patologic în studiul bolii la diferiți pacienți, profesorul L.P. Grinio, în 1998, a propus a se distinge 6 etape ale bolii [229]. Iată clasificarea sa privind procesul patologic după etapele maladiei:

I etapă este evidențiată pe baza datelor care descriu caracteristicile biochimice și morfologice ale mușchilor scheletici la copii, fără detectarea simptomelor clinice ale bolii. Aceste date sugerează că procesul a început deja, dar boala încă nu se manifestă clinic.

Etapa III se caracterizează prin simptome clinice minore, leziuni musculare reduse, care sunt descoperite la un examen neurologic minuțios, dar prin examinare musculară manuală.

Etapa II-III reprezintă o etapă de tranziție mai bogată în simptome clinice de lezare a mușchilor scheletici, care sunt descrise ca criterii de diagnostic. La începutul acestei etape, pacientul cu mușchii centurii pelviene lezați continuă să se miște bine și se poate ridica din pat, însă la sfârșitul ei pierde abilitățile de a se deplasa independent. În această etapă se pot manifesta simptomele clinice (Figura 5.2 A).

Etapa III apare când pacientul își pierde capacitatea de a se deplasa. La începutul acestei etape, el stă mai mult în scaunul cu roțile.

Etapa IVA – pacientul prezintă imobilitate severă, el nu are putere de a sta în cărucior (pacient imobilizat la pat).

Etapa IVB – pacientul nu poate să se întoarcă în pat de sine stătător. Aceasta este etapa finală (Figura 5.2 B).



Fig. 5.2. A – pacient cu DMD, etapa II-III a maladiei;
B – pacient cu DMD, etapa IV (experiență personală)

Împărțirea în etapele enumerate mai sus este schematică. Între etapele maladiei există, desigur, etape de tranziție. De exemplu, copilul în etapa a III-a (în scaunul cu roțile), cu simptome pronunțate, cu pierderea capacității de deplasare independentă, se deosebește de copilul care se află la începutul acestei etape, care are mai multe posibilități funcționale. Etapele de tranziție indică trecerea la etapa următoare și se reflectă în rezultatele cercetării biochimice.

În prezent, datorită lucrului comun al experților internaționali, susținuți de Centrele de Monitorizare și Profilactică a Maladiilor din SUA, cu participarea Organizației de apărare a

pacienților ce suferă de miodistrofie Duchenne și Asociației de Studiere a Metodelor de Tratatament ale Maladiilor Neuromusculare (TREAT-NMD) [242], în anul 2010 au fost elaborate și prezentate Principiile de diagnostic și acordare a ajutorului medical, cu descrierea etapelor maladiei [153]. Potrivit acestui document, se delimitează:

1. Etapa asimptomatică;
2. Etapa timpurie, cu păstrarea capacității de deplasare independentă;
3. Etapa târzie, cu păstrarea capacității de deplasare independentă;
4. Etapa timpurie de dereglare a capacității de mișcare;
5. Etapa târzie de dereglare a capacității de mișcare.

În conformitate cu recomandările actuale, această patologie are o denumire comună începând cu anul 2010 – *distrofinopatie* – și se caracterizează prin următorul fapt: în cazul în care copilul nu a fost plasat în scaun cu roțile până la 12 ani, boala este considerată benignă (de exemplu, DMB).

Încercarea din acest studiu de a efectua modelarea permite aprecierea rolului și a importanței factorilor genetici (în cazul dat – genele ciclurilor folat, metioninic și ale disfuncției endoteliale) în raport cu progresarea bolii și prognosticul procesului patologic, deoarece fenotipul fiecărui pacient este o reflectare a genotipului său, realizat ca parte a rețelelor de gene locale și de gene integrale.

Pentru aprecierea rolului anumitor semne clinice (cum este puterea musculară la primul consult), genetice (deleții în gena distrofinei: cu și fără schimbarea cadrului de citire) și a influenței polimorfismelor genelor ciclului folat și celui metioninic asupra vitezei de progresare a procesului miopatic, a fost utilizată metoda regresiei logistice multinominale [243, 244].

Am considerat timpul variabil de plasare în scaunul cu roțile între 9 și 12 ani ca o variabilă dependentă, iar ceilalți factori (puterea mușchilor triceps și biceps la prima examinare [229], tipul deleției în gena distrofinei, genotipul genelor candidate) – ca variabile independente.

Prin **Modelul A** a fost verificată ipoteza Monaco – dacă tipul deleției (*in-frame* sau *out-of-frame*) influențează asupra timpului de plasare în scaunul cu roțile în populația pacienților cu DMD/B din R. Moldova. Prin prima variantă a fost analizat **modelul A-1**, în care variabila dependentă a fost timpul de plasare în scaunul cu roțile până la 9 ani. Au fost analizate cele 171 de cazuri, dintre care 65 (38%) bolnavi au ajuns la incapacitatea de a se deplasa, iar 106 (62,0%) se pot deplasa de sine stătător. Totodată, 35,1% bolnavi prezentau deleții fără devierea cadrului de citire, 45,0% aveau deleții cu devierea cadrului de citire, iar la 34 (19,9%) nu au fost depistate deleții.

Conform acestui model, a fost obținută o diferență statistic ne semnificativă ($p=0,48$) în ce privește cota pacienților care au fost plasați în scaunul cu roțile până la 9 ani: 35% în caz de deleție in-frame, 42,9% în caz de out-of-frame și 32,4% în cazul neidentificării deleției.

Varianta **modelului A-2** – variabila dependentă a fost plasarea în scaunul cu roțile până la 12 ani. Din toate cele 171 de cazuri examinate, 67,3% pacienți cu DMD/B au fost plasați în scaun până la 12 ani, 32,7% mergeau. Din cei 171 bolnavi, 77 (45%) aveau deleții cu devierea cadrului de citire. Modelul comun al regresiei nu a fost veridic ($p=0,156$), dar criteriile parametrului de plasare în scaunul cu roțile la 12 ani sunt mai justificate decât la 9 ani.

Analizând contribuția parametrilor tipului de deleție, a fost obținută o valoare statistic ne semnificativă, dar cu tendința spre reflectarea parametrului important – deleția *out-of-frame* $p=0,061$, valoarea funcției exponențiale – 2,250 în aprecierea parametrică $\beta=0,811$, cu interval de încredere 0,964-5,249 pentru acest parametru.

Cu ajutorul acestui model am determinat că 65% din bolnavii cu DMD/B au ajuns în scaunul cu roțile în caz de deleții in-frame, la fel ca și 74% din cei cu deleții out-of-frame și 55,9% bolnavi cu deleție neidentificată în gena distrofinei (Figura 5.3).

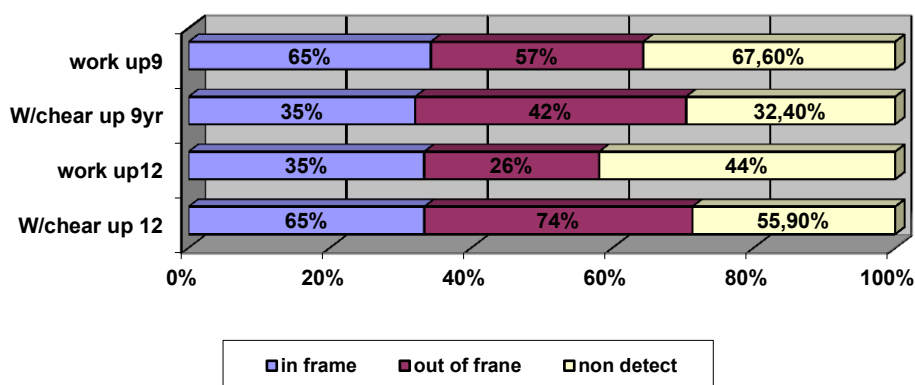


Fig. 5.3. Procentul bolnavilor cu DMD/B care au capacitatea de a se deplasa până la 9 și până la 12 ani, în funcție de tipul deleției în gena distrofinei.

Astfel, datele obținute nu indică o confirmare evidentă a metodei modelării teoriei „cadrului de citire” în eșantionul nostru de pacienți. Într-adevăr, procentul de pacienți plasați în scaunul cu roțile și care poartă deleție în gena distrofinei, ce conduce la schimbarea cadrului de citire, este mai mare decât procentul celor cu deleții ce nu afectează cadrul de citire, dar această diferență nu este statistic semnificativă.

Modelul B. Cu ajutorul acestui model, a fost analizat rolul aprecierii *forței mușchilor la prima examinare*.

Modelul B-1 era constituit dintr-o variabilă dependentă – plasarea în scaunul cu roțile la 9 ani – și două variabile independente: *tipul deleției și puterea mușchilor*. Acest model s-a dovedit a fi statistic semnificativ: $\chi^2 = 46,62$, $df = 5$, $p=0,00$. Indicele contribuției parametrului puterea mușchilor a avut de asemenea valoarea semnificativă statistic – $p=0,023$. Evaluarea puterii musculare este un parametru foarte important la prima examinare, pentru a prezice evoluția bolii. Totuși, acest parametru este parțial subiectiv, acesta depinzând de sensibilitatea individuală a medicului.

Astfel, dacă puterea musculară este apreciată ca fiind = 0, acest simptom denotă o slăbire pronunțată a mușchilor. Evoluția DMD depinde și de tipul deleției: în cazul lipsei devierii cadrului de citire, 60% pacienți din grupul studiat prezentau stadiul IV al maladiei (bolnav în cărucior). Pacienții la care s-au atestat devieri în cadrul de citire aveau o stare mai gravă, 88,2% din aceștia se deplasau în cărucior.

Modelul B-2: cu ajutorul lui a fost apreciată dependența plasării în scaunul cu roțile până la vârsta de 9 ani de puterea musculară și de genotipurile *locilor polimorfi ai genelor ciclului folat și celui metioninic*. Modelul este statistic semnificativ ($\chi^2 = 54,15$, $df = 10$, $p=0,001$).

Analizând aportul tuturor parametrilor incluși în acest model, au fost obținuți doi parametri statistic semnificativi pentru necesitatea plasării în scaun până la 9 ani: puterea musculară – 0, $p=0,000$, valoarea funcției exponențiale – 601961611,607, la evaluarea parametrică 20.216 și pentru parametrul MTHFR 677 – 1 (stare heterozigotă) – $p=0,004$, valoarea funcției exponențiale – 3,712 la evaluarea parametrică 1,311.

Modelul C ne-a permis să analizăm relația dintre genele ciclului folat și celui metioninic și timpul plasării în scaunul cu roțile. Au fost propuse două modele cu variabile dependente: 9 și 12 ani.

Modelul C-1 – plasarea în scaunul cu roțile până la 9 ani: modelul s-a dovedit a fi statistic nesemnificativ ($p=0,12$), în conformitate cu informațiile furnizate cu privire la abordarea modelului. Totuși, testele raportului de risc pentru modelul trunchiat care exclude factorul principal, ce exprimă nivelul de importanță $p=0,01$, indică faptul că factorul *MTHFR677* are efect statistic semnificativ asupra variabilei dependente – de plasare într-un scaun cu roțile în perioada până la 9 ani.

Aprecierea parametrilor regresiei, care pentru factori se numește „evaluarea situației” [245], ne permite să interpretăm influența parametrilor separați și ne indică nivelul acestei influențe. Evaluarea pozitivă a factorului *MTHFR677T*, în stare heterozigotă ($\beta=1,1$) și

*MTHFR*C1298C, în stare homozigot TT ($\beta=1,1$) arată că categoriile corespunzătoare acționează în calitate de variabilă dependentă de categorie înaltă (Tabelul 5.1).

Tabelul 5.1. Parametrii evaluării

Plasarea în scaunul cu roțile la vârsta de 9 ani	Estimarea (β)	Eroarea-standard	Wald	df	Semnificația	Exp(B)	95% intervalul de confidență pentru Exp(B)	
							Limita inferioară	Limita superioară
Interceptor	-1,78	0,58	11,91	1	0,001			
<i>MTHFR C677T</i>	1,10	0,38	8,33	1	0,004	3,005	1,423	6,345
<i>MTHFR C1298C</i>	1,18	0,57	4,24	1	0,039	3,254	1,058	10,004
<i>MTHFR C677T</i> <i>MTHFR A1298C</i> <i>MTR A2756G</i>	33,67	2,10	257,02	1	0,000	418597797 076085,4	68269722803 84,59	25668220116 57792,0
<i>MTHFR C677T</i> <i>MTR A2756G</i> <i>MTRR A66G</i>	34,73	2,50	192,62	1	0,000	12055616 5557874, 50	89420061424 65,998	16253187525 7097440,0

Valoarea matematică a estimărilor parametrilor de regresie constituie un indice semnificativ pentru heterozigoții compuși *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G* și *MTHFR C677T* și *MTR A2756G*, *MTRR A66G* (Tabelul 5.1). Deci, aceste combinații de date la astfel de estimări ridicate ($\beta = 33,67$ și $\beta = 34,73$) au o mare influență asupra dezvoltării etapei IV a DMD până la 9 ani [246].

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 dizabilității, asigurată de model, a demonstrat că modelul este statistic semnificativ în general variabilă dependentă: plasarea în scaunul de invaliditate la 12 ani ($p=0,017$) [263].

Testele raportului de risc conțin modificări ale funcției de probabilitate pentru cazul în care este exclus principalul factor ce acționează; aceste modificări sunt exprimate prin valorile corespunzătoare ale testului χ [247, 248]. Nivelul de semnificație $p=0,003$ arată că factorul *polimorfismul în gena MTHFR 677* are o influență puternică asupra plasării în scaunul cu roțile în perioada de până la 12 ani. Totuși, analiza estimărilor parametrilor a arătat că la purtătorii homozigoți după alela mutantă *MTHFR677TT* are o influență semnificativă asupra variabilei dependente, dar indicele negativ ($\beta = -1.344$) atestă faptul că acești factori acționează ca cea mai mică categorie de variabile dependente, la 12 ani influența sa în dezvoltarea etapei a IV-a este minimă!

Modelul D include în sine variabila dependentă – plasarea în scaunul cu roțile până la 9 ani – și șase factori – *tipul deleției, cu abatere și fără, genele ciclurilor folat și metioninic și diagnosticul (DMD sau DMB)*. Informațiile privind apropierea, furnizate de model, arată că acesta este semnificativ statistic ($\chi^2 = 25,5$, $df = 6$, $p=0,000$). Testele raportului de risc conțin modificări ale funcției de probabilitate pentru cazul în care este exclus principalul factor ce acționează; aceste modificări sunt exprimate prin valorile corespunzătoare ale testului χ^2 . Nivelul de semnificație $p<0,001$ arată că factorul *diagnosticul* are efect important, iar factorii *MTHFR677* și *MTHFR1298* au efect semnificativ asupra variabilei dependente (de plasare în scaun la 9 ani), $p=0,006$ și, respectiv, $0,016$.

Astfel, prezentul studiu a relevat o gamă limitată de factori care influențează plasarea bolnavilor în scaunul cu roțile până la 9 ani: prezența mutațiilor în locii polimorfi *MTHFR677*, *MTHFR1298* și diagnosticul. Printre acești factori, diagnosticul are o influență mai mare, având o valoare foarte semnificativă statistic, și evaluarea situației indică faptul că această categorie acționează ca cea mai înaltă categorie a variabilei dependente. Criteriile pentru diagnosticul clinic al DMD sau DMB sunt separarea acestei maladii conform evoluției bolii: evoluție benignă DMB, și anume instalarea târzie a etapei a IV-a a bolii, și evoluție malignă – DMD, stadiul incipient al dezvoltării maladii. Factorii polimorfismul C677T, A1298C în gena *MTHFR* au de asemenea un efect semnificativ asupra variabilei dependente, dar bilanțul negativ demonstrează acești factori acționează în categoria valorilor scăzute ale variabilelor dependente, comparativ cu diagnosticul.

Deoarece în modelele anterioare forța musculară s-a dovedit a fi un factor foarte puternic, cu influență asupra parametrului de plasare în scaunul cu roțile până la 9/12 ani, este deosebit de important să fie determinate caracteristicile factorilor genetici care afectează puterea musculară. Așadar, scopul studiului nostru a fost de a analiza caracteristicile și a evalua factorii ce le determină. În **modelul E**, *puterea musculară* e parametru dependent. Acest model s-a dovedit a fi statistic semnificativ ($\chi^2 = 28,0$, $df = 16$, $p=0,032$). Modelul trunchiat a evidențiat un factor statistic semnificativ – gena *MTRR* ($\chi^2 = 12,30$, $df = 4$, $p=0,023$) [246]. Aprecierea parametrilor regresiei logistice a identificat patru factori statistic semnificativi ce acționează în calitate de categorii superioare ale variabilelor dependente: prezența stării homozigote după alela mutantă a genei *MTRR* ($\beta=20,98$, $p=0,0000$, la forța musculară – 0 puncte, și anume la începutul procesului miopatic, gena *MTRR* ($\beta=1,4$, $p=0,031$), *MTR* ($\beta=1,5$, $p=0,021$) și *MTHFR 677* ($\beta=1,5$, $p=0,021$) în stare heterozigotă. Aceștia au o influență mai mare asupra parametrului „*puterea musculară*”, la valoarea 1, la o manifestare malignă a bolii.

Astfel, prin construirea și testarea acestui model, am identificat tendințe specifice unui anumit proces, iar aceasta ne va permite să înțelegem modul de influență asupra acestui proces. De exemplu, am demonstrat că mutațiile în genele ciclului metioninic au o mare influență asupra stării mușchilor și forței musculare.

Modelul F include în sine variabila dependentă – plasarea în scaunul cu roțile până la vârsta de 9 ani – și alți cinci factori: genele *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *eNOS*. Informațiile privind apropierea plasării, furnizate de model, prezintă semnificație statistică ($\chi^2 = 101899$, $df = 67$, $p=0,004$).

Modelul G include în sine variabila dependentă – plasarea în scaunul cu roțile până la vârsta de 9 ani – și șase factori: *tipul deleției, cu sau fără abatere de la cadrul de citire, și polimorfismele studiate (MTHFR, MTRR, MTR, eNOS)*. Informațiile privind apropierea timpului plasării în scaunul cu roțile, furnizate de model, prezintă semnificație statistică ($\chi^2 = 126,369$, $df = 95$, $p=0,017$).

Astfel, după toate modelele statistic semnificative, putem determina probabilitatea de plasare în scaunul cu roțile a pacienților cu DMD și DMB la 9 sau la 12 ani (Anexa 12).

Așadar, după toate modelele statistic semnificative, putem determina probabilitatea de plasare în scaunul cu roțile 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 genelor ciclului folat și celui metioninic cu procesul miopatic

În conformitate cu postulatul clasic (formal) al geneticii, formulat de Lobasev în anul 1969, *”un anume semn fenotipic este rezultatul expresiei tuturor genelor, chiar dacă impactul acestora este extrem de redus”*. Respectiv, este corectă și teza inversa: *”fiecare genă acționează asupra unui semn anume al organismului, chiar dacă efectul ei fenotipic este extrem de redus”*. Prin recunoașterea adevărului acestei poziții în planul conceptului filosofic, s-ar putea de

remarcat neconstructivitatea ei în practică. Într-adevăr, pentru genetica medicală reprezintă un interes deosebit informația despre corelația unei sau altei patologii cu mutația unei gene (boli monogenice), despre mutațiile diferitor gene (boli poligenice) sau determinarea asocierii bolilor cu variantele alelice ale anumitor gene (boli multifactoriale) [249]. În acest context, genetica medicală ocupă un loc binemeritat în medicina teoretică și cea practică, contribuind în general la rezolvarea problemelor de diagnostic și profilaxie a patologiilor ereditare și a viciilor congenitale [250].

Actualmente, mai mulți cercetători studiază interacțiunea genotip – fenotip [251], interacțiunile intragenice nu doar în cazul maladiilor multifactoriale [252], dar și în cazul celor monogenice [253]. Descifrarea genomului uman, succesele funcționării genomicii și domeniilor sale afiliate (transcriptomica, proteomica, metabolica) au permis de a extinde imaginile noastre despre întreaga funcționare a genomului și a componentelor sale în diferite stadii ale ontogenezei normale sau patologice [254].

A apărut o nouă știință – *genetica integrată*, scopul căreia este de a generaliza tot volumul de cunoștințe despre funcționarea genomului și de a prognoza viitoarele căi de dezvoltare a genomului în secolul XXI. Firește, pentru însușirea acestui volum mare de informație este necesară o nouă abordare sistematică, cu utilizarea obligatorie a noilor tehnologii și metode de analiză. Tuturor acestor cerințe le corespund noile domenii ale genomicii, precum este informatica postgenomică, axată pe baza de date a organizării structural-funcționale a genomului uman. Succesele noii științe sunt asigurate de tehnologiile informaționale moderne și de metodele eficiente de analiză matematică [255].

O importanță deosebită în informatica postgenomică îi revine conceptului de ”rețea genică”. În conformitate cu acest concept, profesorul N.A. Kolcianova (Novosibirsk, Rusia) a definit rețeaua genică ca fiind grupul ce coordonează funcționarea genelor, întreține formarea semnelor fenotipice ale organismelor (moleculare, biochimice și fiziologice).

Au fost elaborate și dezvoltate rapid metodele reconstructive ale rețelelor genice ale diferitor sisteme metabolice importante ale organismului. În baza numeroaselor adnotări, de regulă, eterogenitatea puternică a datelor experimentale, obținute prin metoda structurală și funcțională a genomicii, transcriptomicii, proteomicii, metabolicii, a fost prelucrată o tehnologie specială pentru reconstrucția rețelelor genice ale omului, animalelor, plantelor [256, 257]. Cu ajutorul ei a fost creată baza de date Gen Net. Ea conține descrierea a 37 de rețele genice, responsabile de diferite funcții importante ale organismului uman, precum și informația despre

semnalele reglatoare și metabolice care controlează, integrează și corectează funcționarea acestor rețele genice [249].

Toate procesele din organism sunt rezultatul interacțiunii rețelelor sale genice. Fiind comunități funcțional autonome ale genelor și produsul expresiei lor, rețelele genice locale sunt integrate într-o rețea globală a organismului. În accepțiunea bioinformaticii, fiecare om este o rețea globală, formată din multitudinea rețelelor genice locale – „rețeaua rețelelor” [258].

Sunt studiate detaliat mecanismele ce interacționează și integrează rețelele genice, asigurând reglarea nivelului de glucoză în organism, sinteza hormonilor steroizi, funcționarea adipocitelor (celulelor țesutului adipos), mecanismele eritropoiezei, rețelele genice ale stresului oxidativ provocat de formele active ale oxigenului (reglarea-redox) [259].

Rețelele genice ale fiecărui nivel se intercalează între ele și controlează funcția rețelelor altor nivele [260]. Cu toate acestea, în calitate de integratori participă semnalele neurohormonale și metabolice, dar și anumite rețele genice – integratori. Integrarea orizontală este integrarea rețelelor genice ale aceluiași nivel, de exemplu, varianta paracrină de integrare a rețelelor genice cu insulina și glucoza, reglând nivelul de glucoză în sânge. Ca exemplu de integrare verticală poate servi rețeaua genică ce reglează sinteza hormonilor steroizi, care are trei nivele de ierarhie: hipotalamusul, hipofiza și glandele endocrine periferice. Este important de menționat că controlul normal al steroidogenezei la nivelul structurii celulare la toate aceste trei nivele are loc cu ajutorul unuia și aceluiași factor transcripțional – SF1 (factorul steroidogenic 1) [261].

În informatica postgenomică se deosebesc două tipuri esențiale de integrare a rețelelor genice. În prima variantă, ca integrator poate servi însăși rețeaua genică. De exemplu, rețeaua genică de reglare a ritmului circadian, primind din exterior semnale potrivite, dă ritmul de lucru al unui număr mare de rețele genice: de la reglarea proceselor metabolice până la ciclul celular. În calitate de alt mecanism de integrare a rețelelor genice pot servi diferiți metaboliți (glucoza, formele active ale oxigenului etc.) și semnale neurohormonale (hormoni, factorii de transcripție – SF1). Prin urmare, integrarea rețelelor genice este un factor esențial, determinând răspunsul adaptiv al întregului organism și al sistemului lui de întreținere a vieții la factorii exteriori.

Calitatea funcționării rețelelor genice locale, la fel ca și posibilitatea adaptării întregului organism la schimbarea permanentă a factorilor din mediul exterior, vor depinde de particularitățile genelor lor. Nu întâmplător genetica modernă este numită „genetică de interacțiune” [249]. Există interacțiunea genelor în interiorul rețelelor locale (interacțiunea genelor), între rețelele genice (interacțiunea integrală), precum și între rețelele genice și factorii mediului extern (interacțiunea adaptivă).

Toate organismele vii sunt sisteme deschise, ele mereu contactează cu mediul exterior, deci sunt rezultatul interacțiunii genomurilor lor cu mediul extern. Fiecare semnal care pătrunde în organism cauzează o reacție de răspuns a unei sau a altei rețele genice care, cu ajutorul integratorilor corespunzători, transmite semnalul altor rețele genice [262]. Eșecurile în rețelele genice cauzate de mutațiile genelor sau de funcționarea lor incompletă, datorată variantelor alelice, pot să distrugă total sau să denatureze semnificativ funcționarea rețelei genice integrale, adică a întregului organism.

În patogeneza fiecărei boli se implică o multitudine de gene funcționale, care sunt în strânsă legătură cu anumite rețele genice locale [257]. Alături de gena principală ce provoacă începutul bolii, întotdeauna sunt prezente altele, de tipul doi, numeroase gene modificatoare, efectele fenotipice ale cărora sunt determinate de factorii de mediu. Identificarea acestor gene, determinarea distribuirii caracterului funcțional la nivel local și la nivel integral al rețelelor genice este particularitatea interacțiunilor genice în boli monogenice și multifactoriale – fiecare însărcinare practică ține de informatica postgenomică. Savanții consideră că, în viitorul apropiat, utilizând metodele și tehnologiile bioinformaticii, pentru fiecare boală pot fi reconstruite „rețelele genice”, similare cu cele ale proceselor fiziologice normale ce se petrec în organism. Investigațiile științifice ne permit să pătrundem tot mai profund în tainele funcționării genomului, descoperind date despre mecanismele moleculare ale DMD/B.

În anul 2007, un grup de cercetători italieni au efectuat un studiu al profilului de expresie a genelor în mușchi, în stadiul incipient al distrofiei musculare Duchenne (DMD) [263]. În acest scop, au fost descrise modificările produse la nivelul țesutului muscular la copiii cu DMD cu vârsta de peste 5 ani. Prin studierea profilului de expresie la 19 pacienți cu vârsta mai mică de 2 ani, a fost descrisă cu rezoluție înaltă expresia genică caracteristică pentru mușchii afectați de DMD în perioada fazei inițiale sau „presimptomatice” a maladii. Astfel, s-a demonstrat că în primii 2 ani de boală, mușchiul afectat de DMD este deja setat să exprime un model distinctiv de expresie a genelor, care se deosebește considerabil de cel exprimat de un mușchi obișnuit, potrivit vârstei. Acest model „distrofic” de expresie se caracterizează prin inducerea coordonată a genelor implicate în răspunsul inflamator, remodelarea matricei extracelulare (ECM), regenerarea mușchiului și prin transcripția redusă a genelor implicate în metabolismul energetic.

În pofida gradului redus de disfuncție musculară în momentul efectuării experimentelor, pacienții cu vârsta mai mică au prezentat o expresie anormală a majorității genelor care au fost raportate ca având expresie diferențiată în stadii mai avansate ale bolii. La analiza pacienților peste o perioadă de timp, au fost furnizate dovezi că unele gene, inclusiv membrii a trei căi

implicate în semnalizarea morfogenetică – Wnt, Notch și BMP, sunt induse progresiv sau sunt reprimite în decursul progresării maladiei DMD [264]. Cert este că în viitorul apropiat noțiunile stabilite ale bolilor vor fi revăzute și completate pe contul progreselor funcționării genomicii, bioinformaticii și medicinei moleculare.

În anul 2017 a fost publicat un studiu în care au fost cercetate circa 100 de proteine asociate cu distrofia musculară Duchenne. În acest sens, s-a demonstrat că proteinele distrofina, utrofina, caveolin 3 și proteina de diferențiere miogenică 1 (Myod 1) joacă rolurile principale în rețeaua DMD (Figura 5.4) [265].

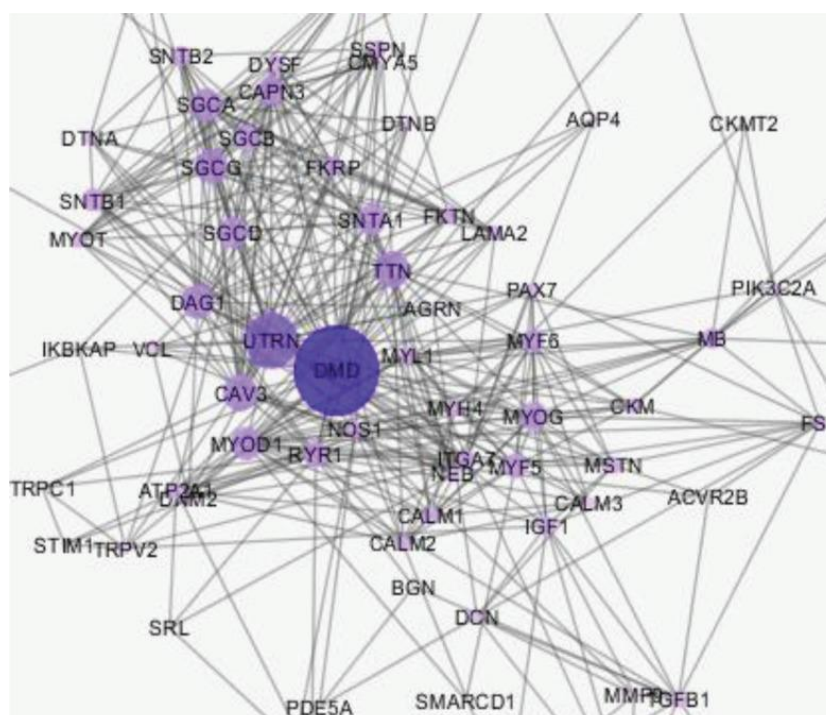


Fig. 5.4. Interacțiunea între proteine-proteine la DMD (analiza rețelei: 82 noduri și 395 unghiuri) [265]

Genele ce formează structurile de baza ale fiecărei rețele genice, polimorfe, precum și variantele lor alelice au funcții diferite. Aceasta înseamnă că și rețelele genice ale fiecărui om funcționează diferit. Datorită poliforfismului genetic, fiecare om are amprenta sa digitală biochimică, modul propriu de funcționare a reacțiilor biochimice, posibilitățile sale adaptive în condițiile funcționării factorilor nocivi ai mediului extern. Prin diversitatea genetică se explică faptul de mult cunoscut că toți oamenii se deosebesc unul de altul prin reacția individuală la agenții externi, la infecții, la produse alimentare, la acțiunea toxinelor și a preparatelor medicamentoase.

Luând în considerare datele din literatura de specialitate și ale analizei influenței genelor ciclului folat și ciclului metioninic asupra procesului miopatic prin metoda regresiei logistice multinomiale, etapa următoare a cercetării noastre este identificarea interacțiunii genelor cercetate, cu scopul de a determina combinațiile specifice ale alelelor, care ar putea avea o importanță patogenetică mai mare în dezvoltarea procesului miopatic. Pentru soluționarea acestui obiectiv, am utilizat metoda MDR (multifactor dimensionality reduction), special concepută pentru a studia natura interacțiunii genelor în cercetările populațional-genetice ale maladiilor complexe [266]. Ne-am propus să studiem caracterul interacțiunilor genelor modificatoare în studiul bolilor monogenice. În 2007, Ben Lehner a descris importanța modelării interacțiunii genotip – fenotip cu bolile umane și a definit relațiile intergenice [251]. Un avantaj important al acestei metode este posibilitatea utilizării sale la volume relativ mici de probe ale pacienților și ale populației sănătoase. Pe lângă aceasta, MDR oferă posibilitatea de a aprecia validitatea statistică a modelelor testate (cross-validation consistency, CVC) și de a calcula eroarea predicției modelului (prediction error, PE) [267].

Am analizat tipul și puterea de interacțiune a genelor la pacienții cu DMD/B care s-au plasat în scaun cu rotile, în perioade diferite de vârstă – până la 9 ani și până la 12 ani.

În rezultatul analizei tipului și a puterii de interacțiune genică între variantele polimorfe (pattern) ale genelor ciclului folat, celui metioninic și genei funcției endoteliale la pacienții cu dezvoltare a stadiului de boală în scaun cu rotile până la 9 ani, au fost identificate modele care descriu cel mai bine caracterul interrelației a 5 loci cercetați în 4 gene – *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTR* (A2756G), *MTRR* (A66G) și *eNOS4a/4b* – prin dezvoltarea stadiului procesului miopatic ce plasează bolnavii cu DMD/B în scaunul cu rotile.

În Tabelul 5.2 sunt prezentate cele mai semnificative modele de interacțiune genică cu 1, 2, 3 și 4 loci, identificate cu ajutorul algoritmului de căutare selectivă MDR în grupuri cu un clasificator binar – plasarea în scaunul cu rotile până la 9 ani (0) și plasarea până la 12 ani (1), în eșantionul de studiu al pacienților cu DMD/B.

Modelul cu un locus statistic semnificativ ($p=0,04$) a fost identificat pentru locusul polimorf *MTHFR* C677T, în ciuda gradului ridicat de reproductibilitate al acestui model – CVC= 9/10, acuratețea verificabil echilibrată a acestui model este egală cu 0.58 la sensibilitatea de 0,56 și specificitatea de 0,6, ceea ce demonstrează că acest parametru este semnificativ, dar sensibilitatea și specificitatea sunt mici pentru eșantionarea bolnavilor.

Programul a identificat două modele cu 2 loci. Primul model a fost identificat pentru locii polimorfi *MTHFR*C677T, *MTR*A2756G cu un grad înalt de interpretare, CVC = 8/10 și $\chi^2 = 8,87$

($p=0,003$). Vom menționa că pentru acest model este caracteristică o sensibilitate înaltă (0,74) și o specificitate mică (0,48). Al doilea model a fost identificat pentru locii *MTHFR*, *C677T*, *eNOS4a/4b* cu un grad înalt de interpretare, CVC = 10/10 și $\chi^2 = 5,03$ ($p=0,02$). Pentru acest model este caracteristică o sensibilitate înaltă (0,67), precum și o specificitate semnificativă (0,51).

Modelul cu 3 loci conține locii polimorfi *MTHFR*, *C677T*, *MTRA2756G*, *eNOS*, având o interpretare înaltă (CVC = 8/10) și un indice ridicat $\chi^2 = 18,34$ ($p<0,0001$). Precizia echilibrată formată a acestui model al interacțiunilor genice constituie 0,68 la sensibilitatea (SE) testului de 0,69 și specificitatea (SP) de 0,64.

Tabelul 5.2. Modelul interacțiunii genice (genele modificatoare) la plasarea în scaunul cu roțile a pacienților cu DMD/B până la 9 ani [263]

Tip de model	Tr. Bal. Acc.	OR (95%CI)	χ^2 (P)	SE	SP	CVC	Pre.
Model cu 1 alelă	MTHFR C677T						
	0,58	1,88 (1,00-3,52)	3,95 (0,04)	0,56	0,6	9/10	0,69
Model cu 2 alele	MTHFR C677T; MTRA2756G						
	0,62	2,67 (1,38-5,13)	8,87 ($p=0,00$)	0,74	0,47	8/10	0,70
Model cu 2 alele	MTHFR C677T; eNOS						
	0,60	2,09 (1,11-3,93)	5,03 ($p=0,02$)	0,67	0,51	10/10	0,61
Model cu 3 alele	MTHFR C677T; MTRA2756G; eNOS						
	0,68	4,04 (2,10-7,76)	18,34 ($p<0,00$)	0,69	0,64	8/10	0,76
Model cu 4 alele	MTHFR C677T; MTHFR A1298C; MTRA2756G; eNOS						
	0,76	8,85 (4,3-18,14)	39,82 ($<0,00$)	0,73	0,77	5/10	0,84

Notă. Tr. Bal. Acc. – precizie formată echilibrată; OR (95%CI) – amploarea raportului șanselor și intervalele de încredere; Sign Test. (P) – test de valoare; SE – sensibilitatea; SP – specificitatea; CVC – repetarea rezultatului; Pre. (precision) – exactitatea modelului.

Model cu cea mai mică eroare de precizie (0,84) a fost combinația de 4 alele ale variantelor polimorfe *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*; *MTRA2756G*, *eNOS*, cu reproductibilitatea CVC = 5/10 și $\chi^2 = 39,82$ ($p<0,00$). Valoarea raportului șanselor pentru acest model constituie 8,85 (4,31-18,14 95%CI), demonstrând că la creșterea cu o unitate a caracterului *i*, șansa severității miopatiei crește de 8,5 ori.

Astfel, 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 prezicere (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)

Mai mult decât atât, programul MDR ne permite reprezentarea grafică a structurii ierarhice și a naturii interacțiunilor diferitor gene, inclusiv dintre genele care nu sunt reprezentate în cele mai bune modele. Liniile lungi din dendrogramă descriu relația slabă dintre gene și, respectiv, cu cât mai scurte sunt liniile ce unesc două atribute, cu atât mai puternică este interacțiunea. Culoarea fiecărei linii descrie tipul de comunicare: roșu și portocaliu reprezintă interacțiuni sinergice, culoarea brună – efect independent (aditiv); culorile verde și albastru indică un antagonism moderat până la sever (dublarea efectului fiecărui atribut).

În cazul dat, noi am prezentat structura celui mai bun model cu 4 alele (Figura 5.5).

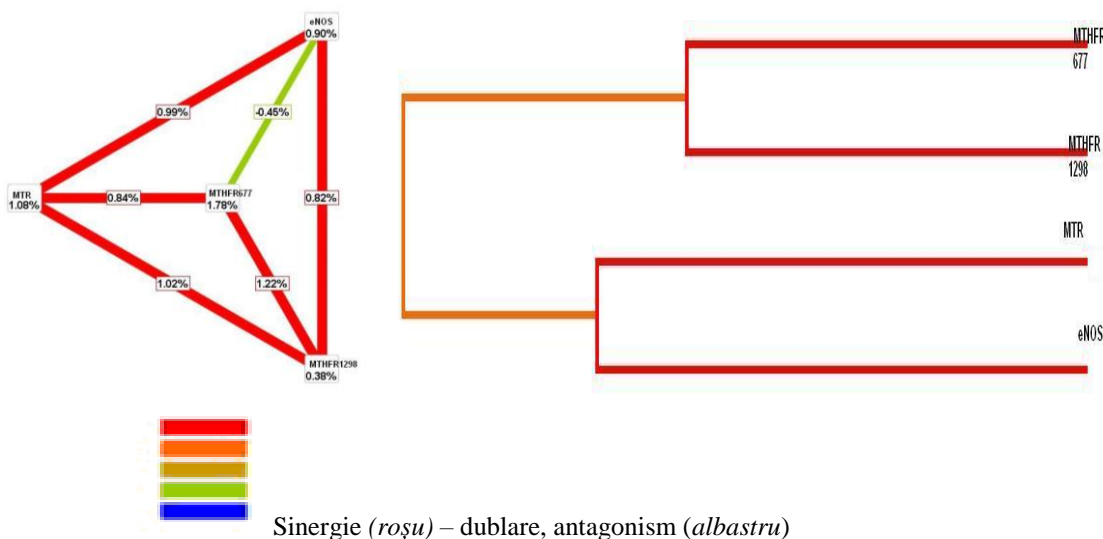


Fig. 5.5. Structura interacțiunii genice a variantelor polimorfe ale genelor ciclului folat, celui metioninic și genei eNOS la pacienții DMD/B la plasarea în scaunul cu roțile până la 9 ani (în grafic este reflectată puterea, interacțiunea dintre loci, dendrograma – analiza de cluster) [263]

Analiza de cluster permite de a evidenția interacțiunea variantelor polimorfe cercetate, care pot influența agravarea procesului miopatic în cazul DMD. Astfel, în Figura 5.5 este reprezentată dendrograma celui mai bun model al interacțiunii genice în grupul de cercetare (bolnavii DMD/B), care s-au plasat în scaunul cu roțile până la 9 ani, incluzând descrierea interacțiunii a 4 loci (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR*A2756G, *eNOS*4a/4b).

După cum se observă în figură, modulul este format din două cluster interconectate. Primul cluster include modulul cu sinergism exprimat (dublare pozitivă) privind impactul asupra

fenotipului – interacțiunea a doi loci, rs1801133 și rs1801131, din gena *MTHFR* (roșu), și activitatea genei este influențată anume de acești doi loci. Se observă o interacțiune mai puternică între acești loci în comparație cu al doilea cluster.

Al doilea cluster include modulul interacțiunii a două gene – *MTR* și *eNOS*, cu un sinergism la fel de exprimat privind 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 sinergism moderat al interacțiunii genelor (culoarea portocalie).

Pentru descrierea tipului și a puterii interacțiunii stabilite la bolnavii DMD care s-au plasat în scaun cu rotile până la 9 ani, a fost creat un grafic circular ce conține contribuția în % a fiecărui component (Figura 5.5). S-a identificat că influența locusului *MTHFR677* asupra plasării în scaunul cu rotile (trecerea în etapa IV) până la 9 ani constituie 1,78%, iar a locusului *MTR A2756G* – 1,08%. Prin urmare, mutațiile în acești loci prezintă un risc sporit de agravare a procesului miopatic și cauzează trecerea în etapa IV a maladiei până la vârsta de 9 ani. Contribuția perechii *MTHFR677* – *MTHFR1298* constituie 1,22%, iar a perechii *MTR A2756G* – *MTHFR1298* alcătuiește 1,02%.

Acest rezultat nu este contrar datelor literaturii de specialitate, care arată că la indivizii heterozigoți compuși după alelele 677T și 1298C, activitatea enzimei scade cu 40–50% și profilul biochimic este asemănător cu cel al purtătorilor homozigoți ai alelei 677T. Remetilarea homocisteinei în metionină este catalizată de enzima citoplasmatică metionin-sintaza (*MTR*). Pentru activitatea acestei enzime este necesară metilcobalamina, derivatul vit. B12. Enzima *MTR* asigură transformarea homocisteinei în metionină datorită reacției în care metilcobalamina joacă rolul purtătorului intermediar al grupării metil. În același timp, se produce oxidarea cobalaminei, enzima *MTR* trece în stare inactivă. Restabilirea funcției enzimei poate avea loc în timpul reacției de metilare cu participarea enzimei metionin-sintază-reductază (*MTRR*). În această genă sunt descrise diferite mutații și variante polimorfe. Polimorfismul 66AG (pI1e22Met) micșorează de 4 ori activitatea enzimei *MTRR*.

Utilizând programul, am construit grafic structura ierarhică și caracterul interacțiunii genelor studiate cu tipul delețiilor din gena distrofina (dendrograma): deleții cu afectarea cadrului de citire, fără afectarea cadrului de citire și deleții nedeterminate (Figura 5.6). După cum se vede din dendrogramă, modelul constă din trei cluster interconectate. Primul cluster este prezentat independent de celelalte gene (culoarea brună), aceasta coincide cu datele obținute cu ajutorul metodei multinominale. Al doilea cluster a unit locusul genei *MTRR* cu clusterul interdependent, interconectat cu al treilea cluster. Al treilea cluster conține două cluster – genele

ciclului folat (*MTHFR677*, *MTHFR1298*) și *MTR A2756G* (metionin sintaza) cu *eNOS*, cu efect sinergic pronunțat (culoarea roșie) în interiorul perechii și efect sinergic moderat (culoarea portocalie) între aceste două cluster. Se atestă un coeficient informațional ridicat (information gain – IG) pentru locusul *MTHFR677* (1,78%), locusul *MTR A66G* (1,08%) și *eNOS* (0,90%) [268].



Fig. 5.6. Dendrograma asocierii interacțiunii genelor cercetate cu delețiile din gena distrofina la bolnavii cu DMD/B la plasarea în scaunul cu roțile până la 9 ani [268]
 (Type – tipul deleției; MTHFR1 – locusul *MTHFR C677T*; MTHFR2 – locusul *MTHFR A1298C*; MTR- locusul *MTR A2756G*; eNOS – locusul *eNOS4a/4b*)

Schema circulară (Figura 5.7), suplimentar la modelele precedente, indică 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 sinergie 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*, *MTR A2756G* și *eNOS4a/4b* denotă o interacțiune aditivă a acestora în pereche.

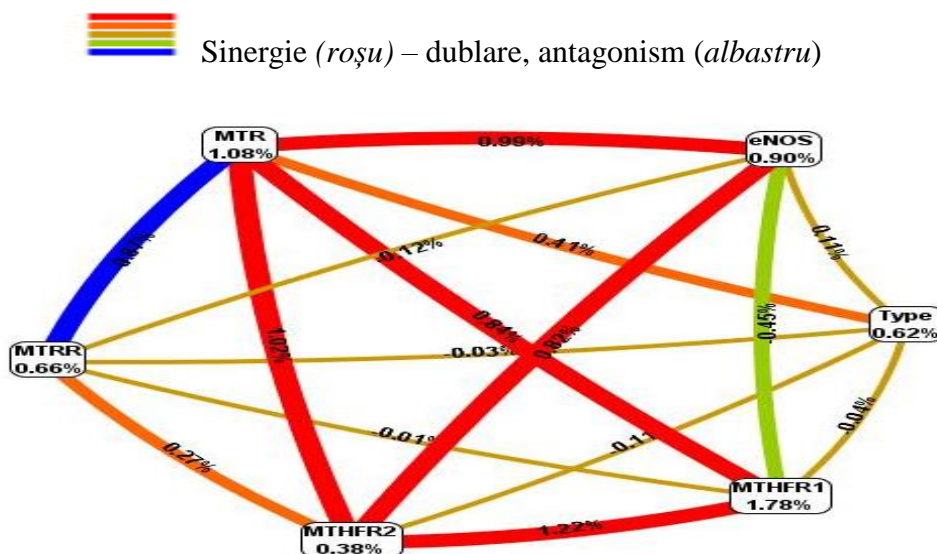


Fig. 5.7. Schema reflectă puterea interacțiunii celor 5 loci cu tipul deleției în cazul plasării în scaunul cu roțile până la 9 ani la bolnavii cu DMD/B [268]
 (Type – tipul deleției; MTHFR1 – locusul *MTHFR 677*; MTHFR2 – locusul *MTHFR 1298*; MTRR- locusul *MTRR 66*; MTR – locusul *MTR 2756*, eNOS – locusul *eNOS4a/4b*)

Programul MDR a oferit modelul de analiză a puterii și a tipului de interacțiune a variantelor polimorfe ale genelor-candidate la pacienții cu DMD/B, care s-au plasat în scaunul cu roțile până la 12 ani. Acestea descriu foarte bine caracterul interacțiunii locilor cercetați ai genelor *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* și *eNOS* în dezvoltarea etapei de plasare în scaun în cadrul procesului miopatic la bolnavii cu DMD/B.

În tabelul 5.3 sunt prezentate cele mai importante modele cu 1, 2, 3 și 4 loci ai interacțiunii genice. Model cu 2 loci a fost identificat pentru locii polimorfi ai genelor *MTR* și *eNOS*, cu un nivel de reproductibilitate scăzut – CVC = 4/10 și $\chi^2 = 11,15$ (p=0,00). Trebuie remarcat faptul că pentru acest model sunt caracteristice o sensibilitate (0,59) și o specificitate (0,68) scăzute.

Modelul cu 3 loci ce include genele *MTHFR C677T*, *MTR A2756G* și *eNOS 4a/4b* a avut o reproductibilitate înaltă (CVC = 8/10) și $\chi^2 = 30,75$ (p<0,0001). Precizia echilibrată formată a legăturii intergenice a modelului dat a fost de 0,72, cu o sensibilitate a testului de 0,66 și o specificitate de 0,77

Tabelul 5.3. Modelul interacțiunii genice (4 genele modificatoare) la plasarea în scaunul cu roțile a pacienților cu DMD/B până la 12 ani [263]

Tip de model	Tr. Bal. Acc.	OR (95%CI)	χ^2 (P)	SE	SP	CVC	Pre.
Model cu 1 alelă	<i>MTHFR A1298C</i>						
	0,58	1,94 (1,01-3,7)	4,0544 (p=0,04)	0,52	0,64	5/10	0,41
Model cu 2 alele	<i>MTRA2756G; eNOS4a/4b</i>						
	0,64	3,02 (1,56-5,85)	11,15 (p=0,00)	0,59	0,68	4/10	0,47
Model cu 3 alele	<i>MTHFR C677T; MTRA2756G; eNOS4a/4b</i>						
	0,72	6,67 (3,2-13,5)	30,57 (<0,0001)	0,66	0,77	8/10	0,59
Model cu 4 alele	<i>MTHFR C677T; MTHFR A1298C; MTRA2756G; eNOS4a/4b</i>						
	0,80	14,67 (6,7-32,15)	54,22 (<0,0001)	0,79	0,8	9/10	0,67

Notă. Tr. Bal. Acc. – precizie formată echilibrată; OR (95%CI) – amploarea raportului șanselor și intervalele de încredere; Sign Test. (P) – test de valoare; SE – sensibilitatea; SP – specificitatea; CVC – repetarea rezultatului; Pre. (precision) – exactitatea modelului.

Cel mai bun model cu cea mai mică eroare de predicție este modelul cu combinația a 4 alele ale locilor variantelor polimorfe *MTHFR C677T*, *MTRA1298C*, *eNOS4a/4b* cu un înalt nivel de reproductibilitate – CVC = 9/10, o precizie a modelului de 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 [263].

Analiza clusterului a permis identificarea interacțiunii variantelor polimorfice, care pot influența plasarea în scaunul cu roțile până la 12 ani în cazul maladiei DMD/B. Modulul este format din două cluster interlegate. Primul cluster include modelul cu sinergism pronunțat în ceea ce privește efectul asupra fenotipului între interacțiunea a doi loci a genelor *MTHFR677* și *MTRA2756G* (culoarea roșie), și anume activitatea genei se află sub influența acestor doi loci. Al doilea cluster include modulul interacțiunii a două gene – *MTHFR1298* și *eNOS*, de asemenea cu antagonism exprimat în relație cu efectul asupra fenotipului, unde activitatea unei gene se află sub influența altei gene care nu îi este alelă. La rândul lor, primul și al doilea cluster au arătat o reacție aditivă (neutră) între ele (culoare cafenie).

Pentru descrierea tipului și a puterii cooperării stabilite la bolnavii cu DMD/B plasați în scaunul cu roțile până la 12 ani, a fost realizată dendrograma celui mai bun model al interacțiunii genice sub formă de grafic circular, ce descrie contribuția fiecărui component în % (Figura 5.8).

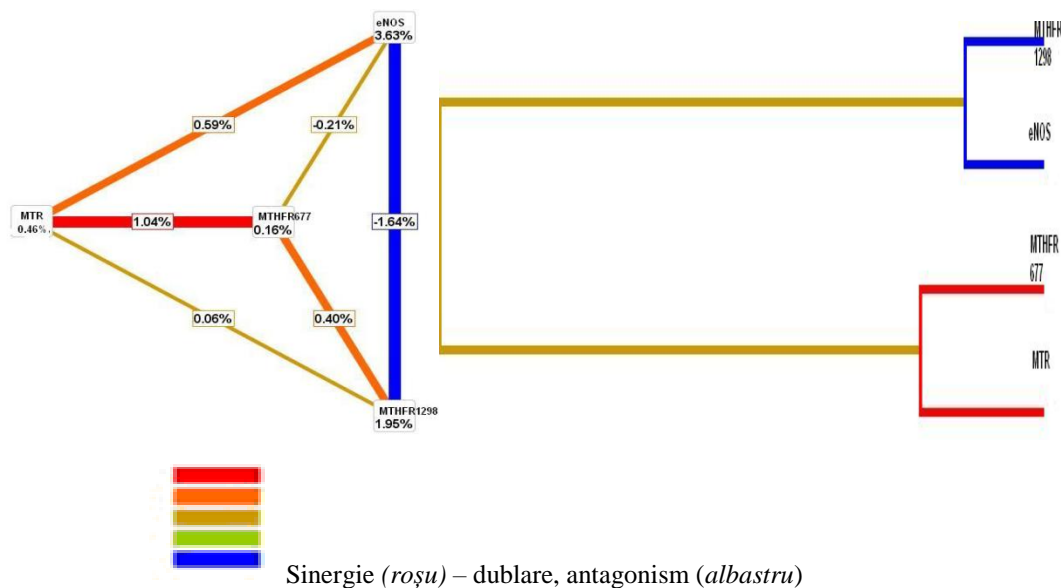


Fig. 5.8. Structura interacțiunilor genice ale variantelor polimorfe ale genelor ciclului metioninic și sintazei eNOS la bolnavii cu DMD/B la plasarea în scaunul cu roțile până la vârsta de 12 ani (analiză de cluster, grafic ce reprezintă puterea de interacțiune între loci) [263]

S-a demonstrat că influența locusului *MTHFR677* asupra procesului de plasare în scaunul cu roțile (trecerea la stadiul IV de boală) până la 12 ani scade (0,16%) în comparație cu influența acestuia în cazul cu vârsta de 9 ani (1,78%), de asemenea se observă scăderea influenței locusului *MTRA2756G* (0,48) în comparație cu influența acestuia la situarea în scaun la vârsta de

9 ani (1,08%). În schimb, la vârsta de 12 ani a crescut influența locusului MTHFR1298 (1,96%). De asemenea, s-au schimbat legăturile dintre perechi: efectul contribuției perechii *MTHFR677 – MTRA2756G* reprezintă 1,04%, perechii *MTRA2756G– eNOS* îi corespund 0,59%; s-a redus semnificativ efectul perechii MTHFR677 – MTHFR1298, alcătuiind 0,40%, în comparație cu modelul plasării în scaunul cu roțile până la 9 ani. În cadrul perechii *MTHFR1298 – eNOS* a apărut o influență dublă negativă pronunțată asupra fenotipului la pacienții de până la 12 ani. Efectul contribuției acestei perechi constituie (-1,64%), deci se observă un efect protector.

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 5.8), au fost identificate două clusteruri independente. Primul cluster independent a unit locii *MTHFR1298* și *eNOS* interlegați prin influența efectului dublu pronunțat (culoarea albastră). În clusterul al doilea, între locusul *MTHFR677* și tipul deleției și locusul *MTRA2756G* s-a stabilit o puternică interdependență sinergică (liniile roșii scurte), în care activitatea tipului deleției se află sub influența locusului *MTRA2756G*.

Conform graficului circular din Figura 5.9, a fost identificată creșterea influenței locusului polimorf *eNOS4a/4b* asupra dezvoltării etapei a IV-a a maladiei la 12 ani, în comparație cu starea pacientului la vârsta de 9 ani (3,63% și, respectiv, 0,90%).

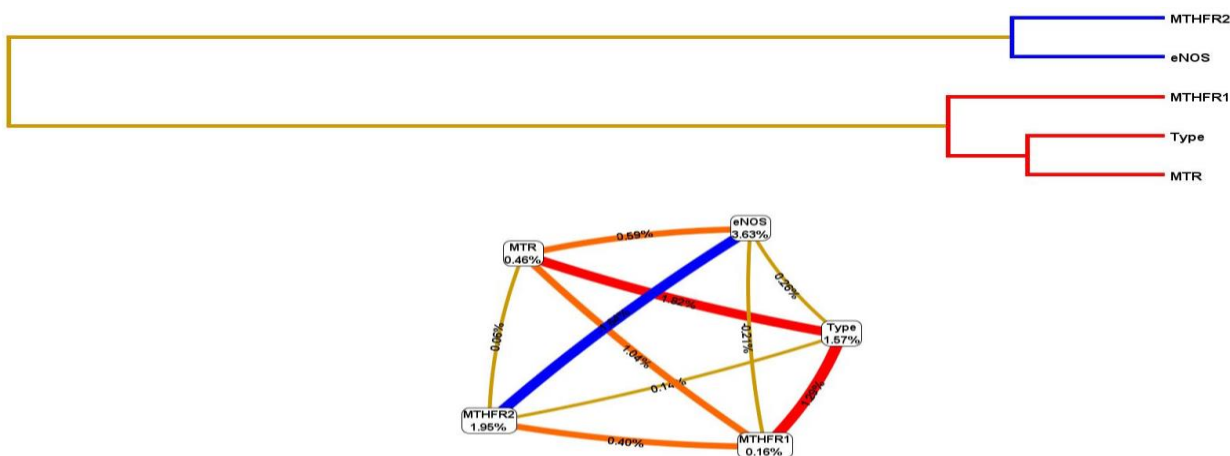


Fig. 5.9. Structura interacțiunilor genice ale variantelor polimorfe ale genelor modificatoare și tipul deleției în gena distrofina la bolnavii cu DMD/B sub 12 ani (sus – analiză de cluster, jos – grafic ce reprezintă puterea de interacțiune între loci) [268]
(Type – tipul deleției; MTHFR1 – locusul MTHFR 677; MTHFR2 – locusul MTHFR 1298; eNOS– locusul eNOS4a/4b)

Se poate de menționat că s-a majorat influența locusului MTHFR 1298 asupra pacienților de 12 ani, comparativ cu cei de 9 ani (1,96% versus cu 0,38%). Prin urmare, prin metoda

determinării asociației (descrișă în capitolul 4), s-a identificat că aceasta are efect protector. La vârsta de 12 ani crește influența tipului deleției (1,57% versus 0,62% la vârsta de 9 ani), ceea ce coincide iarăși cu rezultatele obținute. Totuși, în grupul pacienților de 12 ani se observă o influență slabă a genelor ciclului folat și metioninic, în comparație cu grupul bolnavilor care s-au plasat în scaunul cu rotile până la vârsta de 9 ani. Deci, influența locusului polimorf *MTHFR677* scade și constituie 0,16% în comparație cu influența în grupul copiilor care s-au plasat în scaunul cu rotile până la 9 ani (1,78%), locusul *MTRA2756G* constituie 0,46%, dar a fost 1,08%, iar locusul *MTRRA66G* își pierde importanța la acest grup de pacienți.

S-a modificat și interacțiunea în perechile de gene la diferite grupe de vârstă interacțiunea a genelor se schimbă în funcție de vârsta plasării în scaunul cu rotile, ceea ce ne permite să înțelegem procesele miodistrofice.

Astfel, în grupul pacienților cu plasarea în scaunul cu rotile până la 12 ani a fost identificat un efect antagonist puternic al interacțiunii dintre perechea *MTHFR1298 – eNOS*, coeficientul informațional (information gain – IG) constituie –1,64% (negativ), pe când în cadrul cercetării grupului de pacienți cu vârsta de până la 9 ani, interacțiunea acestei perechi era exprimată printr-un synergism puternic și un IG de 0,82%. Prin urmare, această pereche poate avea un efect protector.

De asemenea, se observă slăbirea interacțiunii altor perechi care au influențat printr-un synergism puternic la vârsta de 9 ani: *MTHFR677–MTHFR1298* (synergism moderat, IG = 1,07–0,06%), și anume doar impactul al ciclului folat la vârsta de 12 ani se micșorează, *MTRA2756G–eNOS* (IG = 0,98–0,59%), *MTRA2756G – MTHFR1298* (culoarea cafenie – 0, efect aditiv).

Este de menționat creșterea influenței perechii *MTRA2756G – tip de deleție* –synergism pronunțat la 12 ani (IG a crescut de la 0,4% la 9 ani până 1,82% la 12 ani). Astfel, ciclul metioninic și tipul deleției au o influență fundamentală asupra tabloului clinic la 12 ani.

Modificarea influenței (mai slabă decât în perechea descrișă mai sus) rămâne la perechea de gene *MTRA2756G–MTHFR677* la 12 ani (synergie moderată, IG = 0,84% până 9 ani și 1,04% până 12 ani), deci mutațiile compuse în genele ciclurilor folat și metioninic la vârsta de 12 ani au o influență mai mare asupra manifestărilor clinice decât la 9 ani.

Astfel, putem face următoarele concluzii:

1. A fost studiată contribuția variantelor polimorfe ale genelor ciclurilor folat, metioninic și ale genei funcției endoteliale la determinarea riscului genetic în progresarea rapidă a procesului miopatic.

2. Au fost analizate tipul și puterea interacțiunii genice a variantelor polimorfe ale genelor studiate la pacienții cu diferită vârstă de plasare în scaunul cu rotile – la 9 și 12 ani.

3. S-a identificat un sinergism pronunțat al interacțiunii genelor ciclului folat, celui metioninic și genei disfuncției endoteliale, fapt ce determină contribuția acestora în progresul procesului miopatic și invaliditatea timpurie (până la 9 ani).

4. Variantele polimorfe ale genelor ciclurilor folat, metioninic și ale genei funcției endoteliale sunt indicatori predictivi importanți privind vârsta de plasare în scaunul cu rotile (nivelul de severitate) și acționează în calitate de modificatori ai apariției și decurgerii maladiei.

5. Metoda propusă de modelare cu ajutorul metodei logistice multinominale și MDR poate fi aplicată asupra altor eșantioane, deoarece este comodă și cost-eficientă.

5.3. Rolul genelor modificatoare investigate în patogenia miodistrofiei Duchenne

Înainte de a trece la descrierea proceselor patogenetice care se produc în caz de DMD, vom evidenția rezultatele, inclusiv cele genetice, cunoscute până în prezent. La finalul capitoului vom compara aceste idei cu înțelegerea noastră privind patogeniza bolii și vom sugera propria schemă de patogeneză actualizată, ținând seama de noile descoperiri și de analiza literaturii de specialitate.

După cum s-a menționat în primul capitol, studiile genetice au arătat că gena DMD este situată în mijlocul brațului scurt al cromozomului X, fiind identificată partea codificatoare și determinată secvența de nucleotide [56]. Yuylo a constatat că la 65% din pacienți se atestă deleția genei, iar la 6% – duplicații de diferită lungime și localizare [172]. Frecvența delețiilor în genă este inegală: ele apar cel mai adesea în mijlocul genei. Al doilea „punct fierbinte” al delețiilor se află între exonii 7 și 8.

La aproximativ 92% din pacienți se poate explica diferența atestată în evoluția clinică a distrofiei musculare pe baza ipotezei „cadrul de citire”, în literatură sunt descrise cazuri de heterogenitate clinică a miodistrofiei Duchenne [63]. Astfel, în caz de deleții ale exonilor 3-7 și schimbarea cadrului de citire, evoluează tabloul clinic al distrofiei musculare Becker. În cazul delețiilor extinse (de la 30 la 40 exoni), dar fără afectarea cadrului de citire, se dezvoltă forma Duchenne. Absența exonului 50 este adesea asociată cu retardul mintal, iar deleția exonului 49 – cu cardiomiopatia [256].

Astfel, cercetările în vederea modificării structurii genei nu permit asocierea tabloului clinic al distrofiei musculare cu încălcările sale specifice. În continuare, a fost studiat procesul de translare a proteinei, codificate de gena DMD. Gena *DMD*, sau *distrofina*, conține 79 de exoni

(Roberts ș.a., 1993) ce codifică 14.000 perechi baze. Exonii sunt de mărime medie, dimensiunea lor variind în limitele a 30 și 300 perechi baze, și sunt distribuiți neregulat, deși unii dintre exonii ce codifică domeniile proteinei sunt grupați. Spre exemplu, exonii 65-67 codifică domeniul bogat în cisteină și au o dimensiune de 6 kb, iar exonii 68-74 codifică regiunea ce se leagă cu sintrofina și au aproximativ 14 kb. Cu toate acestea, intronii au cea mai mare contribuție la dimensiunea totală a genei. De exemplu, intronul 44 are o lungime de 270 kb, iar intronul 1 se extinde la 400 kb (capătul 5' al transcrierii are patru exoni alternativi, care sunt exprimați în țesut într-o anumită manieră).

Distrofina este o proteină în formă de baghetă și are dimensiunea de circa 150 nm. Este predominant hidrofilă pe toată lungimea sa, iar 31% din aminoacizi sunt încărcăți (Arg, Asp, Glu, His și Lys). Structura secundară relevă un potențial major pentru o formațiune α -elicoidală pe majoritatea secvenței. Proteina dată face parte din clasa spectrinelor, din care mai fac parte încă două proteine citoscheletice: α -actina și β -spectrina, care pot fi antrenate în amplasarea submembrară a proteinelor cu care sunt asigurate citoscheletele multor tipuri de celule. Această clasă de proteine se caracterizează prin faptul că conține un domeniu NH_2 actin-binding, urmat de un număr variabil de unități repetitive, cunoscute sub denumirea de „spectrin-like repeats”.

Distrofina este alcătuită din patru domenii [297]:

1. *Domeniul de legare la actină (actin binding)*, ce cuprinde 240 de aminoacizi. Domeniul dat este similar sectorului *actin-liant* al α -actinei. α -actinina reprezintă o componentă normală a filamentelor de actină de la nivelul mușchilor netezi și scheletici, conectând în acest mod elementele filamentoase ale citoscheletului de membrana celulară. Este important pentru stabilitatea distrofinei; deleția sa provoacă forma severă a miostatofiei Becker [256].

2. *Domeniul central*, numit și *axial*, este cuprins între aminoacizii 253 și 3040. Este cel mai impunător domeniu, format din 24 de elemente triple elicoidale, numite „spectrin-like repeats” [269]. Repetițiile sunt întrerupte de patru segmente nerepetabile bogate în prolină, numite „regiuni de balama”. O repetiție conține trei α -helixuri, notate convențional cu 1, 2 și 3. α -helixurile 1 și 3 sunt formate fiecare din șapte spire elicoidale, care posibil interacționează asemenea unei bobine încolăcite printr-o interfață hidrofobă. α -helixul 2 are o structură plurivalentă și este format din segmente de 4 și 3 spire elicoidale, separate de glicină sau reziduuri de prolină. Fiecare repetiție este codificată de doi exoni. Deleția părții centrale este asimptomatică, iar deleția în partea distală duce spre forma clasică Becker.

3. *Domeniul bogat în cisteină* este situat la nivelul aminoacizilor 2080-3360 și reprezintă un segment deosebit de bogat în cisteină (conține 15 aminoacizi de cisteină din totalul de 280 aminoacizi). Acest domeniu include două situri denumite „EF-hand”, care sunt delimitate de două module: WW și ZZ (*Zing finger*). Domeniul dat reprezintă circa 14% din întreaga proteină [270]. Deleția acestui domeniu conduce spre forma Duchenne.

4. *Domeniul COOH-terminal (carboxi)* este omologul utrofinei și distrobrevinei. Domeniul carboxi cuprinde aminoacizii 3361-3685. El este înrudit cu proteina codificată de o genă asemănătoare distrofinei (DMDL), ce are localizare 6p24 [271], [272].

Domeniul C-terminal al distrofinei are o mare importanță, deoarece interacționează cu elementele proteice ale complexului distrofină – glicoproteină (DGC). Din acest motiv, delețiile ce se produc la nivelul acestei regiuni duc la modificări severe distrofice, sesizate fenotipic. În literatura de specialitate sunt descrise un fragment bogat în prolină și alte 15 fragmente de dimensiuni mai mici ale distroglicanului de la capătul C-terminal, care sunt indispensabile pentru funcționarea distrofinei. Capătul C-terminal al distrofinei se leagă de puntea citoplasmatică a β -distroglicanului, interacționând cu domeniul WW [38]. Domeniul WW, denumit și *WWP* sau *rsp5*, este un domeniu descris recent, format din circa 38-40 aminoacizi [170]. Acesta are funcția de legare a proteinelor [58], însă nu se leagă singur de β -distroglican, ci are nevoie de existența și celuilalt domeniu *EF-hand* de legare. Acest domeniu unește diferite segmente bogate în prolină și poate fi identificat în proteine precum: prolil-izomeraza PIN1, Nedd 4 ubichitin ligaza și în proteinele Yes kinaze, asociate cu proteinele YAP.

În componența distrofinei mai intră și alte domenii, precum domeniul ZZ, care este prezent atât în proteinele nucleare, cât și în cele citoplasmatică [273]. Acest domeniu face parte din domeniul distrofinei, fiind bogat în cisteină. Resturile de cisteină din domeniul ZZ au rolul de a forma situri de coordonare pentru cationii bivalenți de metal, precum cei de Zn.

Complexul distrofină – glicoproteină (DGC) rezultă din asocierea distrofinei cu alte proteine din membrana plasmatică a mușchilor cardiaci și somatici, unde interacționează cu o proteină denumită „distroglican” (Figura 5.10) [274].

Acest complex unește citoscheletul intracelular cu matricea extracelulară și este responsabil de reglarea NO în mușchi [275]. DGC este concentrat în benzile Z din sarcomere și asigură transmiterea forței spre fibrele musculare. Perturbarea acestei regiuni are drept consecință instabilitatea membranelor, care, în cele din urmă, duce la rupturi ale sarcolemiei. Influxul de calciu extracelular modifică procesele moleculare, precum contracția musculară, și declanșează activitatea proteolitică. Fibrele musculare afectate devin necrotice sau apoptotice și

eliberează chemoatrănți mitogeni, care inițiază procesele inflamatorii. Ciclurile de degenerare/regenerare duc la dereglări musculare ireversibile și înlocuirea fibrelor musculare cu fibre și țesut adipos.

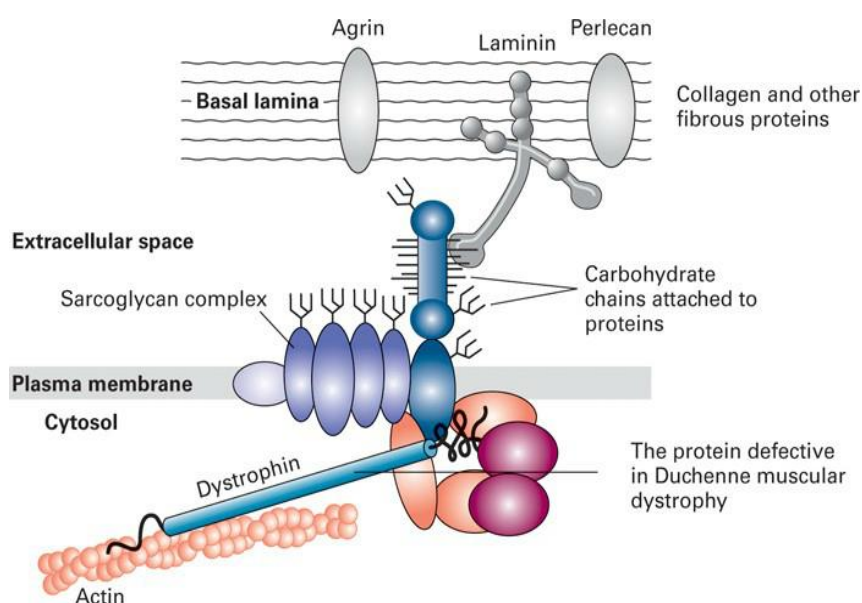


Fig. 5.10. Structura complexului distrofina – glicoproteină (DGC) [274]

Genele responsabile de codificarea componentelor complexului distrofina – glicoproteină au fost caracterizate și definite după criteriul interacțiunii lor cu distrofina.

Prin urmare, distrofina are un rol important în constituirea, menținerea și funcționarea normală a mușchilor. Datorită complexului Dystrophin-associated protein complex (DAPC) din care fac parte, alături de proteinele cu care interacționează distroglicanul, sarcoglicanul, distrobrevina, sintrofina și sarcospan, aceasta menține integritatea membranei sarcolemei. Mutațiile din componența proteinelor acestui complex determină diferite patologii sesizate fenotipic, miodistrofiile autozomal-recesive [276].

Este stabilit faptul că α și β 1 NOS este implicată în procesele metabolice din mușchi (Figura 5.11) [277][246]. Astfel, modificările în diferite părți ale distrofinei sunt asociate cu diferite forme de decurgere a procesului miopatic. Pentru a explica procesul miodistrofic, Eric Hoffman, unul dintre primii cercetători ai miodistrofiei Duchenne, a propus schema procesului miopatic, în care o influență majoră a fost atribuită ionilor de calciu (Anexa 13).

Profesorul Grinio L.P., pe baza propriilor rezultate ale cercetării MD Duchenne și a analizei datelor din literatura de specialitate, a propus o nouă schemă de dezvoltare a procesului miodistrofic (Anexa 14), diferită de schema lui Hoffman E., care este construită pe baza datelor cercetării etapelor clinice ale maladii. Etapa clinică este asociată cu modificări metabolice

semnificative și este precedată de mari schimbări în structura și funcția musculaturii scheletice [256].

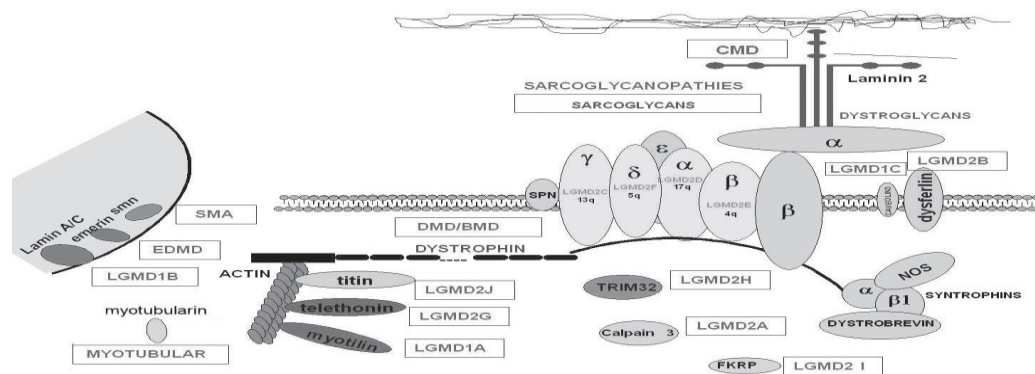


Fig. 5.11. Reprezentarea schematică a proteinelor din sarcolemă, sarcomer, citozol și nucleii implicați în procesul de degenerare musculară în patologiile neuromusculare [278] EDMD – distrofia musculară Emery-Dreifuss; FKRP – fukutin-related-protein; NOS – sintaza oxidului de azot; SMA – atrofia musculară spinală; SNP – sarcospan

Cercetările sale – analiza dezvoltării prenatale a embrionilor de la 6 până la 22 săptămâni – nu au evidențiat diferențe mari comparativ fătul sănătos, ceea ce menționau și alți autori. Aceasta i-a permis să lanseze ipoteza că absența distrofinei nu influențează dezvoltarea musculară în această perioadă de evoluție.

Cercetările lui Pearson C. și ale altor autori efectuate în perioada preclinică timpurie nu au identificat modificări în mușchii scheletici ai bolnavilor cu miodistrofie. În stadiul clinic al maladiei, tabloul histologic se caracterizează prin degenerarea fibrelor musculare, necroză, fagocitoză și proliferarea țesutului conjunctiv [279], [280].

În viziunea lui Grinio L. (1998), procesul miodistrofic se asociază cu începutul mersului și munca intensivă a membranei musculare, acestea fiind afectate de absența distrofinei [256]. 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 în urma intoxicației cu produse de descompunere, crește hipoxia, se implică procesul degenerativ al tuturor tipurilor de metabolism (Anexa 13). Fenomenul de instabilitate a membranelor în prezent este important în terapia genică (tratament cu nucleotide antisens AO) [281], [282].

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 (POL) completează procesul degenerativ, conducându-l spre etapa terminală, în care țesutul muscular practic dispare [279], fapt demonstrat atât pe persoane bolnave, cât și pe animale experimentale [283], fiind

înlocuit cu țesut conjunctiv și țesut adipos [284]. Pentru suprimarea modificărilor degenerative ale mușchilor, se efectuează experimente pe modele animale (dystrophin-deficient mdx murine model) și utilizarea de leupeptin (tripeptide calpain inhibitor) [285], cercetarea căilor de semnalizare ale oxidului nitric – guanosin monofosfat ciclic (NO-cGMP) și folosirea inhibitorului fosfodiesteraza-5 (PDE5) [286], în scopul încetinirii procesului patologic.

Toate aceste procese ar trebui să fie luate în considerare în dezvoltarea terapiei în caz de patologie Duchenne. Subestimarea modificărilor biochimice poate zădărnici aceste încercări de tratament. De asemenea, procesele date trebuie luate în calcul în cadrul ingineriei genice și la elaborarea metodelor de tratament al DMD.

Cercetarea noastră a permis desăvârșirea mecanismelor patogene existente, datorită identificării particularităților genetice unice ale genelor metabolismului acidului folic, vitaminei B12 (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*) și oxidului nitric 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 locale și celor integrale [249].

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 remodelăm efectul celor trei căi metabolice (Figura 5.12): ciclul acidului folic, ciclul metioninei și funcția endotelială în diferite etape ale maladiei, precum și să apreciem rolul acestor gene, unite într-o rețea genică locală, la bolnavii cu patologia monogenică miodistrofia Duchenne/Becker, pentru a înțelege interacțiunea genelor (Anexa 6).

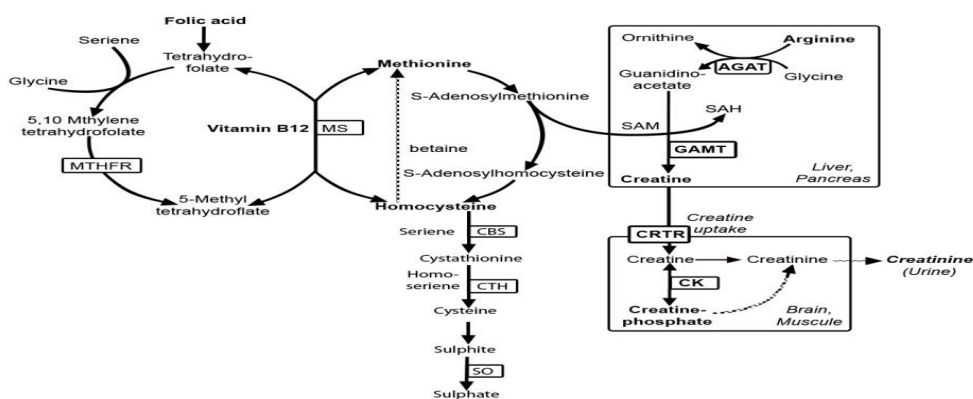


Fig. 5.12. Ciclul biochimic al celor trei căi metabolice (schemă proprie)

Prin utilizarea a trei metode statistice (determinarea raportului șanselor, metoda regresiei logistice multinominale și MDR – multifactor dimensionality reduction), a fost identificat rolul genelor cercetate în progresarea rapidă a procesului patologic. Prin metoda MDR a fost determinată o sinergie pronunțată a genelor metabolismului acidului folic (*MTHFR677*, *MTHFR1298*) și genelor metabolismului metioninei (*MTR677*, *MTR677*) cu gena *eNOS4* (disfuncție endotelială). Se atestă un coeficient informațional (IG) înalt pentru locii *MTHFR677* (1,78%) și *MTR677* (1,08%), și aproape de unitate pentru locusul *eNOS* (0,90%).

Homocisteina și metionina se transformă reciproc una în alta în interiorul celulelor organismului, iar interacțiunea lor sugerează ideea că ele au mecanisme reglatoare și funcții metabolice comune. Orice dereglare în transformarea metioninei poate distruge această interacțiune, generând diferite defecte metabolice [287]. Metionina îndeplinește o serie de funcții importante:

- este inițiatorul sintezei proteice;
- participă la sinteza S-adenozilmetioninei – donorul biologic al grupelor metil, implicate în sinteza poliaminelor;
- contribuie la metilarea bazelor din componența ADN-ului;
- participă în metilarea proteinelor, probabil este implicată în reglarea epigenetică a expresiei genice, în transmiterea semnalelor în interiorul celulei, în diferențierea acestora și în alte procese;
- este sursa grupării aminopropil pentru a forma poliamine și cisteină și, respectiv, participă alături de homocisteină și cistation în următoarele procese: transulfurarea, ceea ce duce la formarea de cistationi, cisteină și glutatation; catabolismul colinei și betainei și restaurarea folatului intracelular; remetilarea și conversia în metionină.

Totodată, așa cum s-a menționat mai sus, homocisteina are efect toxic, dăunător asupra endoteliului vascular, iar stimularea trombozelor conduce la dezvoltarea diferitelor complicații [288]. Genele *MTHFR* și *eNOS* sunt genele factorilor implicați în patogeneza disfuncției endoteliale. Prin urmare, datele acumulate de noi privind asocierea funcțional semnificativă a alelelor genelor ce participă la metabolismul homocisteinei, metioninei și oxidului nitric la bolnavii cu DMD/B și aprecierea contribuției fiecărei gene în dezvoltarea procesului patologic sugerează posibilitatea unei dereglări a proceselor fiziologice din corpul pacienților cu DMD/B.

Oxidul nitric este un radical liber, cu un electron nepereche, produs de o familie de trei enzime – NO-sintaze. În organism, NO se sintetizează din aminoacidul L-arginina [289]. Acest proces reprezintă o reacție complexă, oxidativă, catalizată de enzima NO-sintaza (NOS), care

atașează oxigenul molecular la atomul de azot al grupării guanidinice a L-argininei final guanidină [290].

eNOS (NOSIII) și alte izoforme au multe similarități cu reductazele citocromului P-450, care pentru activare necesită prezența nucleotidelor flavine (FMN, FAD), NADPH [291] și a oxigenului. Expresia genei *eNOS* poate fi influențată de mai mulți factori. De exemplu, citochinele inflamatorii au efect dublu asupra activității eNOS. În decursul primelor 24 de ore, citochinele măresc activitatea enzimei, iar în următoarele 48-72 de ore crește degradarea ARNm *eNOS*. Studiile imunohistochimice au relevat prezența a două izoforme NOS ale musculaturii scheletice umane [277] și NOS muscular [229].

Oxidul de azot, în viziune modernă, joacă rolul de reglator universal (mediator biologic important) al multor procese fiziologice, inclusiv menținerea homeostaziei cardiovasculare [292], a statutului imun, activitatea citotoxică a macrofagelor, reglarea proliferării celulelor vasculare, și poate acționa ca neurotransmițător [293], mediator [125] etc.

Cercetările recente au demonstrat că *eNOS* activată, în special localizată în mitocondriile musculaturii scheletice, a fost raportată ca măbind circulația sangvină din mușchi și transportând glucoza în celulele musculare, ceea ce determină contracția acestora. În plus, mai mult de o izoenzimă NOS este prezentă în țesuturi, ceea ce pare să afecteze mușchii în cazul proceselor miopatice – cercetarea noastră a demonstrat că polimorfismul *eNOS4a/4b* este asociat cu progresarea miodistrofiilor.

Postulatul geneticii clasice, „*orice trăsătură fenotipică este rezultatul expresiei tuturor genelor, chiar dacă efectul lor este mic*”. Prin urmare, este adevărată și afirmația inversă: „*Fiecare genă influențează orice caracter al organismului, chiar dacă efectul fenotipic este mic*”. Recunoscând adevărul acestui fapt din punctul de vedere al filosofiei conceptuale, s-a observat totuși neconstructivitatea ei în termeni practici [249]. Într-adevăr, după cum s-a menționat anterior (capitolul 1), pentru genetica medicală prezintă interes informația despre corelarea unei sau altei patologii cu mutațiile unei gene (maladii monogenice) sau stabilirea asocierii maladiei cu variantele alelice ale anumitor gene (maladii multifactoriale).

Investigația realizată demonstrează anume abordarea constructivă „*fiecare genă influențează orice caracter al organismului, chiar dacă efectul fenotipic al ei este mic*”, iar în termeni practici, acest lucru ne-a permis să trecem la descrierea patogenezei sub aspectul geneticii integrale. *Genetica integrală* este o știință nouă, apărută cu scopul de a compila tot volumul adunat de cunoștințe despre activitatea genomului și a determina căile de perspectivă în dezvoltarea genomicii în secolul XXI [249].

Pentru confirmarea propunerii noastre, în anul 2015 a fost publicat un studiu în care, aplicând metodele statistice cu utilizarea analizei rețelelor ponderale privind co-expresia genelor (WGCNA – Weighted correlation network analysis), au fost identificate diferențele globale dintre expresia genelor în mușchii normali și în mușchii bolnavilor cu DMD în etapa incipientă a maladiei. Mai multe blocuri de gene pot fi asociate cu progresarea bolii și, conform ipotezei, pot avea valoare statistic semnificativă în patogeneza DMD [233]. Acest studiu, îmbinat cu analiza expresiei, deschide un potențial mai amplu de cercetare în viitor.

Remarcăm faptul că, în 2006, Lehner ș.a. au propus o nouă paradigmă a bolilor genetice la om. Conform acestei paradigme, există două clase de gene ce cauzează maladii la oameni: prima clasă conține gene „*specificatoare*”, ce determină caracteristicile bolii, și a doua clasă include gene „*modificatoare*” sau „*hub*”, care „*conduc la creșterea puterii bolii, ca urmare a mutațiilor din genele specificatoare*”[16, 294].

Cercetarea noastră a confirmat paradigma și 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 a genei sintetazei endoteliale de oxid nitric (*eNOS*) la bolnavii cu DMD/B cu diferit grad de severitate a procesului clinic, prin analiza timpului de plasare în scaunul cu roțile. A fost încercată remodelarea a trei căi metabolice (ciclul acidului folic, ciclul metioninei – metabolismul homocisteinei, și funcția endotelială – creșterea producției NO, care este toxic în concentrații mari) și evaluarea rolului a două substanțe toxice – homocisteina și oxidul nitric – la persoanele ce suferă de patologia monogenă: miodistrofia Duchenne/Becker. În viitor, ținând cont de schema propusă a patogenezei, se va impune necesitatea cercetării altor gene modificatoare (altor rețele genetice locale).

Identificarea particularităților relevă baza biochimică ereditară individuală și demonstrează prezența amprentei ereditare irepetabile a fiecărui pacient. Fenotipul fiecărui bolnav este reflectarea particularităților individuale ale genotipului său, realizat prin intermediul rețelelor genetice locale și celor integrale.

Prin utilizarea a trei metode statistice (determinarea raportului șanselor, metoda regresiei logistice multinominale și MDR), am identificat rolul genelor cercetate în progresarea rapidă a procesului patologic. Abordarea noastră de la genotip spre fenotip ne-a condus spre formularea ipotezei despre evoluția bolii și identificarea posibilelor modalități de corectare a stărilor patologice.

Astfel, analizând datele cercetătorilor străini și cele obținute în cadrul acestui studiu, am creat o viziune proprie asupra patogenezei maladiei DMD/B din punctul de vedere al abordării individuale, contemporane și complexe (Anexa 15).

Modelarea matematică a permis evaluarea rolului și a importanței factorilor genetici în evoluția și prognozarea procesului patologic.

Astfel, prezenta lucrare este actuală prin prisma aspectului teoretic. Evaluarea efectului modificador al unui șir de sisteme genetice asupra expresiei fenotipice a maladiei monogenice are importanță fundamentală pentru înțelegerea patogenezei procesului patologic (Anexa 15).

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. Conform acestei scheme (Anexa 15), 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. Cercetarea noastră a identificat particularități unice ale genelor metabolismului homocisteinei și oxidului nitric la fiecare pacient cu diagnosticul DMD, care determină baza ereditară a individualității biochimice, amprenta irepetabilă a persoanei. Fenotipul fiecărui pacient este reflectarea particularităților individuale ale genotipului său, realizat în componența rețelelor genice locale și celor integrale.

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. Menționăm că încă în secolul al XIX-lea, clasicii științei susțineau că „viitorul va aparține medicinei profilactice” (I.M. Mudrov) și că „maladia este mai ușor de prevenit decât de tratat” (N.I. Pirogov). Descifrarea genomului uman, finalizată în aprilie 2003 în urma realizării cu succes a unui program științific internațional, a pus începutul unei noi ere – era *medicinii 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 [150]. Se conturează tot mai clar viitorul medicinei sintetice, bazate pe cunoașterea genomului uman individual și pe înțelegerea particularităților reacțiilor sale la acțiunea variată, inclusiv dăunătoare, a factorilor de mediu. După părerea specialiștilor de valoare din Occident, medicina secolului XXI va fi *predictivă, preventivă, personalizată și participativă*, numită „Medicina 4P”.

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 [295]. 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.

Principalul obiectiv al medicinei preventive nu este tratarea bolii, și identificarea la timp a condițiilor și descifrarea proceselor ce au loc în organismul pacientului concret, ce pot conduce la îmbolnăvire. Pe baza datelor obținute pe calea testării genetice, este posibilă aplicarea unor măsuri specifice, direcționate spre prevenirea maladei, iar în cazul nostru – spre diminuarea severității procesului patologic. Preparatele medicamentoase utilizate în acest scop sunt reprezentanți ai terapiei direcționate (scopul-țintă) și acționează în mod selectiv și precis [102].

Astfel, filosofia medicinei preventive diferă categoric de cea tradițională, întrucât la baza ei stă paradigma „păstrarea sănătății umane”, și nu „repararea”. În raportul „Tendințe tehnologice 2013” din revista *MIT Technology Review*, este descris viitorul medicinei personalizate. Volumul

acestei piețe, după analiticii PWC, va crește continuu (anul 2015 – 42 miliarde dolari SUA), în special, segmentul utilizat în diagnostic. Conducătorii acestei piețe vor determina dezvoltarea tehnologiilor IT și a instrumentelor analitice care permit prelucrarea datelor masive, precum și ieftinirea unor servicii, cum ar fi secvențierea întregului genom.

A învăța omul să trăiască în armonie cu genele sale este doar prima etapă în implementarea medicinei predictive practice, principalul scop strategic al căreia este de a asigura utilizarea efectivă a genomicii pentru sănătatea omului. Lucrarea de față este direcționată 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.

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 DMD a determinat autorul spre cercetarea respectivă – una și aceeași listă de medicamente, prescrise în scop de reabilitare, a avut un efect diferit asupra evoluției maladiei la pacienți.

Cercetarea noastră a identificat particularități unice ale genelor metabolismului homocisteinei și oxidului nitric la fiecare pacient cu diagnosticul DMD, care determină baza ereditară a individualității biochimice, amprenta sa irepetabilă. Fenotipul fiecărui pacient este reflectarea particularităților individuale ale genotipului său, realizat în componența rețelelor genice locale și integrale. Am încercat să remodelăm esența a trei căi metabolice (ciclul acidului folic, ciclul metioninei – metabolismul homocisteinei, și funcția endotelială – creșterea producției NO, care este toxic în concentrații mari) și să evaluăm rolul a două substanțe toxice – homocisteina și oxidul nitric – la persoanele ce suferă de miopatia Duchenne/Becker. Trebuie de menționat ca în cercetarea condusa de Hoerster I. în 2015 a fost stabilit că la bolnavi cu DMD este tulburat procesul conversiei de L-arginia în oxid de azot și gradul de tulburare corelează cu progresarea miopatiei, ceea ce confirmă ipoteza noastră [296].

După cum s-a menționat deja, această lucrare este actuală prin prezența relevantă a două aspecte din medicină – aspectul teoretic și cel practic. Evaluarea efectului modificador al unui șir de sisteme genetice asupra expresiei fenotipice a bolilor monogenice este de o importanță fundamentală pentru înțelegerea patogenezei procesului patologic. Metoda modelării matematice ne-a permis să apreciem rolul și importanța factorilor genetici în evoluția maladiei și să realizăm pronosticul decurgerii procesului patologic.

Aspectul practic al lucrării constă în modificarea substanțială a principiului consultării medico-genetice prin identificarea formelor clinice potențial severe ale DMD/B. Astfel, neurologii vor avea posibilitatea să selecteze un tratament timpuriu individualizat (personalizat), iar în unele cazuri vor putea aplica terapii preventive în etapa presimptomatică a bolii.

Așadar, în etapa actuală de dezvoltare a geneticii medicale sunt necesare cercetări clinico-genetice complexe pentru soluționarea problemelor legate de diagnostic, prognosticul adecvat al evoluției maladiei, consultarea medico-genetică eficientă și căutarea căilor de corecție terapeutică pentru patologia dată. Rezultatele cercetării de față trebuie să fie utilizate în practica clinică a neurologilor și geneticienilor, pentru a determina grupa de risc a progresării procesului miopatic [297], și deschid posibilități de prognozare a decurgerii procesului miopatic la un pacient concret, urmate de stabilirea particularităților de care se va ține cont la aplicarea măsurilor de corecție metabolică individuală.

Această lucrare facilitează elaborarea strategiei de diagnostic molecular pentru personalizare în cadrul monitoringului miopatiei. Strategia permite realizarea următoarelor obiective:

1. Aprecierea individuală a riscurilor modificărilor patologice pe baza testării genetice, studierea istoricului familial al maladiilor, aprecierea stării organismului pacientului.
2. Formarea grupurilor în funcție de nivelul riscului.
3. Verificarea regulată a indicatorilor ce reflectă starea actuală a organelor.
4. Elaborarea unor măsuri specifice, predominant medicamentoase, care permit alegerea individuală a măsurilor profilactice și servesc pentru prevenirea dezvoltării situațiilor critice pentru sănătate.

Strategia de diagnostic molecular (Anexa 16) elaborată de noi urmărește implementarea evaluării individuale a riscurilor pe baza testării genetice. Ea constă în testarea genei distrofinei și a locilor polimorfi ai genelor modificatoare.

La momentul actual terapiile clinice și preclinice ce au ca scop tratamentul și suportul persoanelor afectate de distrofie musculara Duchenne sunt bazate pe terapii de exon skipping, pentru pacienții cu deleții sau duplicații ale exonilor genei DMD [304]. De asemenea, pentru pacienții cu mutații nonsens, la momentul actual există un studiu de lungă durată cu administrarea preparatului Ataluren. Acest studiu este un studiu randomizat, dublu-orb, controlat cu placebo, de 72 de săptămâni urmat de o perioadă de 72 de săptămâni fără administrarea acestuia. Scopul este de a caracteriza efectele pe termen lung ale restaurării distrofinei mediate de Ataluren asupra progresiei bolii [305].

Strategia de diagnostic molecular (Anexa 16) elaborată de noi poate influența în dezvoltarea și creșterea efectivității terapiilor genice și simptomatice în cazul patologiei DMDuchenne. Subestimarea modificărilor biochimice poate zădărnici aceste încercări de tratament.

5.5. Concluzii la capitolul 5

1. A fost relevat rolul metilentetrahidrofolat reductazei (*MTHFR*), metionin-sintazei (*MTR*), 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferazei și sintazei endoteliale de oxid nitric în formarea componentelor genetice (modificatoare), precum și influența mutațiilor din gena distrofina asupra severității procesului patologic la diferite vârste ale pacienților (9 și 12 ani).
2. Rezultatele regresiei logistice au arătat că variantele polimorfe ale genelor ciclurilor folat, metioninic și funcției endoteliale sunt elemente valoroase pentru calcularea probabilității de apariție a etapei a IV-a a procesului miopatic și acționează ca modificatori ai manifestărilor clinice ale bolii. Aceste variante contribuie la formarea predispoziției cu privire la evoluția procesului miopatic la nivel molecular, ce explică natura polimorfismului clinic susceptibil la invaliditate. Totodată, este evidențiată influența acestor factori în diferite perioade.
3. Valoarea matematică a estimărilor parametrilor de regresie constituie un indice semnificativ pentru heterozigoții compuși *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G* și *MTHFR C677T și MTR A2756G*, *MTRR A66G*). Deci, aceste combinații de date la astfel de estimări ridicate ($\beta = 33,67$ și $\beta = 34,73$) au o mare influență asupra dezvoltării etapei IV a DMD până la 9 ani.
4. Astfel, prin metoda MDR a fost determinată o sinergie pronunțată între genele ciclului folat (*MTHFR677*, *MTHFR1298*) și metioninic (*MTR 2756*) cu gena *eNOS4a/4b* (disfuncție endotelială) asociată cu un efect dublu negativă al relației genei *MTR și MTRR* în cazul unei evoluții rapide a bolii cu plasare în scaun cu rotile până la 9 ani. În cazul unei evoluții mai blânde a DMD cu plasarea în scaunul cu rotile până la 12 ani relațiile intergenice diminuează, pronunțându-se sinergia între tipul mutației în gena "Distrofinei", *MTHFR 677 și MTR A2756G*, asociată cu antagonismul efectului relației genelor *MTHFR 1298 și eNOS*.

5. Cercetarea rolului și asocierii genelor modificatoare (în caz de DMD/B) a permis completarea legăturilor patogenetice existente în acest proces patologic și elaborarea unei scheme noi privind patogeneza procesului miopatic.
6. Pe parcursul desfășurării studiului a fost elaborat un sistem de prognostic al evoluției maladiei la copiii cu DMD/B, bazat pe analiza contribuției delețiilor din gena DMD și pe datele genotipării polimorfismelor genelor ciclului metioninic, ciclului folat și genei funcției endoteliale a oxidului nitric. În baza rezultatelor obținute, am argumentat strategia de diagnostic individual la nivel de ADN la bolnavii cu miodistrofie Duchenne/Becker.
7. Pe baza cercetării efectuate devine clar că, în etapa actuală de dezvoltare a geneticii medicale, sunt necesare cercetări clinice și genetice complexe pentru soluționarea problemelor legate de diagnosticul, prognosticul adecvat al bolilor, de consiliere medico-genetică eficientă și pentru găsirea unor modalități de corecție terapeutică adecvată a acestei patologii.

SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE

Această lucrare abordează o temă din domeniul modern al științei, la intersecția a două discipline: medicină și biologie.

Patologiile ereditare neuro-musculare (PENM) constituie o grupă eterogenă de maladii ereditare progresive și degenerative ale sistemului nervos, se bazează pe structuri ale unității de mișcare (neuroni motori din măduva spinării, nervul periferic, fasciculul muscular), sunt determinate genetic și se manifestă mai frecvent în copilărie și adolescență. PENM constituie o cotă considerabilă printre patologiile monogenice și ocupă, după frecvență, unul dintre primele locuri în Europa de Est și în țările CSI. Nivelul ridicat de invaliditate timpurie, reducerea duratei de viață în urma insuficienței cardiorespiratorii, dereglarea aparatului locomotor, a somnului lipsa metodelor eficiente de tratament determină exclusiv importanța medicală și social-economică a acestei probleme.

Scopul principal al acestei lucrări a fost studierea frecvențelor relative, a spectrului și a caracteristicilor genético-moleculare ale maladiilor neuromusculare ereditare în Republica Moldova, precum și elaborarea unei strategii eficiente de diagnostic molecular, pentru monitorizarea personalizată a pacienților cu DMD/B.

Studiul rezumă experiența pe termen lung (25 de ani) a Laboratorului de genetică moleculară a Institutului Mamei și Copilului al Republicii Moldova. A fost realizată analiza frecvențelor formelor nozologice individuale ale maladiilor neuromusculare ereditare în structura bolilor ereditare ale sistemului nervos la copii și a fost demonstrată incidența maladiilor neuromusculare frecvente pe teritoriul republicii.

După efectuarea studiului clinic și electromiografic la pacienți cu maladii ereditare neuromusculare care locuiesc pe teritoriul Republicii Moldova, potrivit Registrului familiilor cu patologii genetice, a fost stabilit că patologiile ereditare neuromusculare constituie 65%. Frecvența acestor patologii este de 23,5:100.000 locuitori. Spectrul de frecvențe nozologice BESN în Republica Moldova se bazează pe cinci grupări:

- ✓ Două sunt de tipul moștenirii autozomal-dominante (AD) în cazul neuropatiei senzorial-motorii ereditare (NSME), ataxiei spinocerebelare (SCA).
- ✓ Două sunt reprezentate de tipul moștenirii autozomal-recesive (AR) – amiotrofia spinală de tipurile I-III și miopatiile progresive ale centurilor.
- ✓ O grupă este reprezentată de moștenirea recesivă X-linkată MDP forma Duchenne-Becker.

Ponderea acestor boli constituie pentru BESN 65%, iar cota bolilor cu transmitere de tipul AD este de 25%. Printre maladiile menționate sunt patru grupuri de boli neurologice mai cunoscute, legate de patologiile neuromusculare, și sunt tradițional incluse în structura “cotă de bază” a BESN ale mai multor populații investigate. Printr-un studiu retrospectiv de cohortă a fost determinat nucleul maladiilor ereditare neuromusculare, care cuprinde trei patologii mai frecvent întâlnite: DMD, SMA și NSME. Rezultatele analizei conduse au arătat că cele mai frecvente forme maladiilor neuromusculare ereditare în eșantionul de pacienți cercetat sunt: neuropatie senzorial-motorie ereditară (NSME) (n= 276 – 17,39%) , miodistrofie Duchenne/Becker (n=274 – 15%) și amiotrofie spinală (n=252– 12,98%).

Este important de menționat că au mai fost identificate și alte șase forme rare: mioplegii paroxistice, miotonia Thomsen, miotonia Becker, NEMS AR, NEMS X-linkate și amiotrofia spinal-bulbară Kennedy. A fost calculată incidența pentru fiecare tip de maladie neuromusculară.

În cadrul analizei distribuției numărului cazurilor de patologii DMD/B, SMA și NSME tip 1A, 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, $p=0,0018-0,0047$.

Datele populațional-epidemiologice demonstrează perspectiva efectuării cercetărilor asupra unor maladii, precum miopatia centurilor, bolile metabolice cu dereglarea sistemului nervos, bolile mitocondriale, și crearea unui registru de BESN, în vederea implementării metodelor noi de diagnostic molecular în Republica Moldova.

În cadrul activității clinice de 25 de ani de monitorizare a pacienților cu patologii neuromusculare în R. Moldova, a fost creat Registrul național și biobanca familiilor date. Registrul permite efectuarea follow-up-ului familiilor cu risc sporit și identificarea necesității de diagnosticare prenatală. Observarea și monitorizarea pe termen lung a pacienților cu DMD/B ne-a permis să elaborăm o ipoteză științifică, și anume: **evaluarea efectului modificador al sistemelor genetice asupra expresiei fenotipice a patologiei monogenice are importanță fundamentală pentru înțelegerea patogeniei procesului miopatic.**

Pentru aprecierea particularităților molecular-genetice a distrofiei musculare Duchenne, a fost aplicată o inovare metodică prin care s-a modificat setul de primeri (serie), ceea ce a permis lărgirea până la 85% a spectrului de deleții identificate în gena distrofinei.

Prin efectuarea unei analize de cluster a tuturor exonilor delețați la pacienți, am determinat contribuția fiecărui exon în procesul patologic. Analiza a demonstrat că partea proximă are un procent mic (2,7%, 2,3%, 2,6%) de implicare a exonilor 3, 6 și 8 din gena *DMD* în procesul

deleției. Această analiză a identificat trei vârfuri în partea centrală a genei (exonii 45, 47 și 48) cu 6,11%, 8,55% și, respectiv, 10,08%, și un vârf în regiunea exonilor 50, 51, 52, 53 (7,02%, 4,27%, 3,97%, 2,29%). Astfel, la eșantionul pacienților cu DMD din R. Moldova, ca și în cercetările anterioare, s-a remarcat prevalența implicării părților centrale și distale ale genei DMD în procesul de deleție.

Rezultatele cercetărilor molecular-genetice proprii au arătat că la bolnavii cu DMD/B din Moldova predomină deleții egali sau mai mult de 2 exoni (46,95%) și deleții out-of-frame (61,7%), sunt prezenți 6 deleții rare (2,8%) și 4 deleții, care nu sunt descrise în baza de date DMD-LOVD v3.0; și 16 deleții duble (7,5%), tot nedescrise în baza de date. Procentajul delețiilor egali sau mai mari de 1 exon în eșantion cercetat constituie 84,98%, ce este diferit de la datele, publicate anterior (Bladen ș.a., 2015) care au raportat rata delețiilor egale sau mai mari de 1 exon ca 68%.

Una dintre sarcinile cercetării noastre a fost identificarea delețiilor exonilor 7 și 8 la bolnavi cu SMA în gena *SMN1*. Identificarea delețiilor extinse prin metoda PCR-RFLP s-a efectuat la 113 bolnavi, fiind depistate: deleția exonului 7 la 63 (55,7%) bolnavi, deleția exonului 8 la 49 (43,3%) bolnavi. Deleția exonului 7 este deci mai frecventă decât deleția exonului 8. Rata detectării delețiilor la bolnavii cu amiotrofie spinală din Republica Moldova constituie 85%. La 28% de pacienții din Republica Moldova este găsită deleția concomitentă a exonilor 7 și 8 în gena *SMN1*, ce este diferit de la populațiile iraniene sau indiene.

O altă sarcină a fost precizarea diagnosticului maladiilor neuromotosenzoriale, în cadrul căreia s-a efectuat analiza molecular-genetică a genei *PMP22* (pentru trei markeri – D17S921, D17S122 și D17S834) la bolnavii cu NSME 1A din cazuistica autohtonă. Cercetările au evidențiat următoarea frecvență: 23,88% duplicații pentru locusul D17S921, 32,83% pentru locusul D17S122 și 24,62% pentru locusul D17S834 [148]. De asemenea, s-a constatat că unul și același individ poate avea mutații în doi loci [13]. În concluzie, frecvența duplicației în gena *PMP22* (17p11.2-p12) la pacienții din Republica Moldova este de 69%, mai frecvent decât în Coreea (46,9%), Italia (57,6%), Australia (60,7%), Japonia (23,3%), Marea Britanie (28,2%), Statele Unite (51,6%), Rusia (53,6) (Rune Ostern, 2013).

În baza consultului medico-genetic efectuat în grupurile de cercetare, a fost elaborat Algoritmul de diagnostic clinic al patologiilor neuromusculare, care include utilizarea datelor biochimice și electrofiziologice. În funcție de valorile obținute, a fost posibilă diferențierea diverselor grupe de patologii neuromusculare, în particular: miodistrofie progresivă, atrofie

musculară spinală, neuropatii motosenzoriale și miopatii mitocondriale, congenitale, care urmează a fi precizate doar prin investigații molecular-genetice.

În cazul acestor maladii este foarte importantă prevenirea apariției lor, deoarece actualmente niciun tratament curativ nu este disponibil. Femeile ce prezintă risc au acces la consultație genetică și la teste, în baza cărora se poate determina dacă ele sunt purtătoare de mutație sau nu. Opțiuni pentru femeile purtătoare sunt diagnosticul prenatal, diagnosticul genetic în cazul preimplantării sau folosirii unui ovul de donator. În continuare vom descrie în special diagnosticul prenatal pentru două maladii – DMD și SMA – privind etapele realizării, eficiența și necesitatea schimbării atitudinii populației și a medicilor, în scopul realizării acestui pas.

Diagnosticul prenatal (DP) este un act medical complex, înalt informativ, care permite depistarea a numeroase anomalii congenitale și boli genetice în cursul vieții fetale.

A fost elaborat algoritmul diagnosticului molecular-genetic, care constă în efectuarea unor tehnici contemporane molecular-genetice, disponibile în Republica Moldova, și care permit diagnosticarea prenatală și postnatală pentru maladiile neuromusculare frecvent întâlnite. Astfel, în perioada 1996-2017 au fost realizate un număr de 74 diagnostice prenatale molecular-genetice a două boli, și anume al anomaliilor monogenice, X-linkate și, respectiv, autozomal-recesive: miodistrofia Duchenne (37 DP) și amiotrofia musculară spinală (37 DP).

Diagnosticul prenatal este o strategie importantă și o modalitate eficientă de prevenire a nașterii copiilor cu patologii ereditare monogenice în familiile din grupa de risc. Dezvoltarea sistemului centralizat de acordare a asistenței medicale și genetice contribuie la îmbunătățirea calității diagnosticului prenatal și la creșterea amplitudinii serviciului de diagnosticare din R. Moldova.

Revenind la ipoteza de cercetare, vom reitiera că prezența unor mutații specifice în genele modificatoare schimbă puterea și tipul de interacțiune genică, afectând rata de progresare și evoluția bolii la pacienții cu DMD. În calitate de model de patologii monogenice neuromusculare s-a cercetat lotul bolnavilor cu DMD/B prin efectuarea studiului de tip caz–control, cu efectuarea analizei molecular-genetice a genelor propuse pentru cercetare în ambele grupuri de studiu.

Pentru confirmarea ipotezei am utilizat metode molecular-genetice, metode genetice la nivel populațional, metode statistice (determinarea raportului șanselor, regresia logistică multinominală și reducerea multifactorială dimensională).

În baza analizei populaționale, s-a stabilit că frecvența alelică a genelor *MTHFR* (677CT și 1298AC) și *MTR* (2756AG) obținută în grupurile cercetate corespunde frecvențelor teoretice, fără dezechilibrul legii Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). Analiza polimorfismelor *MTRR* A66G și

eNOS 4a/4b a arătat o deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg ($p < 0.05$) la compararea frecvenței genotipice observate cu valorile teoretic estimate în grupul de studiu – DMD/B, ceea ce sugerează o reflectare a caracteristicilor genetice și biologice ale bolii. Analiza frecvențelor alelice ale polimorfismelor genelor *MTHFR*, *MTR* și *eNOS* în grupul de control în raport cu alte state nu a relevat diferențe statistic semnificative, spre deosebire de polimorfismul *MTRR*. În urma cercetării s-a identificat o creștere statistic semnificativă a frecvenței genotipului *MTRR A66G* (63,03%) în grupul de control, fapt ce prezintă un indice înalt de eterogenitate a populației.

Analiza raportului de șanse a demonstrat o asocierie statistic semnificativă în creșterea riscului de progresare a procesului miopatic la pacienții cu DMD la prezența genotipului patologic *homozigot* în genele *MTRR G66G* (x7,2 ori) și *eNOS 4a/4a* (x2,3 ori) și a genotipului *heterozigot* în gena *MTHFR A1298C* (x1,7 ori). O analiză a asociațiilor unui anumit genotip cu miopatie a evidențiat o scădere statistic semnificativă a frecvenței genotipului *A2756G* a genei *MTR* la grupul de pacienți comparativ cu grupul de control, posibil că acest genotip poate avea un efect protector la pacienții cu DMD (OR=0,63, 95% CI: 1,4-1,99, $\chi^2=5,02$, $p=0,04$).

Cu ajutorul metodei regresiei logistice multinominale au fost create modele statistice, utilizate pentru prognosticul patologiei la pacienții cu DMD. În acest sens, au fost analizate două valori variabile dependente: *timpul de plasare în scaunul cu roțile până la 9 ani sau până la 12 ani*, precum și câțiva factori în calitate de valori variabile independente: *forța musculară la prima examinare, tipul delețiilor din gena distrofinei, genotipul genelor ciclurilor folat, metioninic și eNOS*.

Modelele A1 și A2 de cercetare a influenței factorilor asupra perioadei de plasare în scaunul cu roțile în baza calculării parametrilor de regresie au arătat dependența de *timpul mutației în gena distrofinei*. Aceasta are tendință spre semnificație statistică pentru rolul tipului deleției ”out” of frame în predicția evoluției rapide a bolii până la vârsta de 12 ani ($p=0,16$).

Modelul B1 demonstrează semnificația *puterii musculare* în predicția progresării bolii, dar aceasta fiind un indicator foarte subiectiv, dacă se apreciază fără aparataj special – $\chi^2 = 46,62$, $df = 5$, $p=0,00$. Indicele contribuției parametrului *puterea mușchilor* a avut de asemenea valoare statistic semnificativă – $p=0,023$.

În Modelul B2, *puterea musculară* apare extrem de semnificativă ($\chi^2 = 54,15$, $df = 10$, $p=0,001$), suplinită de prezența mutației în stare heterozigotă în gena *MTHFR 677* ($p=0,004$), valoarea funcției exponențiale – 3,712 la evaluarea parametrică 1,311.

Modelele C1 și C2 apar cu o semnificație a diferitor combinații ale *mutațiilor în genele modificatoare*, pronunțându-se pentru predicția agravării bolii până la 12 ani ($p=0,017$). Valoarea parametrului dependent (*plasarea în scaunul cu rotile până la 9 ani*) în analiza de regresie pentru heterozigoții compuși *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTRA2756G* ($\beta=33,7$) și *MTHFR C677T*, *MTRR A66G*, *MTRA2756G* ($\beta=34,7$) a evidențiat influențe semnificative în sens statistic ($p=0,001$ pentru ambele). Prin urmare, profilurile heterozigote compuse au influențat semnificativ vârstele de instalare a dizabilității 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 dizabilității, asigurată de model, a demonstrat că modelul este statistic semnificativ în general ($p=0,017$).

Aprecierea 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.

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. 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).

Astfel, prin metoda MDR a fost determinată o sinergie pronunțată între genele ciclului folat (*MTHFR677*, *MTHFR1298*) și celui metioninic (*MTR A2756G*) cu gena *eNOS* (disfuncție

endotelială), asociată cu un efect dublu al relației genelor *MTR* și *MTRR* în cazul unei evoluții rapide a bolii, cu plasare în scaunul cu roțile până la 9 ani.

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; *MTRA66G* 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.

În cazul unei evoluții mai blânde a DMD, cu plasarea în scaunul cu roțile până la 12 ani, a fost identificat un efect antagonist puternic al interacțiunii dintre perechea *MTHFR1298 – eNOS*, coeficientul informațional (IG) constituie 1,64% (negativ), în timp ce în cadrul cercetării grupului de pacienți cu vârsta de până la 9 ani, interacțiunea acestei perechi era exprimată printr-un sinergism puternic și un IG de 0,82%. Prin urmare, această pereche poate avea un efect protector.

De asemenea, se observă slăbirea interacțiunii altor perechi, care au influențat printr-un sinergism puternic la vârsta de 9 ani: *MTHFR677 – MTHFR1298* (sinergism moderat, IG = 1,07–0,06%), și anume se micșorează doar impactul ciclului folat la vârsta de 12 ani, *MTRA2756G – eNOS* (IG = 0,98-0,59%), *MTRA2756G – MTHFR1298* (culoarea cafenie – 0, efect aditiv). Este de menționat creșterea influenței perechii *MTRA2756G – tip de deleție – sinergism pronunțat* la 12 ani (IG a crescut de la 0,4% la 9 ani până 1,82% la 12 ani). Astfel, ciclul metioninic și tipul deleției au influențe fundamentale asupra tabloului clinic la 12 ani.

Modificarea influenței (mai slabă decât în perechea descrisă mai sus) rămâne la perechea de gene *MTRA2756G – MTHFR677* la 12 ani (sinergie moderată, IG = 0,84% până la 9 ani și 1,04% până 12 ani), deci mutațiile compuse din genele ciclurile folat și metioninic la vârsta de 12 ani au o influență mai mare asupra manifestărilor clinice decât la 9 ani.

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 maladii, aplicând metodele statistice cu utilizarea analizei rețelelor ponderale privind co-expresia genelor (*WGCNA*). Mai multe blocuri de gene pot fi asociate cu progresia maladii și conform ipotezei, pot avea valoare statistic semnificativă în patogeneză DMD.

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.

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 anumit 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 anumit 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.

Lucrarea noastră demonstrează abordarea constructivă „fiecare genă acționează asupra unui semn anumit 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 dezvăluirea 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. 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 metaboliților și proceselor energetice și multe alte sisteme. Această viziune deschide noi orizonturi în cercetarea patogeniei procesului miopatic prin prisma medicinei 4P. (participare, personalizare, predicție, profilaxie).

În medicina contemporană, măsurile terapeutice și profilactice nu sunt individualizate, adică nu sunt direcționate spre corecția modificărilor molecular-celulare concrete la persoana respectivă, ele bazându-se 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 DMD a orientat autorul spre cercetarea respectivă – una și aceeași listă de medicamente, prescrise în scop de reabilitare, a avut un efect diferit asupra evoluției maladiei la pacienți.

Cercetarea noastră a identificat particularități unice ale genelor metabolismului homocisteinei și oxidului nitric la fiecare pacient cu diagnosticul DMD, care determină baza ereditară a individualității biochimice, amprenta irepetabilă a persoanei. Fenotipul fiecărui pacient este reflectarea particularităților individuale ale genotipului său, realizat în componența rețelelor genice locale și celor integrale. Am încercat să remodelăm esența a trei căi metabolice (ciclul acidului folic, ciclul metioninei – metabolismul homocisteinei, și funcția endotelială – creșterea producției NO, care este toxic în concentrații mari) și să evaluăm rolul a două substanțe toxice – homocisteina și oxidul nitric – la persoanele ce suferă de patologia monogenă: miodistrofia Duchenne/Becker.

Această lucrare este actuală prin sinergia a două aspecte, mereu prezente în medicină – aspectul teoretic și cel practic. Evaluarea efectului modificador al unui șir de sisteme genetice asupra expresiei fenotipice a bolilor monogenice este de o importanță fundamentală pentru înțelegerea patogenezei procesului patologic. Metoda modelării matematice ne-a permis să

apreciem rolul și importanța factorilor genetici în evoluția bolii și să realizăm pronosticul decurgerii procesului patologic.

Aspectul practic al lucrării constă în modificarea substanțială a principiului consilierii medico-genetice, prin identificarea formelor clinice potențial severe ale DMD/B. Ca rezultat, neurologii vor avea posibilitatea unei selectări timpurii a tratamentului individualizat, iar în unele cazuri vor putea aplica terapii preventive în etapa presimptomatică a bolii.

În etapa actuală de dezvoltare a geneticii medicale sunt necesare cercetări clinico-genetice complexe pentru soluționarea problemelor legate de diagnostic, prognosticul adecvat al evoluției maladiei, consultarea medico-genetică efectivă și căutarea căilor de corecție terapeutică pentru patologia dată. Rezultatele cercetării de față urmează să fie utilizate în practica clinică a neurologilor și geneticienilor, pentru a determina grupa de risc al progresării procesului miopatic, și deschid posibilități de prognosticare a procesului miopatic la un anumit pacient, urmate de stabilirea particularităților de care se va ține cont la aplicarea măsurilor de corecție metabolică individuală.

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 populațional-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 nozologice, frecvența miodistrofiei Duchenne/Becker a constituit 9,13; miodistrofiei centurilor – 5,3; distrofia musculară umăr-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 motosenzorială 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 (până 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, neurologi și 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 Protocoalelor 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 patogenzei 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.

Rezultatele științifice care derivă din acest studiu sunt:

1. Profilul epidemiologic, spectrul și frecvențele relative ale patologiilor neuromusculare ereditare în grupul de cercetare din Republica Moldova. Frecvența acestor patologii este de 23,5:100.000 locuitori.

2. Optimizarea managementului de diagnostic al patologiilor neuromusculare frecvent întâlnite în RM, care permite creșterea eficacității diagnosticului molecular.

3. Rezultatele cercetării sunt puse în aplicare în Laboratorul de Genetică Moleculară Umană și în activitatea secțiilor neurologice ale IMSP Institutul Mamei și Copilului, precum și în cabinetele de consultanță genetică ale Centrului de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală, sub formă de protocoale clinice de management al pacienților cu DMD și SMA și protocoale de cercetări de laborator (20 de acte de punere în practica de rutină a Laboratorului de Genetică Moleculară Umană).

4. Folosind datele cercetării, a fost elaborată modelarea matematică, ceea ce a permis evaluarea rolului și a importanței factorilor genetici modificatori în timpul progresării procesului patologic și crearea tabelului de predicție a evoluției acestuia.

5. Această cercetare a permis lărgirea cooperării cu colegii din alte țări și afilierea la diverse societăți științifice (InNerMeD, TREAT-NMD). Rezultatele obținute au fost folosite la lecțiile expuse studenților, masteranzilor, elevilor; de asemenea au fost prezentate la televiziune și în presa specializată, în scopul popularizării cunoștințelor științifice.

BIBLIOGRAFIE

1. Köhler S., Doelken S. C., Rath A., ş.a. Ontological phenotype standards for neurogenetics. *În: Hum. Mutat.*, 2012, vol. 33, nr. 9, p. 1333–1339.
2. Darras B. T., Jones H. R. Neuromuscular Problems of the Critically Ill Neonate and Child. *În: Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence: A Clinician's Approach*, 2014, p. 885–903.
3. Tuffery-Giraud S., Bérout C., Leturcq F., Ben Yaou R., ş.a. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: A model of nationwide knowledgebase. *În: Hum. Mutat.*, 2009, vol. 30, nr. 6, p. 934–945.
4. Кириленко Н., Федоров Н., Барышников Н., Дадали Е. Л., Поляков А. В. Нозологический спектр наследственных болезней нервной системы в городах Волгоград и Воложский. *Îн: Генетика*, 2004, vol. 40, nr. 9, p. 1262–1267.
5. Bushby K., Finkel R., Birnkrant D. J., Case L. E., ş.a. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Îн: Lancet Neurol.*, 2010, vol. 9, nr. 2, p. 177–189.
6. Birnkrant D. J., Bushby K., Bann C. M., Alman B. A., Apkon S. D., ş.a. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Îн: The Lancet Neurology*, 2018, Published online January 23, p. 1-15.
7. Davis J., Samuels E., Mullins L. Nutrition Considerations in Duchenne Muscular Dystrophy. *Îн: Nutrition in Clinical Practice*, 2015, vol. 30, nr. 4. p. 511–521.
8. Поляков А. В. Стратегия идентификации генетических локусов при гетерогенных менделирующих наследственных заболеваниях. Диссер. док. биол. наук : 03.00.26. - Москва, 2002. 236 с.
9. Chung W. Genetics of Neuromuscular Disorders. *Îн: Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence: A Clinician's Approach*, 2014, p. 17–31.
10. Kaplan J. C., Hamroun D. The 2015 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Îн: Neuromuscul. Disord.*, 2014, vol. 24, nr. 12, p. 1123–1153.
11. Sobrido M. J., Cacheiro P., Carracedo Á., Bertram L. Databases for neurogenetics: Introduction, overview, and challenges. *Îн: Hum. Mutat.*, 2012, vol. 33, nr. 9, p. 1311–1314.

12. Fokkema I.F.A.C., Taschner P.E.M., ș.a. LOVD v. 2.0: the next generation in gene variant databases Human. În: *Hum. Mutat.*, 2011, vol. 32, nr. 5, p. 557–563.
13. Tian X., Liang W.-C., Feng Y., Wang J., Zhang V. W., ș.a. Expanding genotype/phenotype of neuromuscular diseases by comprehensive target capture/NGS. În: *Neurol. Genet.*, 2015, vol. 1, nr. 2, p. e14–e14.
14. Sacare V. K. Molecular genetic characteristics of Duchenne-Becker muscular dystrophy in the Republic of Moldova. În: *Genetika*, 2008, vol. 44, nr. 10, p. 1404–1409.
15. Sacară 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: *Bul. Perinatol.*, 2012, vol. 3, nr. 55, p. 29–36.
16. Lehner B. Modelling genotype-phenotype relationships and human disease with genetic interaction networks. În: *J. Exp. Biol.*, 2007, vol. 210, nr. Pt 9, p. 1559–66.
17. Nallamilli B. R. R., Ankala A., Hedge M. Molecular diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. În: *Current Protocols in Human Genetics*, 2014, nr. 9, vol. 25, p. 1-29.
18. Clarke G. M., Anderson C. A., Pettersson F. H., ș.a. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. În: *Nat. Protoc.*, 2011, vol. 6, nr. 2, p. 121–133.
19. Field A., Miles J., Field Z. *Discovering Statistics Using SPSS*. Publications Ltd, 2012. 992 p.
20. Gola D., Mahachie John J. M., Van Steen K., König I. R. A roadmap to multifactor dimensionality reduction methods. În: *Brief. Bioinform.*, 2016, vol. 17, nr. 2, p. 293–308.
21. Sprincean M., Barbova N., Halabudenco E., Ețco L., ș.a. Rolul consultului medico-genetic în profilaxia bolilor genetice prin diagnostic citogenetic prenatal. În: *Bul. Perinatol.* , 2016, vol. 1, nr.69, p. 31–38.
22. Sacară V., Egorov V., Ușurelu N., ș.a. Optimizarea măsurilor de profilaxie primară a anomaliilor de dezvoltare folatdependente în Republica Moldova. În: *Bul. Perinatol.* , 2010, vol. 1, nr. 45, p. 9–17.
23. Sprincean M.; Halabudenco E.; Barbova N.; Egorov V., ș.a. Prenatal diagnosis and medical genetic counseling. În: *Bul. Acad. științe a Mold.*, 2015, vol. 2, nr.326, p. 38–46.
24. Șirocova N.; Scurtu V.; Boiciuc K.; Dulap D., ș.a. Asocierea mutațiilor frecvente în genele trombofilice cu pierderile de sarcină în populația Republicii Moldova. În: *Bul. Perinatol.*, 2014, vol. 1, nr.42, p. 205–210.
25. Bushby K. Neuromuscular diseases: Milestones in development of treatments. În: *The Lancet Neurology*, 2011, vol. 10, nr. 1. p. 11–13.

26. Bucelli R., Harms M. B. Neuromuscular Emergencies. În: *Semin. Neurol.*, 2015, vol. 35, nr. 6, p. 683–689.
27. Fardeau M., Desguerre I. Diagnostic workup for neuromuscular diseases. În: *Handb. Clin. Neurol.*, 2013, vol. 113, p. 1291–1297.
28. Rando T. A. Recent advances in the pathogenesis and treatment of neuromuscular diseases. În: *Current Opinion in Neurology*, 2012, vol. 25, nr. 5, p. 586–587.
29. Frazer K. L., Porter S., Goss C. The genetics and implications of neuromuscular diseases in pregnancy. În: *J. Perinat. Neonatal Nurs.*, 2013, vol. 27, nr. 3, p. 205–214.
30. Kaplan J. C. The 2009 version of the gene table of neuromuscular disorders. În: *Neuromuscul. Disord.*, 2009, vol. 19, nr. 1, p. 77–98.
31. Emery A. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases- a world survey. În: *Neuromuscul. Disord.*, 1991, vol. 1, p. 19–29.
32. Muzzey D., Evans E. A., Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. În: *Curr. Genet. Med. Rep.*, 2015, vol. 3, no. 4, pp. 158–165.
33. Anziska Y. Sternberg A. Exercise in neuromuscular disease. În: *Muscle and Nerve*, 2013, vol. 48, nr. 1, p. 3–20.
34. Buu M. C. Respiratory complications, management and treatments for neuromuscular disease in children. În: *Current Opinion in Pediatrics*, 2017, vol. 29, nr. 3. p. 326–333.
35. Carron M. Respiratory benefits of deep neuromuscular block during laparoscopic surgery in a patient with end-stage lung disease. În: *British Journal of Anaesthesia*, 2015, vol. 114, nr. 1. p. 158–159.
36. Jasmi F. Al, Jumah M. Al, Alqarni F., Al-Sanna'a N., ș.a. Diagnosis and treatment of late-onset Pompe disease in the Middle East and North Africa region: Consensus recommendations from an expert group. În: *BMC Neurology*, 2015, vol. 15, nr. 1, p. 1-17.
37. Douglas A. G. L., Wood M. J. A. Splicing therapy for neuromuscular disease. În: *Mol. Cell. Neurosci.*, 2013, vol. 56, p. 169–185.
38. Mendell J. R., Rodino-Klapac L. R., Sahenk Z., Roush K. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. În: *Ann. Neurol.*, 2013, vol. 74, nr. 5, p. 637–647.
39. Simoens S. Huys I. Market access of Spinraza (Nusinersen) for spinal muscular atrophy: Intellectual property rights, pricing, value and coverage considerations. În: *Gene Therapy*, 2017, vol. 24, nr. 9. p. 539–541.
40. Marcoci C., Lisnic V., Gavriiliuc M., Odainic O., ș.a. Prevalence of Multiple Sclerosis in the Republic of Moldova. În: *Neuroepidemiology*, 2016, vol. 46, nr. 3, p. 166–172.

41. Sacară V., Levitschi A., Groppa S. Diagnosticul molecular-genetic în republica Moldova: istoria și perspective. În: *Bul. Perinatol.*, 2016, vol. 1, nr. 69, p. 20–26.
42. Duca M. Bioinformatica – un nou domeniu de studii în biologie pentru Republica Moldova. În: *Akademos*, 2013, vol. 3, nr. 30, p. 28–35.
43. Heier C. R., Damsker J. M., Yu Q., Dillingham B. C., ș.a. VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. În: *EMBO Mol. Med.*, 2013, nr. 5, p. 1569-1585.
44. Gonzalez-Medina S. Update on the cause of equine atypical myopathy. În: *Veterinary Record*, 2015, vol. 176, nr. 6, p. 143–145.
45. McGreevy J. W., Hakim C. H., McIntosh M. A., Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. În: *Dis. Model. Mech*, 2015, vol. 8, nr. 3, p. 195–213.
46. Yiu E. M., Kornberg A. J. Duchenne muscular dystrophy. În: *Journal of Paediatrics and Child Health*, 2015, vol. 51, nr. 8, p. 759–764.
47. Lin B., Li Y., Han L., Kaplan A. D., ș.a. Modeling and studying mechanism of dilated cardiomyopathy using induced pluripotent stem cells derived from Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) patients. În: *Dis. Model. Mech.*, 2015, vol. 8, nr. 5, p. 457–466.
48. Sajjad A., Novoyatleva T., Vergarajauregui S., ș.a. Lysine methyltransferase Smyd2 suppresses p53-dependent cardiomyocyte apoptosis. În: *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 2014, vol. 1843, nr. 11, p. 2556–2562.
49. Kinnett K., Rodger S., Vroom E., ș.a. Imperatives for DUCHENNE MD: A simplified guide to comprehensive care for duchenne muscular dystrophy. În: *PLoS Curr.*, 2015, vol. 7, ecurrents.md.87770501e86f36f1c71e0a5882ed9ba1.
50. Chung J., Smith A. L., ș.a. Twenty-year follow-up of newborn screening for patients with muscular dystrophy. În: *Muscle and Nerve*, 2016, vol. 53, nr. 4, p. 570–578.
51. Sage J. E., Gavin P. Musculoskeletal MRI. În: *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2016, vol. 46, nr. 3, p. 421–451.
52. Sacară V. Posibilitățile moderne a ADN-diagnosticului al miodistrofiei Duchenne-Becker. În: *Bul. Perinatol.*, 2000, vol. 4, p. 46–48.
53. Kunkel L. M., Monaco P., ș.a. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. În: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, vol. 82, nr. 14, p. 4778–4782.
54. Flanigan K. M. Duchenne and becker muscular dystrophies. În: *Neurologic Clinics*, 2014,

- vol. 32, nr. 3. pp. 671–688.
55. Humbertclaude V., ş.a. Phenotypic heterogeneity and phenotype-genotype correlations in dystrophinopathies: Contribution of genetic and clinical databases. În: *Rev. Neurol. (Paris)*, 2013, vol. 169, nr. 8–9, p. 583–594.
 56. Koenig M., Hoffman E. P., Bertelson C. J., ş.a. Complete cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. În: *Cell*, 1987, vol. 50, nr. 3, p. 509–517.
 57. Dubowitz V., Cohn R. D. Dystrophin and Duchenne dystrophy. În: *Neuromuscular Disorders*, 2015, vol. 25, nr. 5, p. 361–362.
 58. Bengtsson N. E., Hall J. K., Odom G. L., ş.a. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. În: *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, p. 1-9.
 59. Wang Y., Marino-Enriquez A., Bennett R. R., ş.a. Dystrophin is a tumor suppressor in human cancers with myogenic programs. În: *Nat. Genet.*, 2014, vol. 46, no. 6, pp. 601–606.
 60. Bies R. D., Friedman D., ş.a. Expression and localization of dystrophin in human cardiac Purkinje fibers. În: *Circulation*, 1992, vol. 86, nr. 1, p. 147–153.
 61. Ameen V., Robson L. G. Experimental models of duchenne muscular dystrophy: relationship with cardiovascular disease. În: *Open Cardiovasc. Med. J.*, 2010, vol. 4, nr.1, p.265-277.
 62. Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. În: *Lancet Neurology*, 2003, vol. 2, nr. 12. p. 731–740.
 63. Desguerre I., Christov C., Mayer M., ş.a. Clinical heterogeneity of Duchenne muscular dystrophy (DMD): Definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. În: *PLoS One*, 2009, vol. 4, nr. 2, p. e4347.
 64. Henderson D. M., Lin A. Y., Thomas D. D., Ervasti J. M. The carboxy-terminal third of dystrophin enhances actin binding activity. În: *J. Mol. Biol.*, 2012, vol. 416, nr. 3, p. 414–424.
 65. Gazzoli I., Pulyakhina I., Verwey N. E., Ariyurek Y., Laros J. F. J., ş.a. Non-sequential and multi-step splicing of the dystrophin transcript. În: *RNA Biol.*, 2016, vol. 13, nr. 3, p. 290–305.
 66. Tian L. J., Cao J. H., Deng X. Q., Zhang C. L., Qian T., ş.a. Gene expression profiling of Duchenne muscular dystrophy reveals characteristics along disease progression. În: *Genet.*

- Mol. Res., 2014, vol. 13, nr. 1, p. 1402–11.
67. Arsanto J. P., Caubit X., Rivier F., ș.a. Expression patterns of dystrophin products, especially of apodystrophin- 1/Dp71, in the neural retina of Amphibian urodele *Pleurodeles waltl*. În: *Int. J. Dev. Biol.*, 1999, vol. 43, nr. 1, p. 75–83.
 68. Muntoni F., Gobbi P., Sewry C., Sherratt T., ș.a. Deletions in the 5' region of dystrophin and resulting phenotypes. În: *J. Med. Genet.*, 1994, vol. 31, nr. 11, p. 843–847.
 69. Lim B. C., Lee S., Shin J.-Y., Kim J.-I., ș.a. Genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing technology: comprehensive mutational search in a single platform. În: *J. Med. Genet.*, 2011, vol. 48, nr. 11, p. 731–736.
 70. Nicholson L. V, Bushby K. M., Johnson M. A., ș.a. Dystrophin expression in Duchenne patients with “in-frame” gene deletions. În: *Neuropediat.*, 1993, vol. 24, nr. 2. p. 93–97.
 71. Park K. S., Oh D. Gene therapy for muscular dystrophies: progress and challenges. În: *J Clin Neurol*, 2010, vol. 6, nr. 3, p. 111–116.
 72. Hoffman E. P., Bronson A., Levin A. A., ș.a. Restoring dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy muscle: Progress in exon skipping and stop codon read through. În: *American Journal of Pathology*, 2011, vol. 179, nr. 1. p. 12–22.
 73. Aartsma-Rus A., Straub V., Hemmings R., ș.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.
 74. McGreevy J. W., Hakim C. H., McIntosh M. A., Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. În: *Disease Models & Mechanisms*, 2015, nr. 8, p. 195-213.
 75. Nix E. H., Aartsma-Rus A. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. În: *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2017, vol. 17, nr. 2. p. 225–236.
 76. Dick E., Kalra S., Anderson D., George V., ș.a. Exon Skipping and Gene Transfer Restore Dystrophin Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells-Cardiomyocytes Harboring DMD Mutations. În: *Stem Cells Dev.*, 2013, vol. 22, nr. 20, p. 2714–2724.
 77. Ghosh T., Basu U. Cis-acting sequence elements and upstream open reading frame in mouse utrophin-A 5'-UTR repress cap-dependent translation. În: *PLoS One*, 2015, vol. 10, nr. 7, p.1-13.
 78. Fairclough R. J., Wood M. J., Davies K. E. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. În: *Nat. Rev. Genet.*, 2013, vol. 14, nr. 6, p.

- 373–8.
79. Arnold E. S, Fischbeck K. H. Spinal muscular atrophy. *Handbook of Clinical Neurology*, 2018, 148 p.
 80. Giavazzi A., Setola V., Simonati A., Battaglia G. Neuronal-specific roles of the survival motor neuron protein: evidence from survival motor neuron expression patterns in the developing human central nervous system. *În: J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2006, vol. 65, nr. 3, p. 267–277.
 81. Lumaka A., Bone D., Lukoo R. ., ș.a. Werdnig-Hoffmann disease: Report of the first case clinically identified and genetically confirmed in Central Africa (Kinshasa-Congo). *În: Genet. Couns.*, 2009, vol. 20, nr. 4, p. 349–358.
 82. Godlewski C.A, Castellanos P.F. Pre-emptive awake airway management under dexmetomidine sedation in a parturient with muscular atrophy type-2. *În: Intern. J. of Obstetric Anesthesia*, 2017, vol. 33, p.81-84.
 83. Jae N., Preusser C., Kruger T., Tkacz I. D., Engstler M., Michaeli S., Bindereif A. snRNA-specific role of SMN in trypanosome snRNP biogenesis in vivo. *În: RNA Biol.*, 2011, vol. 8, nr. 1, p. 90–100.
 84. Nishio H., Ishikawa Y., Lee M. J., ș.a. High incidence of a survival motor neuron gene/(c)BCD541 gene ratio of 2 in Japanese parents of spinal muscular atrophy patients: A characteristic background of spinal muscular atrophy in Japan?. *În: J. Neurol.*, 1999, vol. 246, nr. 1, p. 48–52.
 85. Fallini C., Bassell G. J., Rossoll W. Spinal muscular atrophy: The role of SMN in axonal mRNA regulation. *În: Brain Research*, 2012, vol. 1462. p. 81–92.
 86. Faravelli I, Nizzardo M., Comi G. P., Corti S. Spinal muscular atrophy-recent therapeutic advances for an old challenge. *În: Nature Reviews Neurology*, 2015, vol. 11, nr. 6. p. 351–359.
 87. Kerr D. A., Nery J. P., Traystman R. J., Chau B. N., Hardwick J. M. Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *În: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, vol. 97, nr. 24, p. 13312–7.
 88. Amara A., Adala L., Ben Charfeddine I., ș.a. Correlation of SMN2, NAIP, p44, H4F5 and Occludin genes copy number with spinal muscular atrophy phenotype in Tunisian patients. *În: Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 2012, vol. 16, nr. 2, p. 167–174.
 89. Ratni H., Karp G. M., Weetall M., ș.a. Specific Correction of Alternative Survival Motor Neuron 2 Splicing by Small Molecules: Discovery of a Potential Novel Medicine to Treat

- Spinal Muscular Atrophy. În: *J. Med. Chem.*, 2016, vol. 59, nr. 13, p. 6086–6100.
90. Team H., Julia M., Daley M. ş.a. Correct Splicing : The Desolation of SMA Interactions Between Gemin-2 and SMN. În: *Med. Coll. Wisconsin, Cent. Biomol. Model*, 2014., p. 2-10.
 91. Luo M., Liu L., Peter I., ş.a. An Ashkenazi Jewish SMN1 haplotype specific to duplication alleles improves pan-ethnic carrier screening for spinal muscular atrophy. În: *Genet. Med.*, 2014, vol. 16, nr. 2, p. 149–156.
 92. Zeng J., Lin Y., Yan A., ş.a. Establishment of a molecular diagnostic system for spinal muscular atrophy experience from a clinical laboratory in china. În: *J. Mol. Diagn.*, 2011, vol. 13, nr. 1, p. 41–47.
 93. Naryshkin N. A., Weetall M., Dakka A., ş.a. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. În: *Science*, 2014, vol. 345, nr. 6197, p. 688-693.
 94. Khaniani M. S., Derakhshan S. M., Abasalizadeh S. Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy: clinical experience and molecular genetics of SMN gene analysis in 36 cases. În: *J. Prenat. Med.*, 2013, vol. 7, nr. 3, p. 32–4.
 95. Akbari M. T., Noruzinia M., Mozdarani H., Hamid M. Determination of exon 7 SMN1 deletion in Iranian patients and heterozygous carriers by quantitative real-time PCR. În: *J. Genet.*, 2011, vol. 90, nr. 1, p. 133–136.
 96. Hua Y., Sahashi K., Rigo F., Hung G., ş.a. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. În: *Nature*, 2011, vol. 478, nr. 7367, p. 123–126.
 97. Li D. K., Tisdale S., Lotti F., Pellizzoni L. SMN control of RNP assembly: From post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. În: *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2014, vol. 32. p. 22–29.
 98. Darras B., Markowitz J., Monani U., ş.a. *Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence (Second Edition). A Clinician's Approach*. În: Academic press, 2015, p. 117-145.
 99. Hua Y., Sahashi K., Hung G., ş.a. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. În: *Genes Dev.*, 2010, vol. 24, nr. 15, p. 1634–1644.
 100. Gubitza A. K., Feng W., Dreyfuss G. The SMN complex. În: *Experimental Cell Research*, 2004, vol. 296, nr. 1. p. 51–56.

101. Zhang R., So B. R., Li P., Yong J., ş.a. Structure of a key intermediate of the SMN complex reveals Gemin2's crucial function in snRNP assembly. *În: Cell*, 2011, vol. 146, n. 3, p. 384–395.
102. d'Ydewalle C., Ramos D. M., Pyles N. J., ş.a. The Antisense Transcript SMN-AS1 Regulates SMN Expression and Is a Novel Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy. *În: Neuron*, 2017, vol. 93, nr. 1, p. 66–79.
103. Mercuri E., Darras B. T., Chiriboga C. A., ş.a. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *În: N. Engl. J. Med.*, 2018, vol. 378, nr.7, p. 625-635.
104. Bertini E., Dessaud E., Mercuri E., Muntoni F., ş.a. Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or non-ambulatory type 3 spinal muscular atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *În: Lancet Neurol.*, 2017, vol.16, nr. 7, p.513-522.
105. 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.
106. Glanzman A. M., Mazzone E., Main M., ş.a. The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): Test development and reliability. *În: Neuromuscul. Disord.*, 2010, vol. 20, nr. 3, p. 155–161.
107. 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, no. 16 Supplement, p.1526–632X.
108. Natale R., Scott S. H., Camejo S. T, Hernandez M., Sellas-Lamberty O. Cherish the family: A program model of strengths and attachment in reunifying substance-abusing mothers with their children. *În: Child Welfare*, 2012, vol. 91, nr. 5, p. 73–95.
109. Lou K.-J. Selectively splicing SMN2. *În: SciBX*, 2014, vol. 7, nr. 34, p. 1–3.
110. Hwee D. T., Kennedy A. R., Hartman J. J., ş.a. The Small-Molecule Fast Skeletal Troponin Activator, CK-2127107, Improves Exercise Tolerance in a Rat Model of Heart Failure. *În: J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2015, vol. 353, nr. 1, p. 159–168.
111. Mendell J. R., Al-Zaidy S., Shell R., ş.a. AVXS-101 Phase 1 gene therapy clinical trial in SMA Type 1: Event free survival and achievement of developmental milestones. *În: Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 2017, vol. 21, p. e13–e14.
112. Landrieu P., Baets J., De Jonghe P. Hereditary motor-sensory, motor, and sensory

- neuropathies in childhood. În: *Handb. Clin. Neurol.*, 2013, vol. 113, p. 1413–1432.
113. McDonald C. M. Clinical approach to the diagnostic evaluation of hereditary and acquired neuromuscular diseases. În: *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 2012, vol. 23, nr. 3. p. 495–563.
 114. Bird T.D. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview. În: *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK1358/> (vizitat 10.01.2019).
 115. Jones E. A., Brewer M. H., Srinivasan R. Distal enhancers upstream of the Charcot-Marie-Tooth type 1A disease ene PMP22. În: *Hum. Mol. Genet.*, 2012, vol. 21, nr. 7, p. 1581–1591.
 116. van Paassen B.W., van der Kooi A.J., van Spaendonck-Zwarts K.Y., ș.a. PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. În: *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2014, vol. 9, nr. 38, p. 1-15.
 117. И. В. Мерсиянова. Картирование и идентификация нового локуса аксональной формы наследственной мото-сенсорной нейропатии :Болезни Шарко-Мари-Тута II типа. Автореферат кандидат биологических наук, 2001. 21 с.
 118. Timmerman V., Strickland A. V., Züchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. În: *Genes*, 2014, vol. 5, nr. 1, p. 13-32.
 119. Hoyle J.C., Isfort M.C., Roggenbuck J., Arnold W.D. The genetics of Charcot–Marie–Tooth disease: current trends and future implications for diagnosis and management. În: *Appl Clin Genet.*, 2015, vol. 8, p. 235–243.
 120. Gess B., Baets J., De J. P., ș.a. Ascorbic acid for the treatment of Charcot-Marie-Tooth disease. În: *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015, nr. 12, p. 1-67.
 121. Levin B. L, Varga E. MTHFR: Addressing Genetic Counseling Dilemmas Using Evidence-Based Literature. În: *Journal of Genetic Counseling*, 2016, vol. 25, nr. 5. p. 901–911.
 122. Moll S., Varga E. A. Homocysteine and MTHFR mutations. În: *Circulation*, 2015, vol. 132, nr. 1, p. e6–e69.
 123. García-Minguillán C. J., Fernandez-Ballart J. D., Ceruelo S., ș.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.
124. Yang B., Fan S., Zhi X., ş.a. Association of MTHFR A1298C polymorphism (but not of MTHFR C677T) with elevated homocysteine levels and placental vasculopathies. *În: PLoS ONE*, 2014, vol. 9, nr. 2, p. e87497
 125. Cordani N., Pisa V., Pozzi L., C Sciorati, E Clementi. Nitric Oxide Controls Fat Deposition in Dystrophic Skeletal Muscle by Regulating Fibro Adipogenic Precursor Differentiation *În: Stem cells*, 2014, vol. 32, nr. 4, p. 874-885.
 126. Zhang J., Zheng Y. G. SAM/SAH Analogs as Versatile Tools for SAM-Dependent Methyltransferases. *În: ACS Chemical Biology*, 2016, vol. 11, nr. 3. p. 583–597.
 127. Li W. X., Dai S. X., Zheng J. J., Liu J. Q., Huang J. F. 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.
 128. Liew S.-C., Gupta E.D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *În: European Journal of Medical Genetics*, 2015, vol. 58, nr. 1, p. 1-10.
 129. Wang P., Li S., Wang M., He J., Xi S. Association of MTRR A66G polymorphism with cancer susceptibility: Evidence from 85 studies. *În: Journal of Cancer*, 2017, vol. 8, nr. 2, p. 266-277.
 130. Wang Y., Liu Y., Ji W., ş.a. Analysis of MTR and MTRR Polymorphisms for Neural Tube Defects Risk Association. *În: Medicine (Baltimore)*, 2015, vol. 94, nr. 35, p. e1367
 131. Zara-Lopes T., Gimenez-Martins A.P.A., Nascimento-Filho C.H.V., ş.a. Role of MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms in thyroid and breast cancer development. *În: Genet. Mol. Res.*, 2016, vol. 15, nr. 2, p. 1-11.
 132. Buchwalow I. B., Minin E. A., Müller F.-U., ş.a. Nitric oxide synthase in muscular dystrophies: a re-evaluation.. *În: Acta Neuropathol.*, 2006, vol. 111, nr. 6, p. 579-88.
 133. Grandvilllemin I, Buffat C., Boubred F., ş.a. Arginase upregulation and eNOS uncoupling contribute to impaired endothelium-dependent vasodilation in a rat model of intrauterine growth restriction. *În: Am. J. of Physiology*, 2018, vol. 315, nr. 3, p. R509-R520.
 134. Torgerson D.G., Giri T., Druley T.E., Zheng J., ş.a. Pooled Sequencing of Candidate Genes Implicates Rare Variants in the Development of Asthma Following Severe RSV Bronchiolitis in Infancy. *În: PLoS ONE*, 2015, vol. 10, nr. 11, p. e0142649.
 135. da Silva R., Trapé Á., Reia T., Lacchini R., ş.a. Association of endothelial nitric oxide

- synthase (eNOS) gene polymorphisms and physical fitness levels with plasma nitrite concentrations and arterial blood pressure values in older adults. *În: PLoS ONE*, 2018, vol. 13, nr. 10, p. e0206254.
136. Sansbury B. E., Hill B.G. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide *În: Free Radical Biology and Medicine*, 2014, p. 73383–399.
 137. Takahashi T., Harris R. C. Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in Diabetic Nephropathy ; Lessons from Diabetic eNOS Knockout Mice. *În: J. Diabetes Res.*, 2014, vol. 2014, p. 1–17.
 138. Dabiré H., Barthélémy I., Blanchard-Gutton N., 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.
 139. Li Q., Yon J., Cai H., Angeles C. L., Angeles L. Mechanisms and Consequences of eNOS Dysfunction in Hypertension. *În: J. Hypertens.*, 2016, vol. 33, nr. 6, p. 1128–1136.
 140. Peng H., Zhuang Y., Chen Y., Rizzo A. N., Chen W. The characteristics and regulatory mechanisms of superoxide generation from eNOS reductase domain. *În: PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 10, p. e0140365.
 141. SuJin Bo. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *În: World J Cardiol.*, 2015, vol. 7, nr. 11, p. 719–741.
 142. Vanini F., Kashfi K., Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *În: Redox Biology*, 2015, vol. 6. p. 334–343.
 143. Akhter M. S., Biswas A., Saxena R. Role of endothelial nitric oxide synthase gene in vascular diseases. *În: Eastern Journal of Medicine*. 2009, vol. 14, (2) p.46-50.
 144. Sukriti S., Tauseef M., Yazbeck P., Mehta D. Mechanisms regulating endothelial permeability. *În: Pulm Circ*, 2014, vol. 4, nr. 4, p. 535-551.
 145. Kraehling J.R., Sessa W.C. Contemporary Approaches to Modulating the Nitric Oxide–cGMP Pathway in Cardiovascular Disease. *În: Circulation Research*, 2017, vol. 120, nr. 7, p. 1174–1182.
 146. Li H., Horke S., Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *În: Atherosclerosis*, 2014, vol. 237, nr. 1. p. 208–219.
 147. Luo S., Lei H., Qin H., Xia Y. Molecular Mechanisms of Endothelial NO Synthase Uncoupling. *În: Current Pharmaceutical Design*, 2014, vol. 20, p. 3548-3553.
 148. Bandara N., Gurusinghe S., Lim S. Y., ş.a. Molecular control of nitric oxide synthesis through eNOS and caveolin-1 interaction regulates osteogenic differentiation of adipose-

- derived stem cells by modulation of Wnt/ β -catenin signaling. În: *Stem Cell Res. Ther.*, 2016, vol. 7, nr. 1, p. 1–15.
149. Tomuschat C., O'Donnell A. M., Coyle D., ș.a. NOS-interacting protein (NOSIP) is increased in the colon of patients with Hirschsprungs's disease. În: *J. Pediatr. Surg.*, 2017, vol. 52, nr. 5, p. 772–777.
 150. Gavriluic A., Sacara V., Grigori E. Elaborarea măsurilor diagnostice, profilactice și organizator –metodice privind patologiile ereditare și congenitale. În: *Bul. Perinatol.*, 2002, vol. 2, p. 9–14.
 151. Sacara V., Egorov V., Groppa S., Stratila M., Mosin V. Medico- genetic assistance in the Republic of Moldova. În: *Bul. Acad. științe a Mold.*, 2010, vol. 2, nr. 311, p. 84–89.
 152. Emery A. Diagnostic criteria for neuromuscular disorders. Royal Society of Medicine Pr Ltd; 2 edition (January 1, 1997), 104 p.
 153. Bushby K., Finkel R., Birnkrant D. J., Case L. E., ș.a. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. În: *The Lancet Neurology*, 2010, vol. 9, nr. 1, p. 77–93.
 154. Cecile A., Janssens J. W., Ioannidis J. P. A., Van Duijn C. M., Little J., Khoury M. J. Strengthening the reporting of genetic risk prediction studies: The GRIPS statement. În: *European Journal of Clinical Investigation*, 2011, vol. 41, nr. 9. p. 1004–1009.
 155. Chamberlain J. S. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy via multiplex DNA amplification. În: *Nucleic Acids Res.*, 1988, vol. 16, nr. 23, p. 11141–11156.
 156. Beggs A., Koenig M., Boyce F., Kunkel L. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. În: *Hum Genet.*, 1990, vol. 86, nr. 1, p. 45-48.
 157. Ashton Emma 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.
 158. Sacară V. Metodele molecular-genetice aplicate în neuropediatrie în Republica Moldova. În: *Bul. Perinatol.*, 2004, vol. 2, p. 254–257.
 159. Hlistun V., Boiciuc K., Scurtu V., Ușurelu N., Sacară V. Dereglări la nivelul genelor ciclului folat și metioninic la femei cu pierderi reproductive. În: *Bul. Perinatol.*, 2014, vol. 63, p. 39–43.
 160. Реброва О. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. Москва: Медиа Сфера, 2002, 312 с.
 161. Кайданов Л. Генетика популяций, Москва: Высшая школа. Москва, 1996, 320 с .

162. Sacară V., Levițchi A., Groppa S., Duca M., Moșin V. Spectrul nozologic al bolilor ereditare ale sistemului nervos și particularitățile răspândirii patologiilor neuro-musculare în Republica Moldova. În: *Bul. Perinatol.*, 2012, vol. 3, nr. 55, p. 36–44.
163. Сакарэ В., Мошин В., Русу Л., Стратила Р. Мониторинг врожденной и наследственной патологии. Меры профилактики в республике Молдова. În: *Bul. Perinatol.*, 2007, vol. 1, p. 29–32.
164. Sacara V., Grigori E., Gavriluc A., ș.a. Elaboborarea și optimizarea măsurilor diagnostice, profilactice și organizator-metodice a patologiilor ereditare și congenitale. În: *Bul. Perinatol.*, 2004, vol. 1, p. 38–41.
165. Вельтищев Ю.Е., Темин П.А. Наследственные болезни нервной системы. М.: Медицина, 1998, 496 с.
166. Boiciuc Kiril, Ușurelu N., Strătilă M., Sacară. V. Fenilcetonuria în Republica Moldova - diagnosticul prin screening neonatal și analiza molecular genetică. În: *Patologia malformativă neonatală*, 2013, p. 146–153.
167. Харпер П. Практическое медико-генетическое консультирование. Москва: Медицина, 1984, 304 с.
168. Sacară V. Screening-ul molecular-genetic al mutațiilor majore în cazul afecțiunilor monogene frecvente ale sistemului nervos. În: *Bul. Perinatol.*, 2007, vol. 2, p. 15–19.
169. Иллариошкин С. Н., Иванова-Смоленская И. А., Маркова Е. Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. Москва: Медицинское информационное агенство, 2002, 591 с.
170. Дадали Е. Л. Наследственные нервно-мышечные заболевания: диагностика и медико-генетическое консультирование. Автореф. дис. д.м.н. Москва, 1999. 35 с.
171. Sacara V., Moșin V., Stratila M., ș.a. Morbiditatea prin maladii ereditare și congenitale. Măsurile de profilaxie. În: *Bul. Perinatol.*, 2007, vol. 4, p. 23–26.
172. Sacară V. Particularitățile clinica și molecular-genetice ale patologiilor neuromusculare în Republica Moldova. În: *Rev. Neurol. și Psihiatr. a copilului și Adolesc. din Rom.*, 2017, vol. 23, nr. 3, p. 63–73.
173. Sacara V., Ilina E. Primary calpoinopathy, the new mutation detected in the CAPN3 gene (the case of Moldavian LGND2A patient. În: *Eur. J. Hum. Genet.*, 2007, vol. 15, nr. 1, p. 184.
174. Holland A., Carberry S., Ohlendieck K. Proteomics of the dystrophin-glycoprotein complex and dystrophinopathy. În: *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2013, p. 1–18.

175. Breiling A., Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. În: *Epigenetics & Chromatin*, 2015, vol. 8, nr. 1, p. 24.
176. Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. În: *Lancet Neurology*, 2003, nr.12, p. 731-40.
177. Lee B., Nam S., Lee J., Ki C., ș.a. Genetic Analysis of Dystrophin Gene for Affected Male and Female Carriers with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. În: *J Korean Med Sci*, 2012, vol. 27, p. 274–280.
178. Fokkema I., del Dunnen J., Taschner P. LOVD: easy creation of locus-specific sequence variation database using an “LSDB-in-a-box“ approach. În: *Hum. Mutat*, 2005, vol. 26, p. 63–68.
179. Murugan S., Chandramohan A., Lakshmi B. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis,. În: *Indian J. Med. Res.*, 2010, nr. 132, p. 303–311.
180. Murugan S.M., Arthi C., Thilothammal N., Lakshmi B.R. Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy using molecular methods. În: *Indian J. Med. Res.*, 2013, vol. 137, nr. 6, p. 1102-11.
181. Sirocova N., Sacara 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.
182. Zárate-aspiros R., Rosas-sumano A. B., Paz-pacheco A., ș.a. Atrofia muscular espinal tipo 1: enfermedad de Werdnig-Hoffmann. În: *Bol Med Hosp Infant Mex*, 2013, vol. 70, nr. 1, p. 44–48.
183. Grosu I., Scurtu V., Stratilă R., Sacară V. Diagnosticul Prenatal al Distrofiei musculare Duchenne și Atrofiei musculare spinale pe parcursul a 4 ani și eficacitatea metodologiilor de diagnostic existente în R.Moldova. În: *Bul. Perinatol.*, 2014, vol. 3, nr. 63, p. 8–13.
184. Butchbach M.E.R. Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. În: *Front. Mol. Biosci.*, 2016, vol. 3, nr. 7, p. 1-10.
185. Sacară V. Aspecte contemporane ale neuropatiilor motosenzoriale ereditare în baza realizărilor genético-moleculare. În: *Bul. Perinatol.*, 2002, vol. 1, p. 22–26.
186. Sacară V. Aspecte clinico-genetice ale neuropatiilor senzitivo-motorii ereditare în Republica Moldova. În: *Bul. Acad. științe a Mold.*, 2008, vol. 5, nr. 19, p. 255–259.
187. Nightingale H., Pfeffer G., Horvath R. Chronic and slowly progressive weakness of the

- legs and hands. În: *BMJ*, 2014, vol. 348, nr. 15, p. 459–464.
188. Lupski J., Montes de Oca-Luna S., Slaugenhaupt R., ș.a. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. În: *Cell*, 1991, vol. 66, p. 219–239.
 189. Mittendorf K. F, Marinko J.T., Hampton C.M., ș.a. Peripheral myelin protein 22 alters membrane architecture. În: *Science Advances*, 2017, vol. 3, nr. 7, p. e1700220
 190. Fridman V., Bundy B., Reilly M. M., ș.a. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. În: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2014, p. 1–6.
 191. Zhou Y., Notterpek L. Promoting peripheral myelin repair. În: *Experimental Neurology*, 2016, vol. 283, p. 573–580.
 192. Collins S. L., Impey L. Prenatal diagnosis: Types and techniques. În: *Early Human Development*, 2012, vol. 88, nr. 1. p. 3–8.
 193. Sacară V. Analiza genetică a genei distrofinei la bărbații bolnavi și femeile purtătoare cu distrofie musculară Duchenne/Becker în Republica Moldova (1992-2012). În: *Bul. Perinatol.*, 2012, vol. 3, nr. 55, p. 29–35.
 194. Esposito G., Ruggiero R., Savarese M., ș.a. Prenatal molecular diagnosis of inherited neuromuscular diseases : Duchenne/Becker muscular dystrophy , myotonic dystrophy type 1 and spinal muscular atrophy. În: *Clin Chem Lab Med*, 2013, p. 6–12.
 195. Scurtu V., Sacară V., Strătilă M. Diagnosticul prenatal al patologiilor neuromusculare întâlnite în Republica Moldova. În: *Patologia malformativă neonatală*, 2013, pp. 72–81.
 196. López-Hernández L., Gomez-Diaz B., Escobar-Cedillo R., ș.a. Duchenne muscular dystrophy in a developing country: Challenges in management and genetic counseling. În: *Genetic counseling*, 2014, vol. 25, p. 129-141.
 197. Wang Y., Yang Y., Liu J., ș.a. Whole dystrophin gene analysis by next-generation sequencing: a comprehensive genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. În: *Mol Genet Genomics*, 2014, vol. 289, nr. 5, p.1013–1021.
 198. Kolb Stephen J., Kissel John T. Spinal Muscular Atrophy A Timely Review. În: *Arch Neurol.*, 2011, vol. 68, nr.8, p. 1-11.
 199. Li W. How do SMA-linked mutations of SMN1 lead to structural/functional deficiency of the SMA protein? În: *PLoS One*, 2017, vol. 12, nr. 6, p. e0178519
 200. Potnis-lele M. Genetic etiology and Diagnostic strategies for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy : A 2012 update. În: *Indian J. Basic Appl. Med. Res.*, 2012, vol.2, nr. 5, p. 357–369.

201. Miorin M., Todorova A., Vitiello L. Detection of Heterozygotes for Intragenic Deletions in Families with Recurrence of Duchenne or Becker Muscular Dystrophy. *În: Basic Appl. Myol.*, 1997, vol. 7 (3), nr. 1, p. 265–269.
202. Katsanis S. H., Katsanis N. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *În: Nat. Publ. Gr.*, 2013, vol. 14, nr. 6, p. 415–426.
203. Parks M., Court S., Clear S., ș.a. Non invasive prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by relative haplotype dosage. *În: Prenatal Diagnosis*, 2016, vol. 36, p. 312-320
204. Helderman-van den Enden A. T. J. M., Madan K., Breuning M. H., ș.a. An urgent need for a change in policy revealed by a study on prenatal testing for Duchenne muscular dystrophy. *În: Eur. J. Hum. Genet.*, 2013, vol. 21, nr. 1, p. 21–6.
205. Condin C. J. Families. Experiences with Medical Research for Pediatric Rare Diseases: A Qualitative Ethnographic Study of Parents and Children Participating in Clinical Trials for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), A Thesis of PhD, The University of British Columbia (Vancouver), 2014, 285 p.
206. Hert D. G., Fredlake C. P., Barron A. E. Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A Comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *În: Electrophoresis*, 2008, vol. 29, p. 4618–4626.
207. Raymond F. L., Whittaker J., Jenkins L., Lench N., Chitty L. S. Molecular prenatal diagnosis: The impact of modern technologies. *În: Prenatal Diagnosis*, 2010, vol. 30, nr. 7. p. 674–681.
208. Perth W.A. Prenatal screening and diagnostic tests. *În: Western Australia, Dept. of Health*, 2011. 23 p.
209. Sacară V. Analiza molecular-genetică a unor boli monogenice ale sistemului nervos în Republica Moldova. *În: Bul. Acad. științe a Mold.*, 2007, vol. 2, nr. 11, p. 23–26.
210. Gotelli N. J., Stanton-Geddes J. Climate change, genetic markers and species distribution modelling. *În: Journal of Biogeography*, 2015, vol. 42, nr. 9. p. 1577–1585.
211. Howe R., Miron-Shatz T., Hanoch Y. Personalized Medicine Through SNP Testing for Breast Cancer Risk: Clinical Implementation *În: J. Genet Counsel*, 2015, vol. 24, nr. 5, p.744-51.
212. Баранов В. С., Кузнецова Т. В., Ивашенко Т. Э. Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней. Санкт-Петербург: Издательство Н-Л, 2009, 115 с.
213. Hannan Anthony J. Tandem repeats mediating genetic plasticity in health and disease. *În:*

- Nature Reviews Genetics, 2018, vol. 19, p. 286–298.
214. Amador M.A., Cavalcante G.C., Santos N.P., ș.a. Distribution of allelic and genotypic frequencies of IL1A, IL4, NFKB1 and PAR1 variants in Native American, African, European and Brazilian populations. În: BMC Res Notes, 2016, vol. 9, nr. 101, p.1-8.
 215. Баранов В. С. Генетический паспорт - основа индивидуальной и предиктивной медицины. Санкт-Петербург: Издательство Н-Л, 2009. 527с.
 216. Rush E. C., Katre P., Yajnik C. S. Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. În: European Journal of Clinical Nutrition, 2014, vol. 68, p. 2–7.
 217. Sacară V., Scurtu V., Duca M, Groppa S. Analiza asociativă a genelor ciclurilor folat, metioninic și genei sintetazei endoteliale NO la bolnavii de miodistrofie Duchenne și la populația săsătoasă din Republica Moldova. În: Bul. Acad. Științe a Mold. Științe medicale, 2014, vol. 42, p. 210–215.
 218. Березина О., Вайнер А. С., Поспелова Т. И., Воронина Е. Н., Филипенко М. Л. Ассоциация полиморфных вариантов генов фолатного цикла с риском развития агрессивных и индолентных лимфом. В: Бюллетень Сибирского Отделения Российской Академии Медицинских Наук, 2011, т. 31, н. 2 , с. 20-25.
 219. Sharma R., Raina J. K., Azad T., Kumar P., ș.a. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Gene Variations in Link with Breast Cancer in Jammu Region of Jammu and Kashmir State. În: Int J Hum Genetic, 2018, vol.18, nr. 3, p. 219-227.
 220. 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.
 221. 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.
 222. 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.
 223. Kim H., Kim Y., Lee I., ș.a. Association between polymorphisms of folate metabolizing enzymes and hematological malignancies. În: Leuk Res, 2009, vol. 33, p. 82–87, 2009.
 224. Sadananda A. M., Chandy S., Ramachandra N., ș.a. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in children. În: Indian J.

- Cancer, 2010, vol. 47, p. 41–45.
225. Olteanu H., Banerjee R. Human methionine synthase reductase. *În: J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, nr. 38, p. 35558–63.
226. Li W. X., Lv W. W., Dai S. X., Pan M. L., Huang J. F. Joint associations of folate, homocysteine and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms with dyslipidemia in a Chinese hypertensive population: a cross-sectional study. *În: Lipids Health Dis.*, 2015, vol. 14, nr. 1, p.1-11.
227. Yamaji T., Iwasaki M., Sasazuki S., *ș.a.* Methionine Synthase A2756G Polymorphism Interacts with Alcohol and Folate Intake to Influence the Risk of Colorectal Adenoma. *În: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2009, vol. 18, nr. 1, p. 267-274.
228. Hofmann A., Gosemann J. H., Takahashi T., *ș.a.* Imbalance of caveolin-1 and eNOS expression in the pulmonary vasculature of experimental diaphragmatic hernia. *În: Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.*, 2014, vol. 101, nr. 4, p. 341–346.
229. Tamás Rősze. Nitric oxide signaling and nitrosative stress in the musculoskeletal system. *În: Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, 2014, p. 2895-2926.
230. Serrano N. C., Díaz L. A., Casas J. P. Frequency of eNOS polymorphisms in the Colombian general population. *În: BMC Genet.*, 2010, vol. 11, p. 1-8.
231. Зинчук В.В., Жадько Д.Д. Полиморфизм гена эндотелиальной синтазы монооксида азота. Часть 2. Полиморфные варианты T786C, 4a/b. *În: Журнал ГрГМУ*, 2017, vol. 15, nr. 3, p. 267-274.
232. Zhang H., Zhu Y., Sun Y., *ș.a.* Serum creatinine level: A supplemental index to distinguish Duchenne muscular dystrophy from Becker muscular dystrophy. *În: Dis. Markers*, 2015, vol. 2015, p. 1-5.
233. 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.
234. Nelson C. E., Hakim C. H., Ousterout D. G., *ș.a.* In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *În: Science*, 2016, vol. 351, nr. 6271, p. 403-407.
235. Long C., Amoasii L., Mireault A. A., *ș.a.* Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *În: Science*, 2016, vol. 351, nr. 6271, p. 400-403.
236. Iannotti F.A., Pagano E., Guardiola O., *ș.a.* Genetic and pharmacological regulation of the

- endocannabinoid CB1 receptor in Duchenne muscular dystrophy. În: *Nature Communications*, 2018, vol. 9, p.1-13.
237. Monaco A. P., Bertelson C. J., Liechti-Gallati S., Moser H., Kunkel L. M., An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. În: *Genomics*, 1988, vol. 2, nr. 1, p. 90–95.
238. Aartsma-Rus A., Ginjaar I. B., Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. În: *J. of Med. Genetics*, 2016, vol. 53, nr. 3, p.145-151.
239. Гринио Л. П. Дюшенновская миодистрофия. Нижний Новгород: НГМА, 1998. 192 с.
240. Coote D.J., Davis M.R., Cabrera M., ș.a. CUGC for Duchenne muscular dystrophy (DMD). În: *European Journal of Human Genetics*, 2018, vol. 26, p.749–757.
241. Sacară V., Scvorțova E., Florea V. Analiza efectului modificador al factorilor genetici (genelor ciclului folat) asupra manifestărilor fenotipice în distrofia musculară Duchenne/Becker. În: *Bul. Perinatol.*, 2009, vol. 2, nr. 42, p. 45–51.
242. Bladen C. L., Salgado D., Monges S., ș.a. The TREAT-NMD DMD global database: Analysis of more than 7,000 duchenne muscular dystrophy mutations. În: *Hum. Mutat.*, 2015, vol. 36, nr. 4, p. 395–402.
243. DeCoster J., Claypool H. Data analysis in SPSS, 2004. <http://www.stat-help.com/spss.pdf> (vizitat 04.04.2016).
244. Cleophas T., Zwinderman A. SPSS for Starters. 2010, 73 p.
245. Leyland A. H., A review of multilevel modelling in SPSS. În: *Interface*, 2004, p. 1-20.
246. Sacară V., Mocan E., Scurtu V., Duca M., Groppa S. Evaluarea influenței genelor modificatoare a metabolismului asupra manifestărilor proceselor miopatie (pe exemplul Distrofiei musculare Duchenne/Becker). În: *Bul. Acad. Științe a Mold. Științe medicale*, 2014, vol. 42, p. 198–210.
247. Pallant J. SPSS survival manual. În: *J. Adv. Nurs.*, 2007, vol. 36, nr. 3, p. 478–478.
248. SPSS 24 Base User's Guide. Copyright © 2016 by IBM. 310 p.
249. Баранов В. Генетический паспорт - основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб: Изд-во Н-Л, 2009. 528 с..
250. Ghimbovschi S., Grigori E., Sacară V., Egorov V., Romanov L., Groppa S. Bilanțurile implementării programului complex de diagnostic etiopatogenic, corecție și profilaxie a bolilor ereditare și viciilor congenitale la copii. În: *Bul. Perinatol.*, 2001, vol. 1, p. 38–43.
251. Tyler A. L., McGarr T. C., Beyer B. J., ș.a. A genetic interaction network model of a complex neurological disease. În: *Genes Brain Behav.* 2014, nr. 13, vol. 8, p. 831 - 840.

252. Yi N. Statistical analysis of genetic interactions. În: *Genet. Res. (Camb)*., 2010, vol. 92, nr. 5–6, p. 443–459.
253. Van Lishout F., Mahachie John J. M., Gusareva E. S., ș.a. An efficient algorithm to perform multiple testing in epistasis screening. În: *BMC Bioinformatics*, 2013, vol. 14, nr. 1, p. 138.
254. Dumas M.-E. Metabolome 2.0: quantitative genetics and network biology of metabolic phenotypes. În: *Mol. Biosyst.*, 2012, vol. 8, nr. 10, p. 2494.
255. Muñoz-Tamayo R., Puillet L., Daniel J.-B., ș.a. Review: To be or not to be an identifiable model. Is this a relevant question in animal science modelling? În: *Animal*, 2017, vol. 12, nr. 4, p. 1-12.
256. Chai L. E., Loh S. K., Low S. T., ș.a. A review on the computational approaches for gene regulatory network construction. În: *Computers in Biology and Medicine*, 2014, vol. 48, nr. 1. p. 55–65.
257. Chen S., Fragoza R., Klei L., ș.a. An interactome perturbation framework prioritizes damaging missense mutations for developmental disorders. În: *Nature Genetics*, 2018, vol. 50, p.1032–1040.
258. Barabási A., Gulbahce N., Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. În: *Nat. Rev. Genet.* , 2011, vol. 12, nr. 1, p. 56–68.
259. Ježek P., Holendová B., Garlid K.D. Mitochondrial uncoupling proteins: subtle regulators of cellular redox signaling. În: *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018, vol. 29, nr. 7, p.667–714.
260. Planqué R., Hulshof J., Teusink B., ș.a. Maintaining maximal metabolic flux by gene expression control. În: *PLoS Comput Biol.*, 2018, vol. 14, nr. 9, p. 1-20.
261. Suntharalingham J. P., Buonocore F., Duncan A. J., Achermann J. C., DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. În: *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2015, vol. 29, p. 607-619.
262. Taylor M. B., Ehrenreich I. M. Higher-order genetic interactions and their contribution to complex traits. În: *Trends in Genetics*, 2015 vol. 31, nr. 1, p. 34-40
263. Ervasti J. M. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. În: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2007, vol. 1772, nr. 2. p. 108–117.
264. Spitali P., Hettne K., Tsonaka R., ș.a. Cross sectional serum metabolomic study of multiple forms of muscular dystrophy. În: *Journal of Cellular and Molecular Medicine*,

- 2018, vol. 22, nr. 4, p. 2442-2448.
265. Rezaei Tavirani M., Okhovatian F., Zamanian Azodi M., Rezaei Tavirani M. Duchenne muscular dystrophy (DMD) protein-protein interaction mapping. *Iran. J. Child Neurol*, 2017., vol. 11, nr. 4, p. 7–14.
 266. Oh S., Lee J., Kwon M. S., Weir B., Ha K., Park T. A novel method to identify high order gene-gene interactions in genome-wide association studies: gene-based MDR. *BMC Bioinformatics*, 2012, vol. 13, Suppl 9, p. S5.
 267. Gola D., Mahachie John J.M., van Steen K., König I. R. A roadmap to multifactor dimensionality reduction methods. *Briefings in Bioinformatics*, 2016, vol. 17, nr. 2, p. 293–308.
 268. Sacara V. Multifactor dimensionality reduction: detection gene-gene interaction in DMD studies. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2016, vol. 24, p. 215.
 269. Gao Q., McNally E. M. The Dystrophin Complex: structure, function and implications for therapy. *Compr Physiol.*, 2015, vol. 5, nr. 3, p. 1223–1239
 270. Swiderski K., Shaffer S.A., Gallis B. Phosphorylation within the cysteine-rich region of dystrophin enhances its association with β -dystroglycan and identifies a potential novel therapeutic target for skeletal muscle wasting. *Human Molecular Genetics*, 2014, vol. 23, nr. 25, p. 6697–6711
 271. Singh S. M., Bandi S., Mallela K. M. .The N- and C-Terminal Domains Differentially Contribute to the Structure and Function of Dystrophin and Utrophin Tandem Calponin-Homology Domains. *Biochemistry*, 2015, vol. 54, nr. 46, p. 6942-6950.
 272. Chamberlain J., Corrado K., Rafael J., Cox G., Hauser M., Lumeng C. Interactions between dystrophin and the sarcolemma membrane. *Soc Gen Physiol Ser.*, 1997, vol. 52, p. 19–29.
 273. Vulin A., Wein N., Strandjord D. M., Johnson E. K., *et al.* The ZZ domain of dystrophin in DMD: Making sense of missense mutations. *Hum. Mutat.*, 2014, vol. 35, nr. 2, p. 257–264.
 274. Waite A., Tinsley C. L., Locke M., Blake D. J. The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Ann. Med.*, 2009, vol. 41, nr. 5, p. 344–59.
 275. Garbincius J. F., Michele D. E. Dystrophin–glycoprotein complex regulates muscle nitric oxide production through mechanoregulation of AMPK signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015, vol. 112, nr. 44, p. 13663-8.
 276. Allen D.G., Whitehead N.P., Froehner S.C. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal

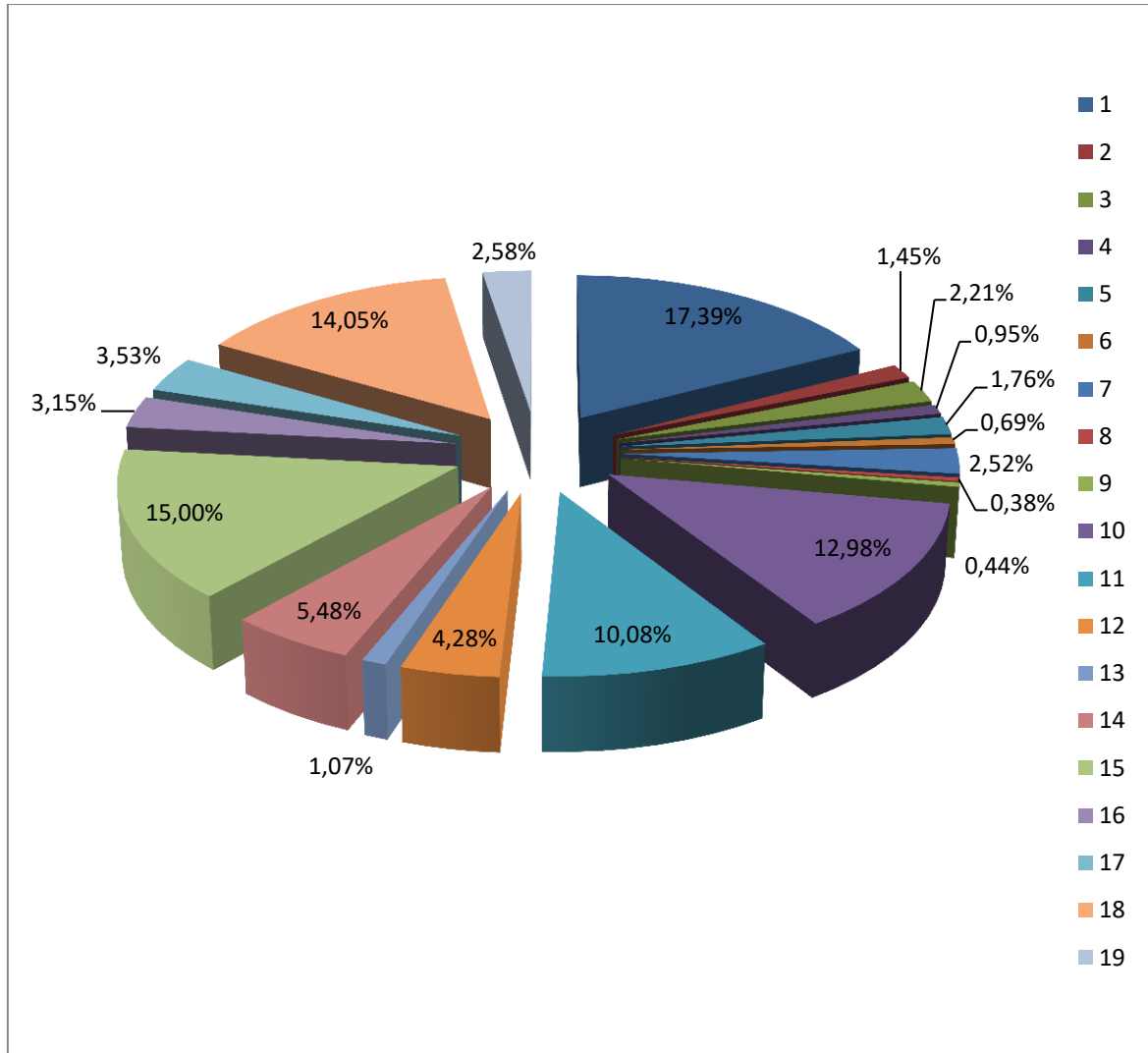
- Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *În: Physiol. Reviews*, 2016, vol. 96, nr. 1, p. 253-305.
277. Stamler J. S., Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *În: Physiol. Rev.*, 2001, vol. 81, nr.1, p. 209-237.
278. Vainzof M., Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *În: Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2003, vol. 36, nr. 5, p. 543-55.
279. De Palma C., Perrotta C., Pellegrino P., Clementi E., Cervia D. Skeletal muscle homeostasis in Duchenne muscular dystrophy: Modulating autophagy as a promising therapeutic strategy. *În: Front. Aging Neurosci.*, 2014, vol. 6, nr.7. p.188/1-8.
280. Sun C.-C., Li S.-J., Yang C.-L., ş.a. Sulforaphane attenuates muscle inflammation in dystrophin-deficient Mdx mice via Nrf2-mediated inhibition of NF-κB signaling pathway. *În: The Journal of Biological Chemistry*, 2015, vol. 290, nr. 29, p. 17784 –17795.
281. Echigoya Y., Yokota T. Skipping Multiple Exons of Dystrophin Transcripts Using Cocktail Antisense Oligonucleotides. *În: Nucleic Acid Therapeutics*, 2014, vol. 24, nr. 1, p. 57-68.
282. Jarmin S., Kymalainen H., Popplewell L., Dickson G. New developments in the use of gene therapy to treat Duchenne muscular dystrophy *În: Expert Opinion on Biological Therapy*, 2014, vol. 14, nr. 2, p. 209-230.
283. Kharraz Y., Guerra J., Pessina P., ş.a. Understanding the Process of Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *În: BioMed Research International*, 2014, vol. 2014, p. 1-11.
284. Smith L.R., Barton E.R. Collagen content does not alter the passive mechanical properties of fibrotic skeletal muscle in mdx mice. *În: Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, vol. 306,p. 889–898.
285. Shoji E., Sakurai H., Nishino T., ş.a. Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells. *În: Scientific Reports*, 2015, vol. 5, p. 1-13.
286. Nelson M. D., Rader F., Tang X., ş.a. PDE5 inhibition alleviates functional muscle ischemia in boys with Duchenne muscular dystrophy. *În: Neurology*, 2014, vol. 82, nr. 23, p. 2085 - 2091.
287. Самигуллина А. Э., Кушубекова А. К. Метаболизм Гомоцистеина и роль гипергомоцистеинемии в развитии невынашивания беременности (Обзор Литературы). *Îн: ИзвестияВузовКыргызстана*, 2015, nr. 7, p. 36-39

288. Sierakowska-Fijałek A., Kaczmarek P., Pokoca L., ș.a. Homocystein serum levels and lipid parameters in children with atherosclerosis risk factors. În: Pol. Merkur. Lekarski, 2007, vol. 22, p. 146–149.
289. Salimi S., Firoozrai M., Nourmohammadi I., Shabani M., Mohebbi A. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran. În: Indian J. Med. Res., 2006, vol. 124, nr.6, p. 683-8.
290. Vanhoutte P. M., Zhao Y., Xu A., Leung S.W.S. Thirty Years of Saying NO Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. În: Circulation Research, 2016, vol. 119, nr. 2, p. 375 - 396.
291. Suganya N., Bhakkiyalakshmi E., Sarada D., Ramkumar K. Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: role of polyphenols. În: British Journal of Nutrition, 2016, vol. 116, p. 223–246.
292. Heiss C., Rodriguez-Mateos A., Kelm M. Central Role of eNOS in the Maintenance of Endothelial Homeostasis. În: Antioxidants & Redox Signaling, 2015, vol. 22, nr. 14, p. 1230 - 1242.
293. Fukuto J. M., Wink D. A. Nitric Oxide (NO): Formation and Biological Roles in Mammalian Systems. În: Metal Ions in Biological Systems, 2018, vol. 36, .
294. Calzone L., Barillot E., Zinovyev A. Predicting genetic interactions from Boolean models of biological networks. În: Integr. Biol., 2015, vol. 7, p. 921-929.
295. The problem with neoantigen prediction. În: Nature Biotechnology, 2017, nr. 2, vol 35., p. 97.
296. Hörster I., Weigt-Usinger K., Carmann C., ș.a. The l-arginine/NO pathway and homoarginine are altered in Duchenne muscular dystrophy and improved by glucocorticoids. În: Amino Acids, 2015, vol. 47, nr. 9, p. 1853–1863
297. Sacara V., Groppa S., Duca M. Scientific justification the tactics of individual pharmacological correction in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. În: Eur. J. Hum. Genet., 2015, vol. 23, p. 457.
298. www.dmd.nl (vizitat 4.01.2019)
299. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02123186?cond=Spinal+Muscular+Atrophy&rank=4> (vizitat 16.02.2018)
300. <https://ghr.nlm.nih.gov/> (vizitat 9.01.2018)
301. <http://www.quantitativeskills.com/sisa/> (vizitat în anul 2018)
302. <https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software/> (vizitat în anul 2018)

303. <http://www.datuapstrade.lv/rus/> (vizitat în anul 2018)
304. <http://www.multifactordimensionalityreduction.org/> (vizitat în anul 2018)
305. <https://www.cureduchenne.org/cure/research-overview/> (vizitat în anul 2018)
306. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03179631> (vizitat 9.01.2018)

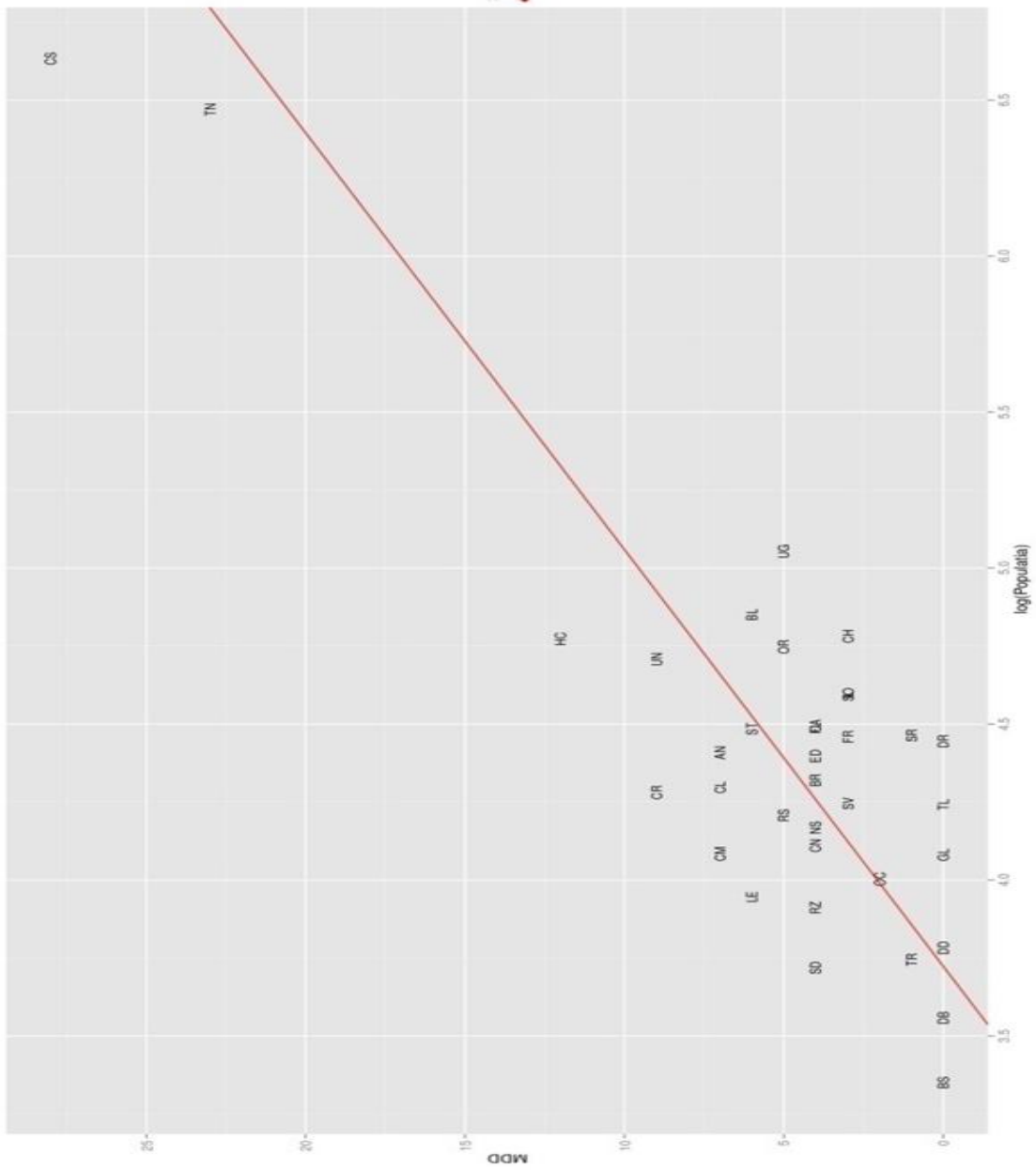
ANEXE

Anexa1. Structura patologiilor BESN în Republica Moldova

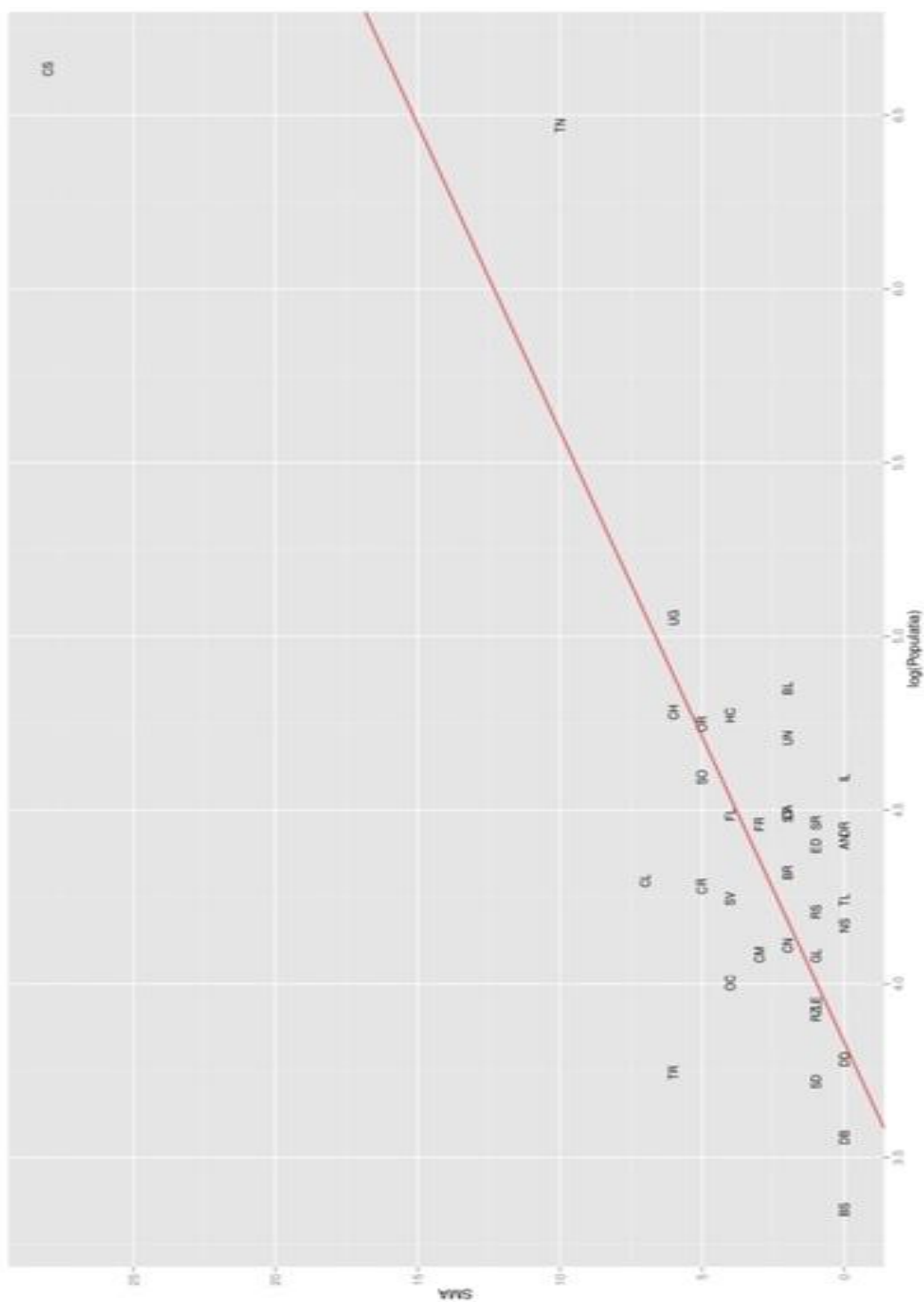


Legendă. 1. Neurofibromotos, AD; 2. Paraplegie spastică Strumpel, AD; 3. Distrofie miotonică, AD; 4. Amiotrofie spinală, AR; 5. Distonie de torsiune, AD; 6. Miastenie sporadică; 7. Ataxie Friedreich, AR; 8. Miodistrofie Landouzy-Dejerine, AD, AR; 9. Ataxie spinocerebelară (SCA), AD, AR; 10. Miopatii congenitale structurale, AD, AR, X-linkat; 11. Leicodistrofii, AD, AR, X-linkat; 12. Boli metabolice cu dereglarea sistemului nervos; 13. Boli mitocondriale; 14. Maladia Wilson, AR; 15. Fenilcetonurie, AR; 16. Miopatia centurilor, AR; 17. Anomalii ale sistemului nervos, patologii cromozomiale; 18. Miodistrofie Duchenne/Becker, X-linkat; 19. Neuropatie senzorial-motorie ereditară (NSME).

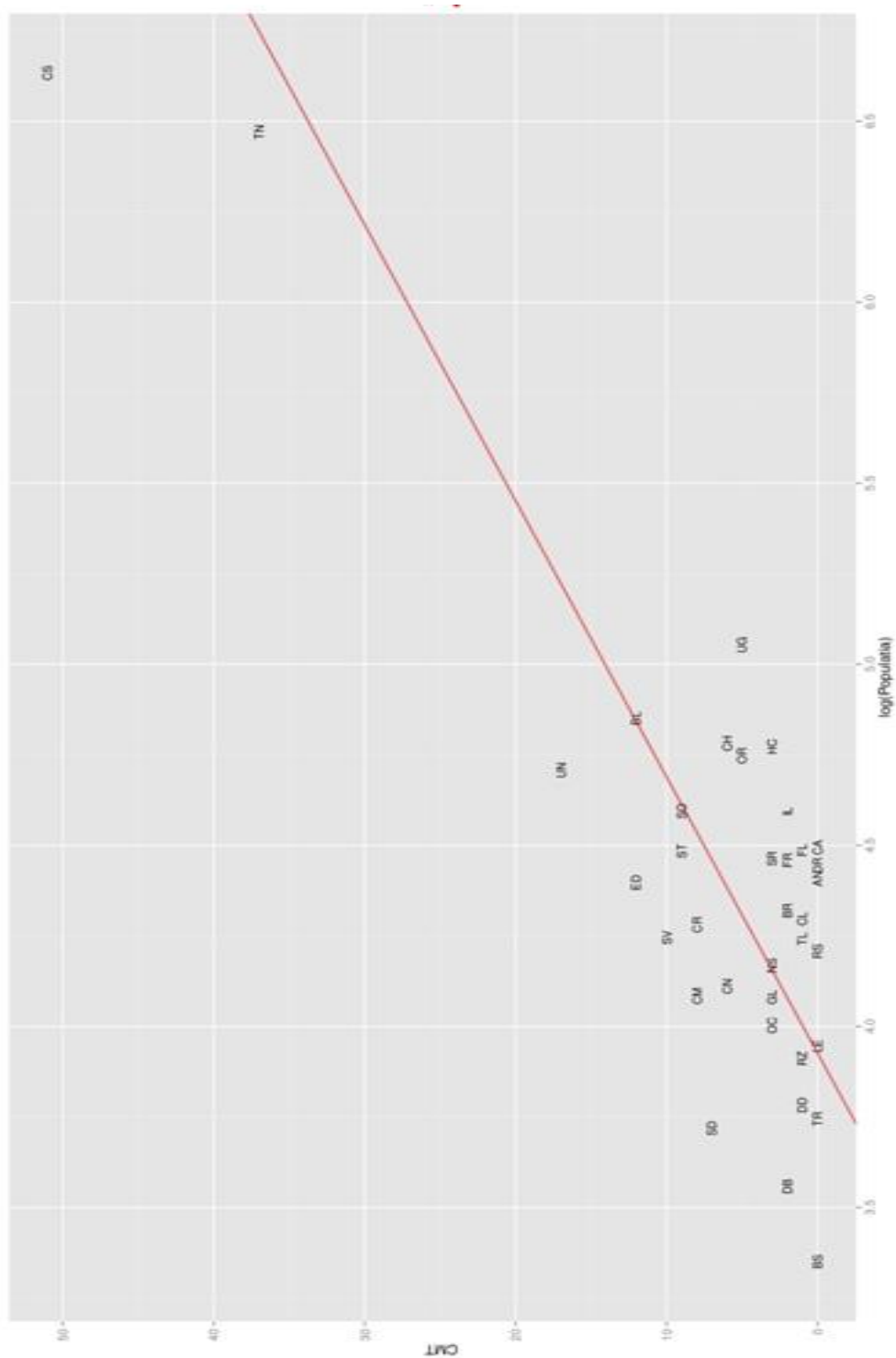
Anexa 2. Distribuția incidenței DMD în diferite raioane din Republica Moldova.



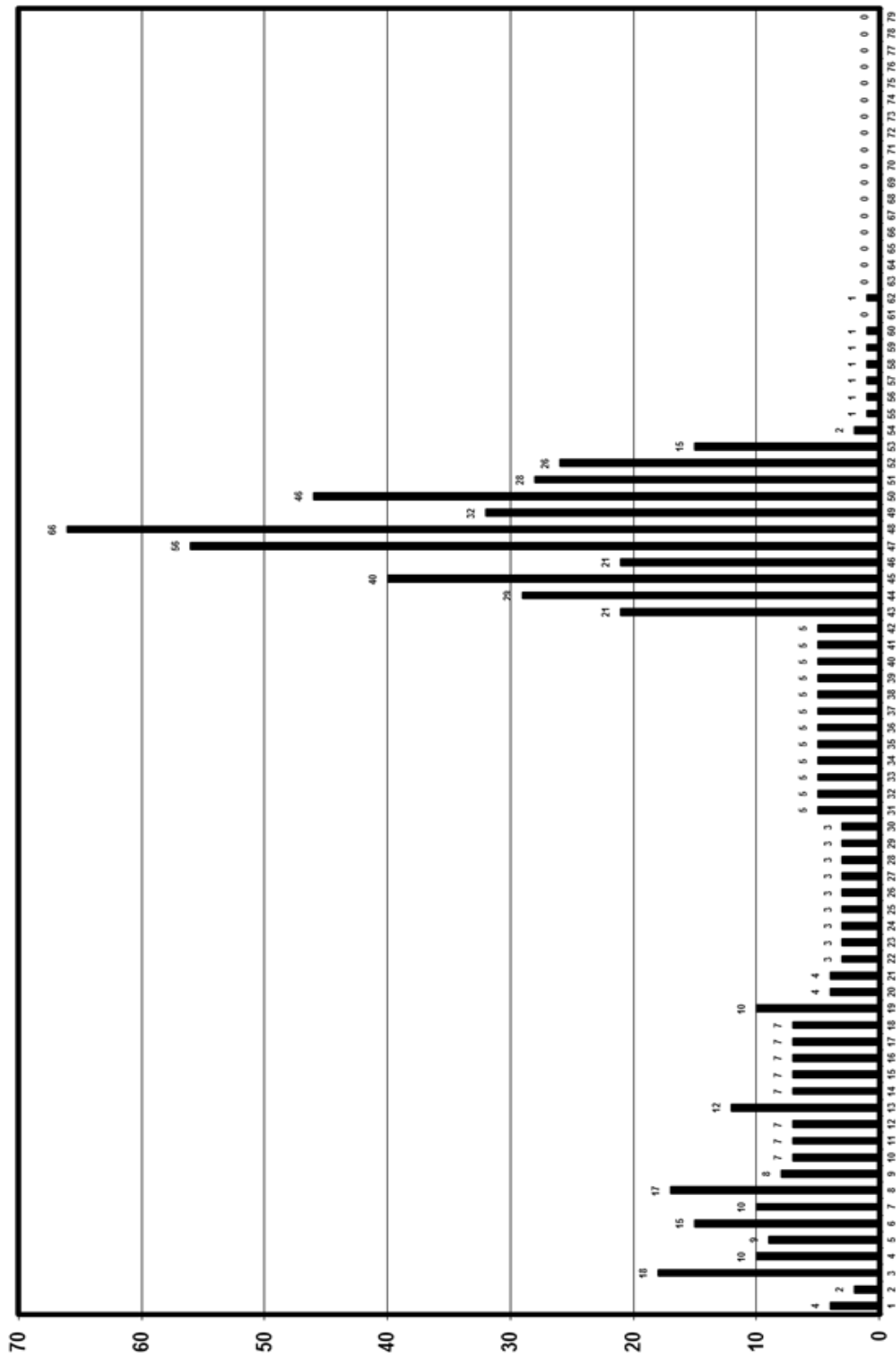
Anexa 3. Distribuția incidenței SMA în diferite raioane din Moldova (schemă proprie)



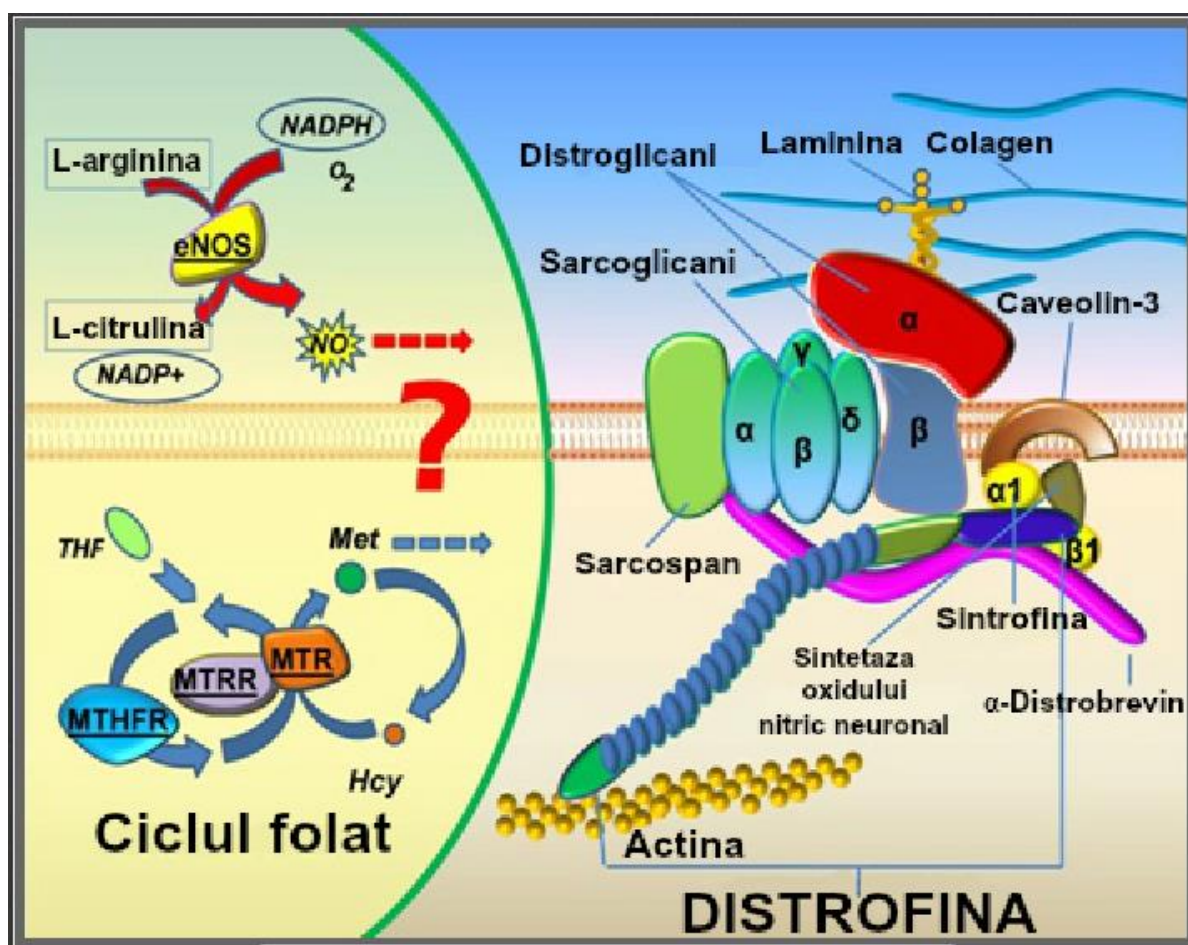
Anexa 4. Distribuția incidenței CMT în diferite raioane din RM (schemă proprie)



Anexa 5. Frecvența fiecărui exon din gena disrofinei implicat în procesul de deleție la pacienții cu DMD/BMD investigați (schemă proprie)



Anexa 6. Schema complexului de proteine asociate distrofinei (DPC) în mușchii scheletici și ciclul folat
(modificarea figurei după Rybakova Inna ș.a., 1996)



Legendă. (eNOS – sintaza endotelială a oxidului nitric; NO – oxid nitric; THF –tetrahidrofolat; Met – metionină, Hcy – homocisteină; MTR – metionin-sintază; MTRR – metionin-sintază-reductază)

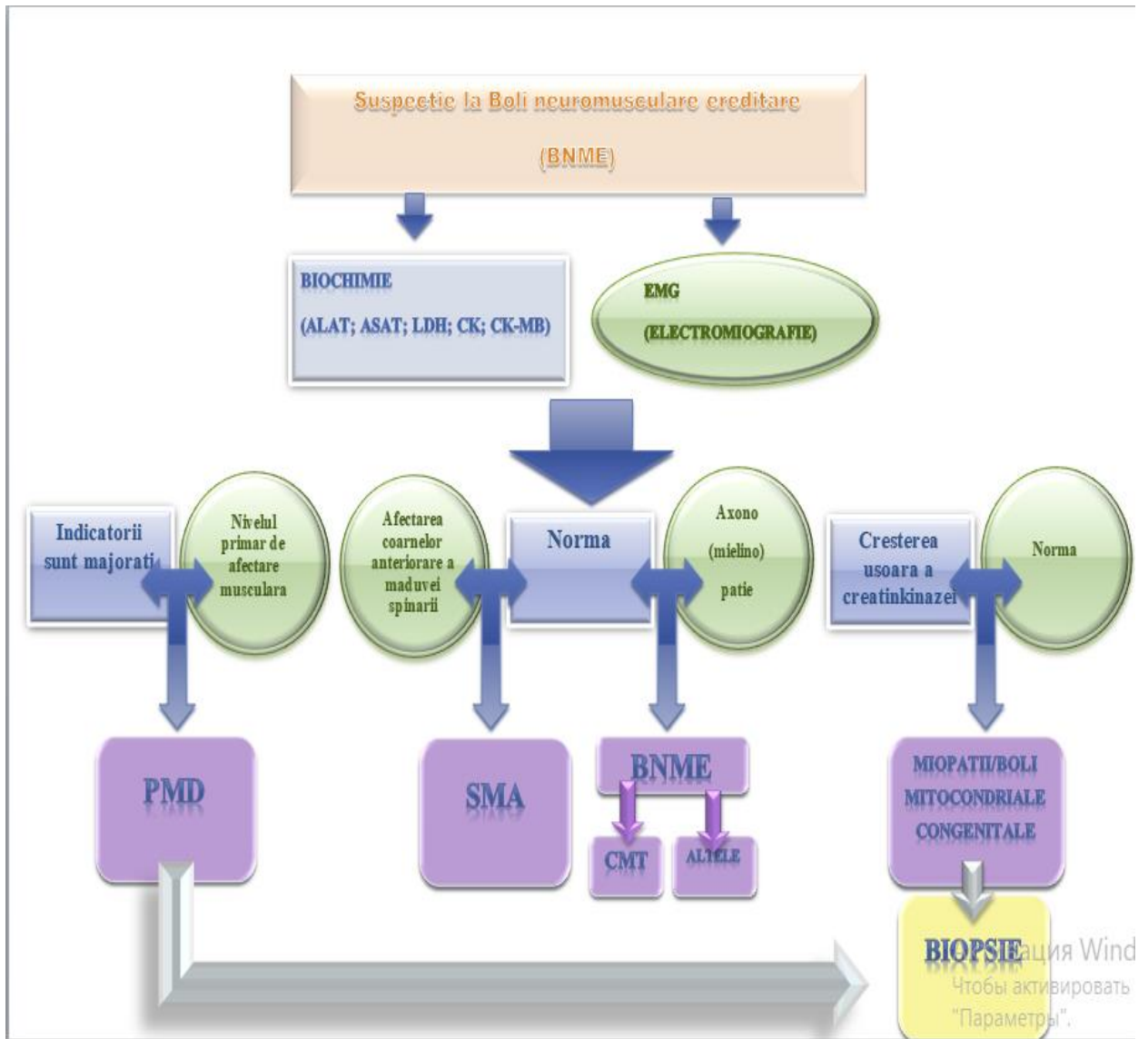
Anexa 7. Analiza de durată a delețiilor din gena *DMD*.

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	DEL EX 52-53	c.7543-?_7872+?del	
3 exoni (n=23)	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	DEL EX 50-52	c.7201-?_7660+?del
1	DEL EX 51-53	c.7310-?_7542+?del	
4 exoni (n=12)	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
	4	DEL EX 45-48	c.6439-?_7098+?del
5 exoni (n=6)	1	DEL EX 45-49	c.6439-?_7200+?del
	3	DEL EX 47-51	c.6763-?_7542+?del
	2	DEL EX 48-52	c.6913-?_7660+?del
6 exoni (n=11)	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
	1	DEL EX 48-53	c.6913-?_7872+?del
7 exoni (n=4)	1**	DEL EX 13-19**	c.1483-?_2380+?del**
	2	DEL EX 45-51	c.6439-?_7542+?del
	1	DEL EX 03-09	c.94-?_960+?del
9 exoni (n=1) *	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**
Deletie Dublă (n=16)**			
2 exoni (n=8)	1	DEL EX 44& DEL EX 53	c.6291-?_6438+?del& c.7661-?_7872+?del
	2	DEL EX45 & DEL EX48	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+?del
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 EX45	c.94-?_831+?del &ex45del -> 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

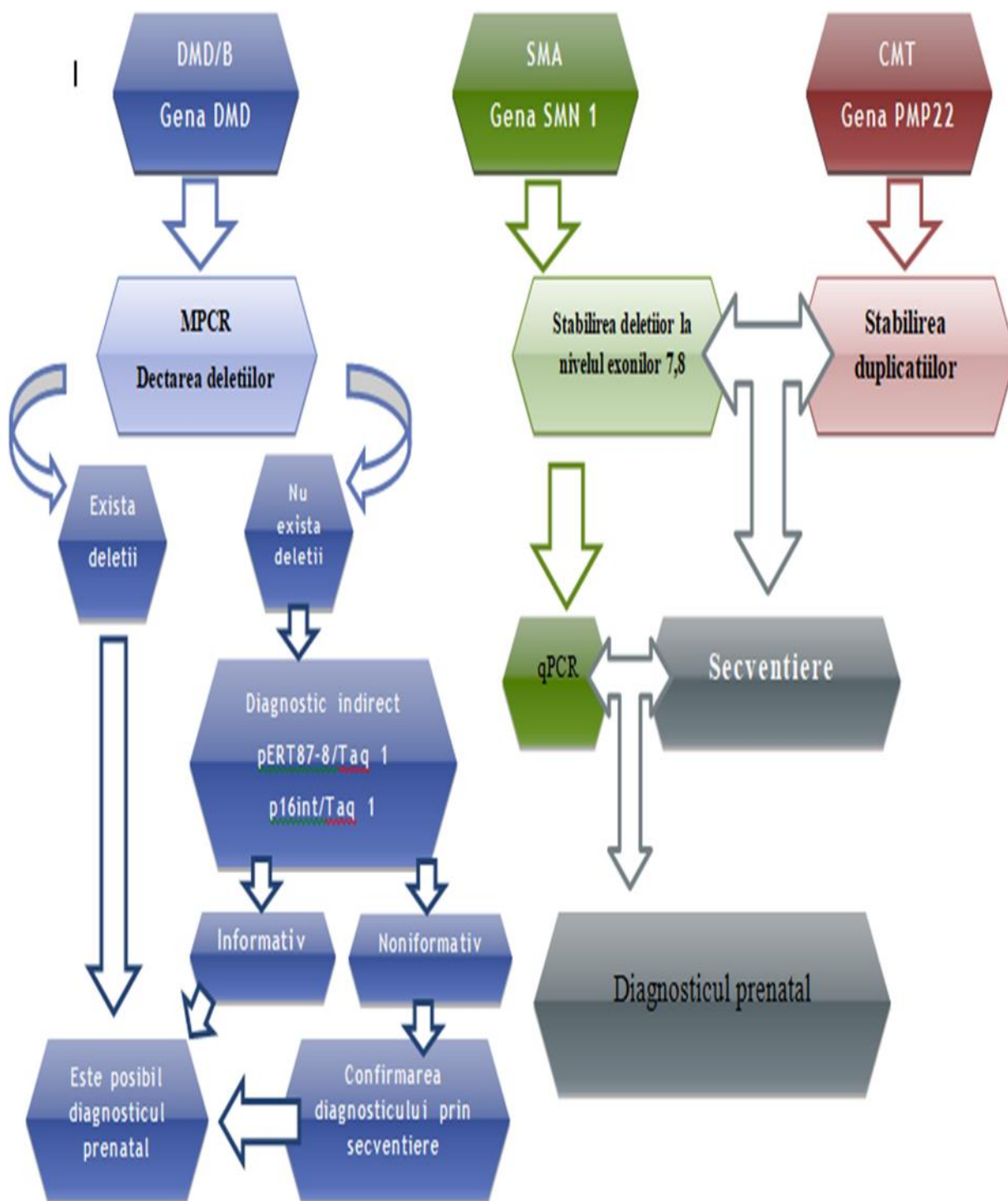
Anexa 8. Distribuția frecvenței genotipurilor și alelelor genelor-candidate
(în baza pacienților din studiu)

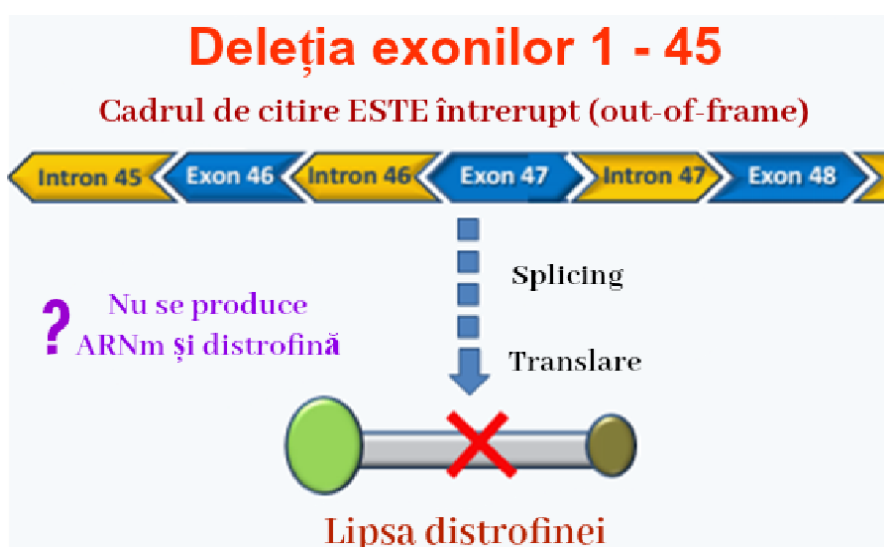
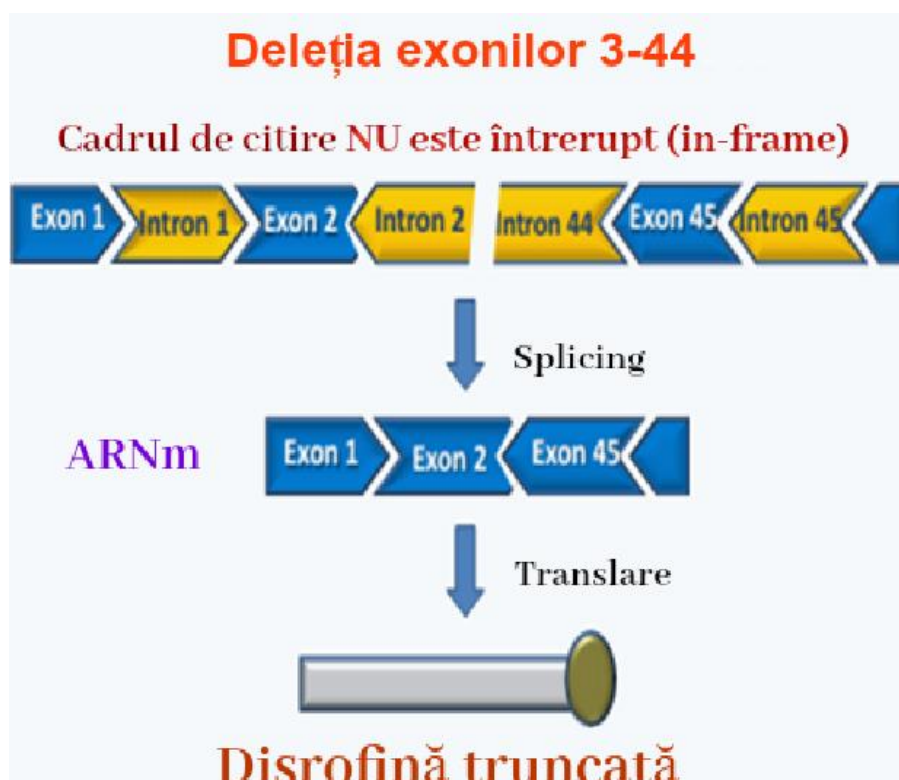
Locusuri, genotipuri și alele	Grupul bolnavilor n, (%)	Frec- vența după EHW	Grupul de control, n, (%)	Frec- vența după EHW	Rata șanselor (OR)	95% interval de confidența (95%CI)	χ^2	p
<i>MTFHRC677T</i>	165		165					
CC	70 (42,4)	0,41	82 (49,7)	0,47	1,00	Ref		
CT	72 (43,6)	0,46	62 (37,6)	0,43	1,36	0,85-2,17	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

Notă. * – valori cu $p < 0,05$.



Anexa 10. Schema diagnosticului molecular-genetic (în baza studiului propriu)





Anexa 12. Date predictive pentru calcularea riscului de invalidizare în funcție de factorul genetic prezent la pacient

eNOS	MTR	MTRR	MTHFR1298	MTHFR677	Diagnoză	Tipul deleției în gena DMD	Scaun cu rotile	Procentajul predicției											
0	0	1	1	2	1	0	0	72.0 %											
							1	28.0 %											
	0	2	1	1	2	1	0	0	78.7 %										
								1	21.3 %										
	1	1	1	1	1	1	0	0	65.5 %										
												1	34.5 %						
												0	77.2 %						
			2	0	1	1	0	0	1	0	22.8 %								
												1	56.4 %						
												1	43.6 %						
		2	2	1	1	1	1	0	0	69.1 %									
													1	30.9 %					
													0	72.7 %					
		2	1	1	2	0	1	1	0	27.3 %									
													1	66.8 %					
													1	33.2 %					
	2		2	0	1	1	0	0	0	65.0 %									
													1	35.0 %					
													0	71.4 %					
	2	1	1	0	1	1	1	0	28.6 %										
												1	71.1 %						
			2	1	0	1	1	1	0	28.9 %									
													1	47.9 %					
		2	2	1	1	0	1	0	0	52.1 %									
												1	48.1 %						
2			2	1	1	0	0	0	0	51.9 %									
													1	47.7 %					
2		1	2	2	1	0	0	0	52.3 %										
												1	59.4 %						
1	0	1	2	0	1	1	0	79.2 %											
							1	20.8 %											
	0	2	1	1	1	1	2	0	77.1 %										
								1	22.9 %										
	1	1	1	0	2	1	1	0	85.6 %										
													1	14.4 %					
								1	0	1	1	1	0	80.4 %					
																		1	19.6 %
																		0	69.4 %
								1	1	1	1	1	0	30.6 %					
													1	80.2 %					
													1	19.8 %					
			2	1	2	0	1	1	1	0	79.9 %								
															1	20.1 %			
				2	0	1	2	1	2	0	53.7 %								
															1	46.3 %			
		2	1	1	1	1	0	2	0	51.5 %									
														1	48.5 %				
		2	1	1	1	1	1	2	0	71.0 %									
														1	29.0 %				

				2	1	0	0	76.3 %	
							1	23.7 %	
						2	0	70.7 %	
				2		0	1	0	69.0 %
								1	31.0 %
			2					0	62.1 %
				2		1	1	2	37.9 %
								0	68.3 %
			2					0	31.7 %
		2	0	2	1	1	1	57.9 %	
							1	42.1 %	
							0	64.8 %	
			1	0	1	1	2	35.2 %	
							0	70.8 %	
							1	29.2 %	
			1	1	0	0	2	53.9 %	
							1	46.1 %	
							0	53.5 %	
	1	1	1	0	2	46.5 %			
					1	74.6 %			
					1	25.4 %			
	1	2	1	1	0	61.9 %			
					1	38.1 %			
					0	74.3 %			
	2	2	0	1	1	25.7 %			
					0	45.8 %			
					1	54.2 %			
	2	2	1	1	1	66.4 %			
					1	33.6 %			
					2	45.4 %			
	2	1	2	1	1	54.6 %			
					0	66.0 %			
					1	34.0 %			
1	2	2	1	2	1	1	0	86.3 %	
							1	13.7 %	
			0	1	1	1	1	0	86.1 %
								1	13.9 %
			1	2	1	1	0	0	70.0 %
								1	30.0 %
		2	1	0	1	1	0	80.6 %	
							1	19.4 %	
		2	1	0	1	1	0	61.2 %	
							1	38.8 %	
		2	2	1	1	1	0	73.9 %	
							1	26.1 %	
2	2	1	1	1	0	73.6 %			
					1	26.4 %			
1	0	1	0	2	0	0	0	87.8 %	
							1	12.2 %	
			1	2	1	0	0	0	78.7 %
								1	21.3 %
			2	1	1	1	1	0	81.7 %
								1	19.3 %
2	2	1	1	1	0	81.5 %			
					1	18.5 %			

	1	1	1	1	1	0	0	73.1 %			
							1	26.9 %			
				2	0	1	0	72.7 %			
						1	1	27.3 %			
				1	1	2	0	65.1 %			
			1			1	34.9 %				
			1			1	82.7 %				
			2	1	2	0	1	1	0	76.7 %	
						1	1	1	1	23.3 %	
						1	1	0	0	64.6 %	
	1	1						35.4 %			
	2	1				1	0	76.5 %			
			2	1	23.5 %						
	2	1	2	1	1	1	2	0	57.8 %		
							1	1	42.2 %		
							2	1	0	0	64.2 %
									1	1	35.8 %
							2	1	2	1	0
				1	1	23.8 %					
				1	0	1				0	79.5 %
1						1				20.5 %	
2				1	0	0				79.6 %	
					1	1	20.4 %				
2	2	0	1	2	1	1	0	87.4 %			
						1	1	12.6 %			
						2	0	0	0	66.6 %	
								1	1	33.4 %	
						1	2	1	1	0	77.4 %
			1	1	22.6 %						
			2	1	0				0	82.1 %	
					1				1	17.9 %	
			2	2	1				0	2	1
						1	1	42.5 %			
2	0	2				0	50.4 %				
		1				1	49.6 %				
1	2	1				2	0	41.3 %			
						1	1	58.7 %			
						0	2	0	0	74.3 %	
								1	1	25.7 %	
						1	2	1	0	83.8 %	
2	1	16.2 %									
2	2	1	0	2	1	2	0	68.5 %			
						1	1	31.5 %			
						1	0	0	0	66.7 %	
								1	1	33.3 %	
						1	2	1	1	0	77.8 %
			1	1	22.2 %						
			2	0	0				0	71.8 %	
					1				1	28.2 %	
			1	2	1				0	65.9 %	
					2	1	34.1 %				
						0	0	57.5 %			
						1	1	42.5 %			
						0	0	66.0 %			
						1	1	34.0 %			
						1	0	77.6 %			

							1	22.4 %		
2	2	1	1	2	1	2	0	59.3 %		
							1	40.7 %		
			0	0	1	0	2	0	48.4 %	
								1	51.6 %	
								0	57.4 %	
								1	42.6 %	
				1	1	1	0	1	0	70.5 %
									1	29.5 %
									0	57.0 %
									1	43.0 %
			2	1	1	1	1	0	70.2 %	
								1	29.8 %	
								2	49.8 %	
								1	50.2 %	
				2	0	0	0	0	0	63.0 %
									1	37.0 %
		0							56.6 %	
		1							43.4 %	
		1	1	1	1	1	0	69.9 %		
							1	30.1 %		
							2	49.5 %		
							1	50.5 %		
			0	1	1	1	1	0	88.2 %	
								1	11.8 %	
				2	1	0	0	0	0	80.6 %
									1	19.4 %
		1		1	0	0	0	0	78.7 %	
								1	21.3 %	
				2	0	0	0	1	0	78.5 %
									1	21.5 %
		2	1	1	1	1	0	83.2 %		
							1	16.8 %		
0	0		0	0	0	0	71.6 %			
						1	28.4 %			
1	1		1	1	1	0	77.5 %			
						1	22.5 %			
	0		0	0	0	1	0	71.3 %		
							1	28.7 %		
1	0	0	0	0	0	65.5 %				
					1	34.5 %				
	1	1	1	1	0	0	77.2 %			
						1	22.8 %			
2	2	1	1	2	2	0	59.3 %			
						1	40.7 %			
			0	0	1	0	2	0	48.4 %	
								1	51.6 %	
								0	57.4 %	
								1	42.6 %	
				1	1	1	0	1	0	70.5 %
									1	29.5 %
		0							57.0 %	
		1							43.0 %	
		2	1	1	1	1	0	70.2 %		
							1	29.8 %		
							2	49.8 %		
							1	50.2 %		
			2	0	0	0	0	0	63.0 %	

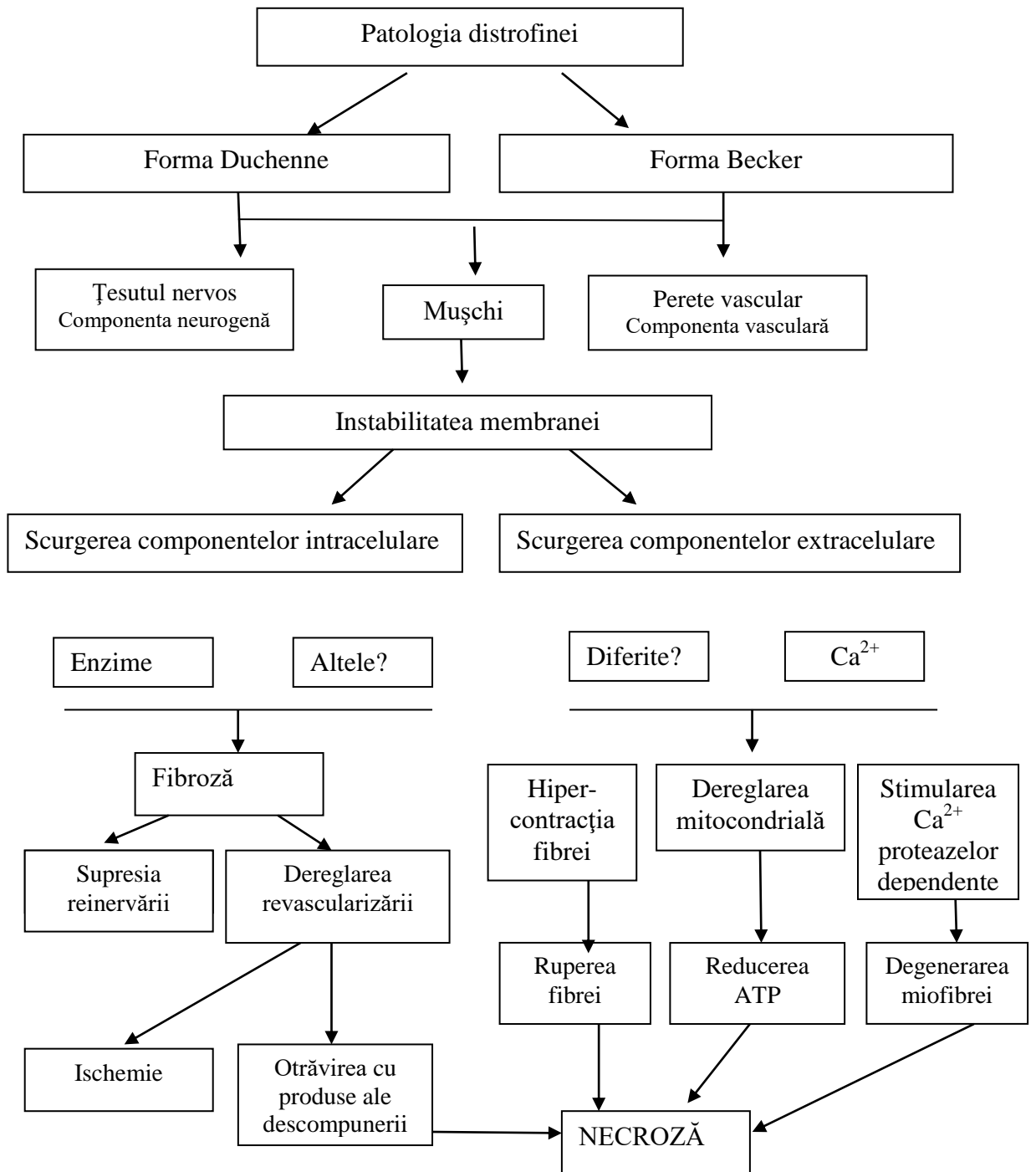
							1	37.0 %	
						0	0	56.6 %	
					1		1	43.4 %	
					1	1	0	69.9 %	
							1	30.1 %	
						2	0	49.5 %	
							1	50.5 %	
		2	0	1	1	1	0	88.2 %	
				1	1	1	1	11.8 %	
				2	1	0	0	80.6 %	
							1	19.4 %	
			1	1	1	0	0	0	78.7 %
									1
					2	0	0	0	78.5 %
									1
					1	1	0	83.2 %	
							1	16.8 %	
			2	0	0	0	0	0	71.6 %
									1
					1	1	0	77.5 %	
							1	22.5 %	
				1	0	0	0	71.3 %	
								1	28.7 %
				1	0	0	0	65.5 %	
						1	34.5 %		
						1	0	77.2 %	

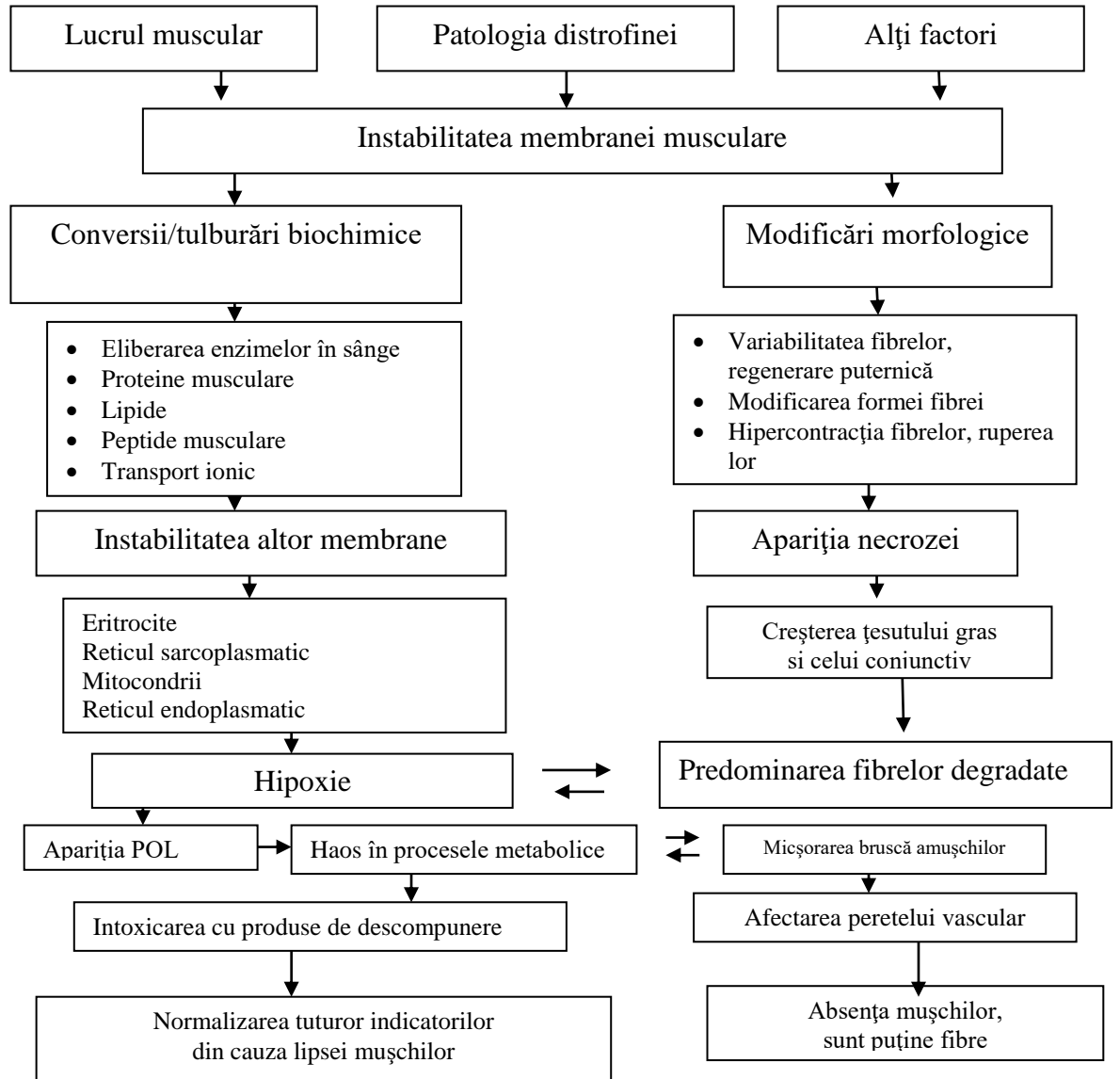
Legendă. Scaun cu rotile: 0 – plasarea în scaunul cu rotile până la vârsta de 9 ani, 1 – merg de sine stătător la vârsta de 9 ani;

Tipul deleției în gena *DMD*: 0 – in-frame, 1 – out-of-frame, 2- nu depistat;

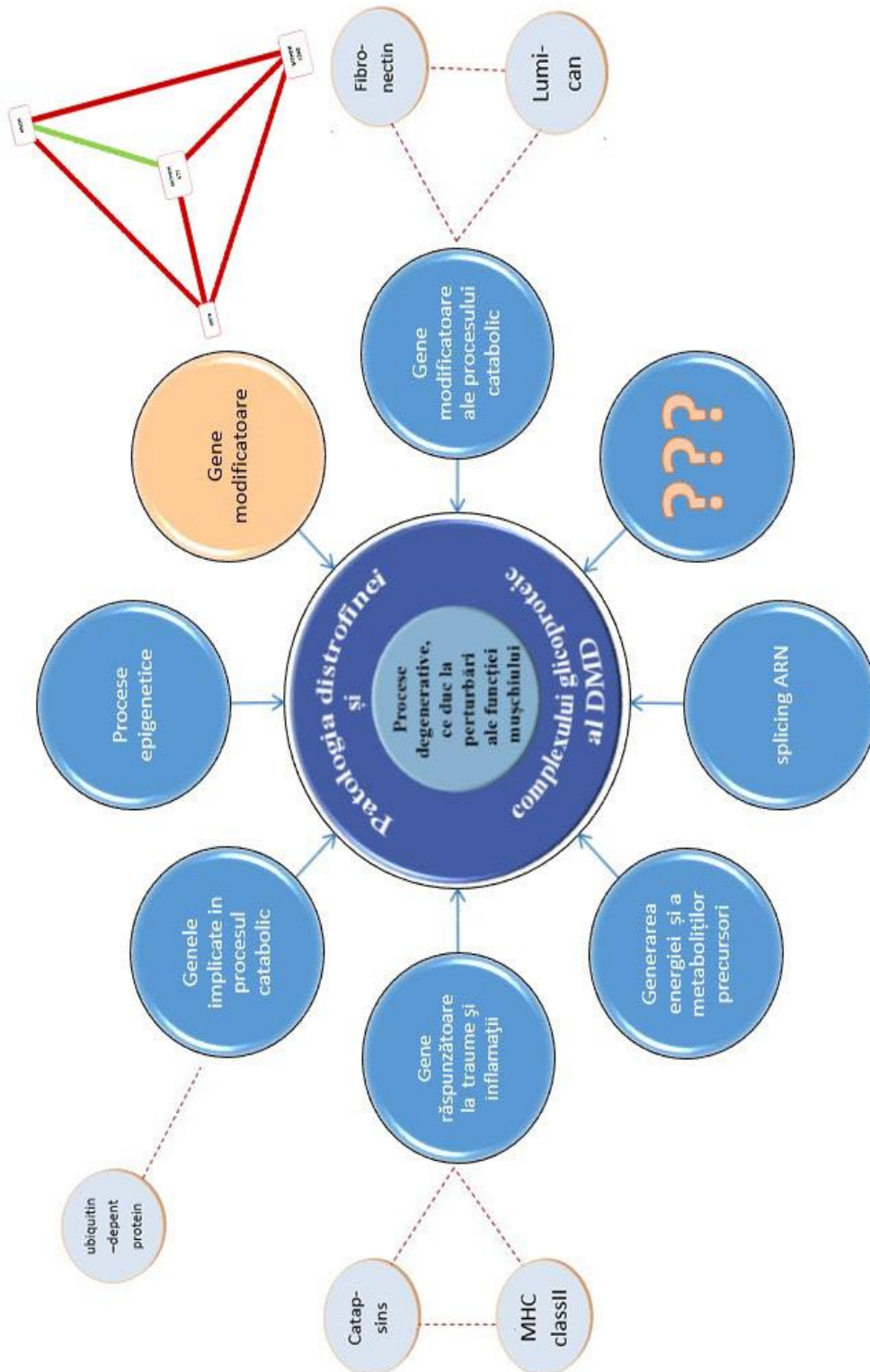
Diagnoză: 0 – DMB, 1 – DMD;

Genele modificatoare studiate „eNOS”, „MTR”, „MTRR”, „MTHFR1298”, „MTHFR677”: 0 – homozigot după alela mutantă, 1 – heterozigot, 2 – homozigot după alela normală (wild-type).

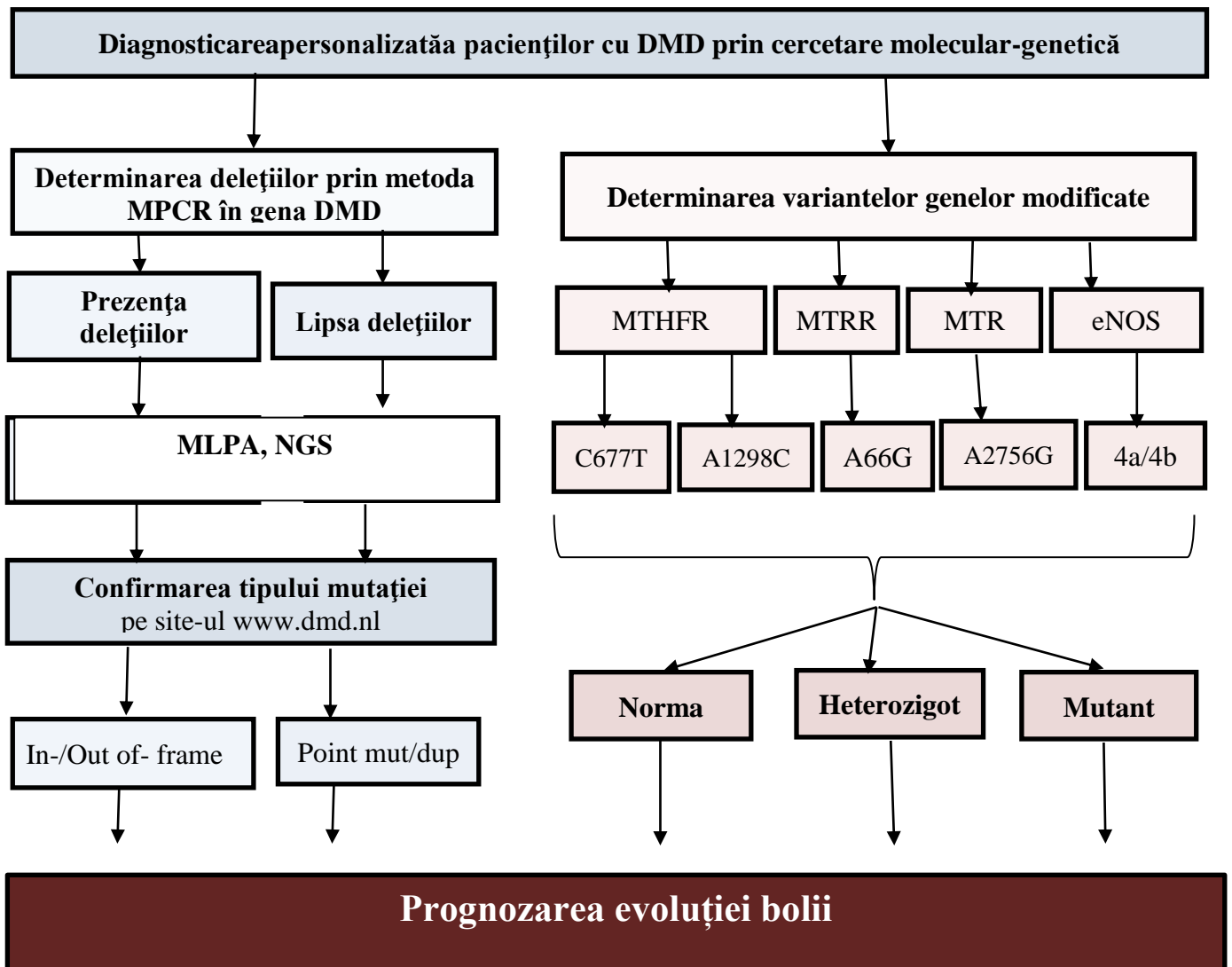




Anexa 15. Schema patogenezei a DMD cu implicarea genelor modificatoare (V. Sacară)



Anexa 16. Strategia de diagnostic molecular pentru personalizare (schemă proprie).



Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teză sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Sacară Victoria



Semnătura

CV Al autorului

INFORMAȚII PERSONALE



Victoria Sacară

bd. Dacia 21, ap.144, MD-2038 Chișinău (Republica Moldova)

(+373) 69154495

victoriasacara@hotmail.com

mama-copilul.md

EXPERIENȚA PROFESIONALĂ

-
- 01/09/2009–Prezent **Lector a cursului „Genetică Umană”**
Universitatea Academiei de Științe a RM, Chișinău
- 01/11/2013–Prezent **Șef de laborator. Lab. Genetică Moleculară Umană**
IMSP Institutul Mamei și Copilului, Chișinău (Republica Moldova)
- 2016–2018 **Conducător proiect**
Programului de cooperare științifică și tehnologică., Chișinău (Republica Moldova)
Conducător proiect pentru perioada 2016-2018: «**Creșterea capacității de cercetare genetică și genomică în dezvoltarea perinatală și a copilului**».
- 2015–2016 **Conducător proiect**
AȘM, IMSP IM și C, CSRGM, Chișinău (Republica Moldova)
„**Stimularea dezvoltării tehnologiilor inovatoare în cercetarea Geneticii Umane și promovarea participării active în proiecte prin conectarea la Infrastructura Cercetării Europene**»,
- 2010 **Conducător proiect**
BMBF-AMS: «**Functional studies of copper transporter ATP7B in hepatocytes and brain for targeted therapy of Wilson's disease**»
- 2010 **Participant în proiectul:**
BMBF-AMS proiect «**Analysis of genetic factors influencing asthma in Moldavia and Germany**» (project manager- prof. M. Kabecsh)
- 2009–2012 **Șef Laborator Genetică Moleculară Umană, ,**
Centrul Național de Sanatate a Reproducerii și Genetică Medicală,
Chișinău (Republica Moldova)
- 2003–2008 **Șef de secție științifică de reproducere umană, genetică medicală cu investigații molecular-genetice și imunochimice**
Centrul Național de Sănătate a Reproducerii și Genetica Medicală., Chișinău (Moldova)
- 2001–2009 **Asistent universitar la cursul de “Genetica Medicală”**
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “N. Testemițanu”,

Chişinău (Republica Moldova)

- 2002–2003 **Şef de secție Genetică Medicală Centrul Republican de Reproducere Umană, Genetică Medicală și Planificare Familială**
Institutul de Cercetări Științifice în Domeniul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului (ICȘDOSMșiC), Chişinău (Republica Moldova)
- 2002 **Cercetător științific superior**
Secția Științifică de Genetică Medicală a ICȘDOSMșiC, Chişinău (Republica Moldova)
- 2001 **Cercetător științific**
Secția Științifică de Genetică Medicală a ICȘDOSMșiC, Chişinău (Republica Moldova)
- 1992–2002 **Cercetător științific inferior**
Secția Științifică de Genetică Medicală a ICȘDOSMșiC, Chişinău (Republica Moldova)

EDUCAȚIE ȘI FORMARE

- 2016 **Clinical and biochemical training in inborn errors of metabolism.**
Radboudumc, Translational Metabolic Laboratory, Nijmegen (The Netherlands)
- 2015 **Neurotransmitter focus course.**
Orphan Europe Academy RRDF, San Servolo , Venetia (Italia)
- 2015 **Hand on qPCR, -3 days; Methods and applications for microRNA analysis; Genotyping with qPCR.**
TATTA Biocentru, Gotteborg (Suedia)
- 09/04/2015–10/04/2015 **Training ”Stem cells therapy”**
TÜBA- Course of Quality Standards of Cellular Therapy Products in Current Good Manufacturing Practices (cGMP), Antalia (Turcia)
- 28/05/2012–30/05/2012 **The 1st Advanced Meeting on metabolic and genetic disorders affecting the liver.**
Orphan Europe Academy, Roma (Italia)
- 2011–2012 **DAAD-study visits of foreign academic personnel to the Federal Republic of Germany, ‘Evaluation of Moldavan mutants of ATP7B gene by chip-based analysis’.**
Westfälische Wilhelmas-Universitat Munster, Munster (Germania)
- 24/01/2011–23/04/2011 **Standard cell culture of mammalian cells.**
Klinik und Poliklinik für Transplantationsmedizin, (Prof. Dr. med. Hartmut H.-J. Schmidt), Munster,, Munster (Germania)

- 2009–2011 **Stagiu de postdoctorat în domeniul Geneticii Umane**
Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM, Chișinău (Republica Moldova)
- 2006 **DNA diagnostics training in Research Centre for Medical Genetics**
Laboratorul de Genetică Moleculară Umană, (prof. Poleacov), Moscova (Rusia)
- 2005 **DNA diagnostics training in Research Centre for Medical Genetics**
Laboratorul de Genetică Moleculară (prof. A. Poleacov), Moscova (Rusia)
- 2003 **Titlul științific: Conferențiar- cercetător.**
Comisia Superioară de Atestare, Chișinău (Republica Moldova)
- 2003 **DNA diagnostics training in Research Centre for Medical Genetics**
Laboratorul de Genetică Moleculară Umană,(prof. Poleacov), Moscova (Rusia)
- 2001 **DNA diagnostics training in Research Centre for Medical Genetics**
Laboratorul de Genetică Moleculară Umană (prof. Poleacov), Moscova (Rusia)
- 22/02/2001 **Grad științific: Doctor în Științe Medicale, seria DR nr.:1186**
Comisia Superioară de Atestare, Chișinău (Republica Moldova)
- 1994 **Specializarea primară Genetică Medicală**
Academia de Perfecționare a Cadrelor Medicale, St. Petersburg (Rusia)
- 1994 **Specializare în genetică moleculară umană. Laborator de diagnostic prenatal.**
Ott's Institute of Obstetrics and Gynecology,
Sankt Petersburg (Rusia)
- 1992–1993 **Specializarea Primară Neurologie**
Universitatea de Stat de Medicina si Farmacie “Nicolae Testemițeanu”,
Chișinău (Republica Moldova)
- 1985–1991 **Pediatrie, Facultatea: Medicină Generală**
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”, Chișinău
(Republica Moldova)

COMPETENȚE PERSONALE

Limba(i) maternă(e) rusă

Alte limbi străine cunoscute

ÎNȚELEGERE		VORBIRE		SCRIERE
Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral	

engleză	C2	C2	C1	C1
română	C2	C2	C1	C1

Niveluri: A1 și A2: Utilizator elementar - B1 și B2: Utilizator independent - C1 și C2: Utilizator experimentat
[Cadru european comun de referință pentru limbi străine](#)

Competențe de comunicare -bune abilități de comunicare dobândite în urma experienței obținute ca lector universitar și șef de laborator.

Competențe organizaționale/manageriale - leadership;
 - organizare lucru în laborator de cercetare științifică;
 - organizarea forumurilor științifice;
 - bune abilități de scriere și coordonare a proiectelor de cercetare.

Competență digitală

AUTOEVALUARE				
Procesarea informației	Comunicare	Creare de conținut	Securitate	Rezolvarea de probleme
Utilizator experimentat	Utilizator experimentat	Utilizator experimentat	Utilizator experimentat	Utilizator experimentat

[Competențele digitale - Grilă de auto-evaluare](#)