DISTROFIILE MUSCULARE PROGRESIVE

d.h.s.m., profesor universitar
Stanislav Groppa
d.s.m., Eremei Zota
d.s.m., Victoria Sacară

CHIŞINAU 2005

DISTROFIILE MUSCULARE PROGRESIVE

d.h.s.m., profesor universitar
Stanislav Groppa
d.s.m., *Eremei Zota*
d.s.m., *Victoria Sacară*

CZU 616.74-007.23
G 87

Monografia "Distrofiile Musculare Progresive" este consacrată problemelor diagnosticării şi de profilaxie a unor forme mai frecvent întâlnite de patologii ereditare. Maladiile date sunt caracterizate printr-un grad diferit de dereglări motorii, debutează la o vârstă infantilă sau juvenilă, au o evoluţie stabil progresivă, rezultă în disabilitate severă şi au un nivel crescut de mortalitate. Toate acestea presupun că întrebările diagnosticării precoce şi profilaxiei au nu numai o importanţă medicală, dar şi social-economică. Totodată, deseori diagnosticarea bolilor date este foarte dificilă datorită polimorfismului clinic. Analiza clinico-genealogică cu apelarea la metodele moderne de diagnostic (biochimice, histopatologice, electrofiziologice) ca regulă permit diagnosticarea corectă a maladiei.

Ultimii ani s-au soldat cu un şir de descoperiri în domeniul geneticii medicale. Aceasta a permis cartarea genelor responsabile pentru apariţia patologiilor ereditare pe anumiţi cromozomi. Pe baza descoperirilor date au fost elaborate metodele directe şi indirecte de diagnostic molecular-genetic şi depistarea stării de purtător a genei patologice în stadiile preclinice şi prenatale. Implementarea metodelor de diagnostic molecular-genetic ridică nivelul consultului medico-genetic, ce este extrem de important pentru maladiile neurologice ereditare. Dezvoltarea geneticii moleculare în domeniul Neurologiei va permite elaborarea în viitorul apropiat a metodelor de tratament etiotrop a pacienţilor ce suferă de patologiile date.

Monografia "Distrofiile Musculare Progresive" editată de un colectiv de autori experimentaţi în domeniul Geneticii Medicale de la USMF „N. Testemiţanu" şi ICŞOSMşiC este actuală, şi indiscutabil prezintă un interes major pentru specialiştii Neurologi, Geneticieni, Pediatri, Medici de Familie, Fizioterapeuţi, Reabilitologi precum şi studenţilor la facultatea de Medicină şi Biologie. Pentru prima dată sunt descrise algoritmul de diagnosticare a distrofiilor musculare progresive, principiile şi etapele consultului medico-genetic, precum şi criteriile de diagnostic ale distrofiilor musculare progresive, utilizând cele mai moderne metode de diagnostic.

Descrierea CIP a Camerei Naţionale a Cărţii

Groppa, Stanislav
Distrofiile musculare progresive / Stanislav Groppa, Eremei Zota, Victoria Sacară. – Ch.: s.n., 2004. – 111 p.
Bibliogr. p. 95
ISBN 9975-78-361-9

616.74-007.23

ISBN 9975-78-361-9

DISTROFIILE MUSCULARE PROGRESIVE

Unele aspecte istorice şi cauzele polimorfismului clinic al maladiilor ereditare.

Deja primele lucrări apărute la sfârşitul sec. XVIII au permis, în baza investigaţiilor histologice ale muşchilor, de a diferenţia două tipuri de miopatii: tipul primar, muscular de afecţiune şi secundar, neurogen, condiţionat de distrofia motoneuronilor segmentari ai măduvei spinale şi 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 formele primare - musculare şi secundare – 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 şi secundare. Între ele există, totuşi, un şir de forme de tranziţie. În legătură cu aceasta, L.Badalean (1973) divizează DMP în 3 grupe: primare, secundare şi mixte.

Studierea DMP continuă de mai bine de un secol, însă ultimii 25 ani sunt pentru acest domeniu, ani de profunde investigaţii ce îmbină în sine un complex de cercetări de cele mai diverse niveluri (celular, molecular, submolecular etc.) efectuate la bolnavii de miopatie şi rudele fenotipic sănătoase ale acestora, precum şi pe animale cu DMP.

Esenţa uneia din cele mai vechi axiome medicale este că maladiile de diverse etiologii (infecţioase, traumatice, metabolice, hormonale etc.) se manifestă la diferiţi indivizi prin evoluţie strict particulară. De la caz la caz şi din cauzele ce trebuie elucidate şi incluse profitabil în raţionamentul clinic, tabloul clinic se face exprimat prin variaţii de la semne monosimptomatice până la forme cu un tablou extrem de desfăşurat polimorf şi sever. Decurgerea tabloului clinic este în strictă dependenţă de caracterele agenţilor etiologici (virulenţa germenilor infecţioşi, brutalitatea impactului vulnerant, etc.), starea generală a organismului (statusul imun, metabolismul), factorii exogeni. Un rol deosebit în conturarea particularităţilor de evoluţie a maladiilor revine factorilor ereditari.

Referitor la maladiile ereditare ipotetic se poate de presupus că tabloul clinic în cadrul unei entităţi nosologice va decurge după un patern stereotip, deoarece factorul etiologic e unic (mutaţia) şi procesul patologic sunt controlate de activitatea uneia sau câtorva gene. Însă practica clinică relevă un polimorfism larg în cadrul maladiilor ereditare, ce se manifestă prin vârsta şi simptomatologia diferită a debutului, gradul divers al severităţii tabloului clinic, particularităţile de evoluţie şi de handicap.

Problema polimorfismului clinic la diferite etape cronologice a atras atenția multor savanți. În rezultat au fost evidențiate interacțiunile şi rolul factorilor mediului ambiant, genotipului în general, caracterului genei mutante în expresia polimorfismul clinic. Este importantă şi descrierea fenomenelor de heterogenitate genetică (genocopii), ori, ea, diferă de esența conceptului polimorfism clinic.

Actualmente este acumulat un material imens, care permite explicarea fenomenului de polimorfism clinic în cadrul diverselor entități nosologice şi factorii ce îl determină. În prim rând, aceasta se referă la însemnătatea caracterului mutației asupra formării fenotipului. Mutațiile apărute de novo şi mutațiile ce au fost moştenite se manifestă clinic identic, deci, particularitățile manifestărilor clinice nici de cum nu depind de "vârsta mutației". Descifrarea corelațiilor genotip- fenotip a devenit posibilă datorită descifrării structurii genelor şi a mutațiilor, precum şi determinarea expresiei primare a genei. Dimensiunile şi localizarea deleției în marea majoritate a cazurilor nu corelează cu severitatea maladiei. Acest postulat poate fi ilustrat prin următorul exemplu. Mutația în acelaşi locus, răspunzător de sinteza distrofinei, condiționează în apariția a două forme clinice: distrofia musculară progresivă (DMP) Duchenne şi DMP Becker. Pentru a explica acest fenomen A. Monaco a propus ipoteza "conturului de citire". Conform acesteia delețiile şi duplicațiile la bolnavii cu DMP Becker nu afectează conturul translațional de citire. Astfel la ei se sintetizează două tipuri de proteina anormală - scurtată sau prea lungă. Dimpotrivă la pacienții cu DMP Duchenne deleția duce la deplasarea "conturul de citire" şi proteina sintetizată va fi instabilă sau nonfuncțională.

Tabloul clinic poate depinde şi de "doza genelor". De exemplu, starea de homozigot în maladiile transmise autozom dominat vor determina un tablou clinic mult mai sever. Maladiile autozom recesive se vor manifesta numai în stare de homozigot, deşi, unele semne ale maladiei pot exista şi la indivizii heterozigoți.

Polimorfismul clinic poate fi determinat nu numai de gena patologică, ci şi de genotipul în întregime (gene modificatoare). Genomul uman funcționează ca un sistem bine coordonat. Împreună cu gena patologică individul moşteneşte de la părinți şi combinația altor gene, care pot să amplifice sau să diminueze acțiunea genei patologice. Deşi polimorfismul interfamilial este mult mai evident de cât cel intrafamilial, ultimul nicidecum nu poate fi negat.

O altă trăsătură al polimorfismului clinic este vârsta diferită de debut. Pentru grupul de maladii ereditare vârsta inițierii manifestărilor clinice oscilează pe un cadran vast, din copilărie pentru unele şi vârsta avansată pentru altele.

Esența biologică a acestui fenomen constă în legitățile reglării în ontogeneză a expresiei genetice. Funcționarea fiecărei gene în stare

normală începe şi se termină într-un termen de timp strict determinat şi are expresie doar asupra grupului celular, pentru care are competenţă. Din această cauză efectele genei mutante încep a se manifesta numai în perioada de timp când gena dată este activă

Cauzele de debut al aceleiaşi maladii în diferite perioade de vârstă pot fi explicate şi prin prezenţa trăsăturilor specifice ale genomului individului dat. Interacţiunea genelor poate schimba timpul de debut. Unele gene pot, precipita debutul, altele, din contra, îl pot tergiversa. O anumită influenţa asupra debutului maladiilor ereditare îl are şi mediul ambiant. De exemplu, unele distrofii musculare au tendinţa de a se dezvolta în rezultatul acţiunii stresurilor psihice, hipotermiei sau extenuării.

Un alt aspect al polimorfismului clinic rezidă în particularităţile de evoluţie şi în celeritatea ei. Pentru majoritatea patologiilor ereditare, paralel cu progresarea, procesului patologic, se constată şi o deteriorare în tabloul clinic. Cauza biologică al acestui fenomen este determinată de esenţa genei patologice şi rolul produsului genetic expresat în arealul metabolic interesat. Procesul iniţiat poate fi modificat de influenţa altelor sisteme patogenice. Severitatea maladiei depinde de rolul, importanţa şi gradul de prioritate al funcţiei determinate monogen.

Tabloul clinic al maladiei poate fi determinat de mutaţii în diferiţi loci, sau de diferite mutaţii în acelaşi locus. Fenomenul dat poartă denumirea de heterogenitate genetică şi pentru prima dată a fost introdus de savantul S. Davidencov. V. McKusick a formulat principiile de bază ale studiului maladiilor legate de heterogenitatea lor genetică. Implementarea metodelor noi de analiză genetică a permis obţinerea unei informaţii mai ample despre heterogenitatea clinică a maladiilor. Cunoaşterea localizării şi structurii genei precum şi a esenţei mutaţiilor permite identificarea formelor nosologice ale maladiilor.

Situaţiile, în care diferite gene patologice condiţionează manifestări clinice relativ similare se explică prin faptul că un proces patologic poate fi determinat de perturbările sintezei unor proteine diferit sau a unor varianta aceleiaşi proteine.

Concepţia heterogenităţii genetice a maladiilor ereditare deschide perspective noi în înţelegerea esenţei unor maladii şi a cauzelor polimorfismului clinic. Drept exemplu poate servi DMP de centură (tab. 1). În cazurile date heterogenitatea genetică se determină printr-o analiză genealogică simplă (fie variante cu transmitere autozom dominantă fie cu transmiterea autozom recesivă). Următoarea etapă cu utilizarea metodelor molecular-genetice permite de a determina esenţa polimorfismului prin localizarea genei.

Tabelul 1.

Maladiile neuromusculare: localizarea genei

Maladia	Modul de transmitere[a]	Localizarea genei[b]	Simbolul[c] (produsul genei)
Duchenne/Becker	XR	Xp21,1	DMP (=DYS) (*dystrophin)*
Emery-Dreifuss	XR	Xq28	EMD (*emerin*)
Facio-scapulo-	AD	4q35	FSHD
humerală	AD	?	FSHD-2
De centură,	AD	5q22-q34	LGMD-1A
dominantă	AD	1q11-21	LGMD-1B
	AD	3p25	LGMD-1C (=CAV3) (*caveolin 3*)
De centură,	AR	15q15,1-q21,1	LGMD-2A (=CAPN3)
recesivă	AR	2p13	(*calpain 3*)
	AR	13q12	LGMD-2B (*disferin*)
	AR	17q12-q21,33	LGMD-2C (γ-sarcoglycan)
	AR	4q12	LGMD-2D (*adhalyn=α sarcoglycan*)
	AR	5q33-q34	LGMD-2E (*β-sarcoglycan*)
	AR	17q11-q12	LGMD-2F (*δ-sarcolglycan*)
De centură tip Hutterite	AR	9q31-q34.1	LGMD-2G LGMD-2H

Comentariu:

[a] Transmiterea: XR- recesivă linkată cu sexul; AD- autozom dominantă; AR-autozom recesivă

[b] Localizarea: localizarea pe cromozom al locusului morbid, sau a genei în caz dacă ea este cunoscută.,

[c] Simbolul: acronimul locusului sau a genei aprobat de *Nomenclature Committee of the Human Gene Mapping International Workshops.*

Gena: în caz dacă este ştiut numele deplin al produsului genetic, el este dat în paranteze;

Aspecte patogenetice

Dereglările membranale în cadrul distrofiilor musculare progresive.

Încursiunea DMP relevă câteva etape de studiere cu evidențierea ipotezelor adecvate nivelului de cercetare la momentul dat. Se disting ipotezele miogenă, neurogenă, vasculară, membranală. Actualmente ipotezei membranale i se atribuie rolul primordial în explicarea patogeniei.

Dovadă sunt rezultatele investigațiilor unor autori despre defectul sistemic al adenozinmonofosfatului ciclic (cAMP) ca ipoteză a apariției procesului miodistrofic. Autorii afirmă, că diminuarea cantității sau lipsa cAMP poate fi interpretată drept cauza de bază a creşterii permeabilității membranei celulare, a inhibării proceselor de fosforilare, dereglării metabolismului de calciu, inversării sintezei proteice.

Cercetările lui Jacobs H. et. al., Passos M. et. al., Гринио Л. et.al. au stabilit implicarea lactatdehidrogenazei, creatinfosfokinazei în patogenia DMP. Rezultatele date au permis autorilor a deduce că hiperactivitatea enzimatică în cadrul DMP este cauzată de un defect molecular primar al sarcoplasmei. Ipoteza dată pare să fi găsit confirmarea experimentală la bolnavi voluntarii prin metoda administrărilor intravenoase a unor substanțe de masă moleculară diferită .

M.Cullen şi J.Fulthorpe cu ajutorul microscopiei electronice au studiat cele mai timpurii schimbări structurale ce au loc în țesutul muscular în stadiile preclinice la bolnavii cu DMP forma Duchenne. Autorii susțin că în cazul DMP Duchenne poate exista un defect în membrana celulară, ce favorizează influxul de Ca din spațiul extracelular în celulă. În rezultat are loc activarea proteazelor neuronale, care şi sunt responsabile de dezintegrarea şi deteriorarea enzimatică a fibrelor musculare. Cercetările ulterioare au confirmat existența defectul membranei citoplasmatice, care a fost definit ca «leziunea de tip delta». Acumularea ionilor de Ca2+ de către miocite se depistează în stadiile inițiale al maladiei. Se atribuie un rol deosebit proteinelor cu rol reglator în metabolismul ionilor de Ca: calsecvestrinei, calmodiumei, parvalbuminei, troponinei C şi proteinei S100. În cadrul DMP Duchenne cu progresarea maladiei nivelul parvalbuminei în țesutul muscular scade într-atât, încât ea practic, nu poate fi detectată. De notat, că valorile parvalbuminei la pacienții cu DMP Becker şi FSH sunt în limitele normei. Tot în cadrul DMP Duchenne se constată un proces autoimun cu producerea autoanticorpilor la proteinele reglatoare ale metabolismului de Ca.

Ca răspuns la majorarea concentrației de Ca intracelular reticulul sarcoplasmal şi mitocondriile (inițial compensator) efectuează captarea a acestuia. În timp, mecanismele compensatorii se epuizează treptat, survenind defectul funcțional al mitocondriilor ce determină scăderea

producerii ATP-ului. Se instalează un deficit energetic şi deficienţe în acumularea de Ca în reticulul sarcoplasmatic. Toate aceste fenomene măresc gradul de afectare a membranelor şi, respectiv, sporesc influxul de Ca intracelular.

Perturbările metabolismului de Ca cu schimbări patologice ale sarcolemei şi miocitelor aduc un plus de credibilitate ipotezei membranare a patogeniei distrofiilor musculare.

Modificările morfologice în distrofiile musculare progresive.

Distrofiile musculare progresive reprezintă un grup de afecţiuni genetic determinate cu manifestări clinico-morfologice asemănătoare. Conform concepţiei actuale a patogeniei DMP, defectul biochimic primar – deficitul sau lipsa unei proteine răspunzătoare de integritatea membranei celulei musculare, rezultă în creşterea influxului ionilor de Ca în celulă şi necrotizarea ulterioară a fibrelor musculare.

Deoarece defectul biochimic primar se realizează la nivelul membranei a fibrelor musculare, mai multe lucrări au fost consacrate schimbărilor morfologice ce au loc în cadrul maladiilor date.

Astfel, Kopieva T. (1974, 1980), Watkins S (1985) studiind particularităţile metabolismului musculaturii scheletale în cadrul DMP Duchenne, afirmă că pentru nosologia dată e caracteristic micşorarea numărului fibrelor musculare în fascicole; schimbări distrofice şi necrobiotice în fibrele păstrate; proliferarea ţesutului conjunctiv şi adipos cu focare de infiltrare limfo-histiocitară.

Cercetările efectuate la etapele iniţiale ale distrofiilor musculare progresive revelă o diferenţă în diametrul fibrelor, fibre rotunde, bine delimitate cu o captare uniformă a colorantului de către sarcoplasmă. Unele fibre fiind voluminoase, însă cele mai multe atrofice, pe alocuri se determinau clivaj longitudinal a fibrelor musculare. Multiplicare şi centralizarea nucleelor musculari este moderat pronunţată şi se explica prin faptul că fibra musculară îşi scurtează lungimea. Pe alocuri, predominant în vecinătate cu fibrele necrotizate, se descriu focare de fibre regenerative.

Heffner R., Manz H. cercetând mostrele bioptice de la bolnavi cu un tablou clinic mai avansat au descris proliferarea ţesutului conjunctiv, diferenţa în diametrul între fibrele musculare devine mult mai evidentă, cu predominare fibrelor musculare atrofiate.

În stadiile cele mai avansate ale maladiei se determină o atrofie marcată a fibrelor musculare, care sunt înconjurate de ţesut adipos şi conjunctiv. Numărul fibrelor regenerative este considerabil scăzut.

Unele studii au reflectat particularităţile morfologice ale DMP Becker comparativ cu tabloul morfologic în DMP Duchenne. Astfel, la pacienţii

cu DMP Becker de vârsta mai mică de 15 ani, s-a depistat că necroza fibrelor musculare era insoțită de un proces regenerativ intens. La pacienții mai vârstnici, procesul degenerativ era mai puțin manifestat, însă predominau fibrele de tipul "*mouth eaten*", fenomene de clivaj şi fibre hipertrofiate. În cadrul DMP Duchenne spre deosebire de DMP Becker, predominau fibrele hipercontractate şi necrotizate, precum şi proliferarea țesutului muscular conjunctiv. Pentru DMP Becker sunt mai tipice grupări nucleare şi grupe mici de fibre atrofiate. Pentru ambele grupe sunt caracteristice predominarea fibrelor musculare de tipul I, clivajul, fragmentarea fibrelor şi tentative de regenerare.

Paralel cu studierea schimbărilor ce au loc în musculatura scheletică s-au efectuat unele cercetări a stratului muscular vascular la bolnavii cu DMP Duchenne. Cercetările, efectuate cu ajutorul microscopului electronic au demonstrat edemul vacuolar al celulelor endoteliale vasculare. În stadiile preclinice se revelau replicări ai pliurilor membranei bazale, regenerări capilare şi agregări trombocitare în arteriole şi venule.

Cercetările endoteliului vascular sunt consacrate cercetările lui Kobayashi Y et. al. Autori afirmă că starea endoteliului vascular în cadrul DMP Duchenne variază de la tipul normal al endoteliului până la tipul moderat patologic.

Rezultatele cercetărilor date suspectă o posibilă implicație a vaselor în procesul miodistrofic. Însă contrarea conceptului dat nu este deplină fără a efectua o analiză minuțioasă a corelării tabloului morfologic cu diferite etape de evaluare a tabloului clinic al maladiei. Cu regret în literatura accesibilă se descriu doar schimbări morfologice caracteristice. De asemenea în literatură nu se analizează corelativ schimbările în gravitatea tabloului clinic şi în procesul degenerativ-distrofic al miocitelor cu schimbările respective în vase la diferite etape de evoluție a maladiei.

Studiul molecular – genetic al distrofiilor musculare progresive.

Principiul reacției polimerazice în lanț /RPL/

Până nu demult, hibridizarea cu sonde ADN şi clonarea constituiau metoda unică de explorare şi de evidențiere ale consecutivităților specifice genomice şi ADNc în scopul cercetărilor ulterioare. Pe lângă volumul mare de muncă necesar pentru efectuarea acestor metode, ele au un şir de neajunsuri şi restricții principiale.

Metoda alternativă de analiză a ADN-ului genomic – metoda reacției polimerazice în lanț(RPL), propusă în anul 1983 de către cercetătorul american Carry Mullis, căruia i s-a decernat în acelaşi an premiul Nobel pentru această invenție, constituie o descoperire epocală în biologia moleculară a secolului XX. Metoda RPL sau amplificarea specifică a ADN-

ului permite de a sintetiza selectiv in vitro fragmente de mărime relativ mică a ADN-ului, cu lungimea de la câteva zeci până la câteva sute de perechi de nucleotide, mai rar până 1000-2000 p.b., utilizând în calitate de matrice orice mostră de ADN ce conține şirul de amplificare. Pentru efectuarea amplificării speciale nu sunt necesare cantități mari de ADN matricial, în principiu este suficientă chiar şi o singură moleculă .

Succesul în elaborarea metodei RPL, în mare măsură, se datorează utilizării în calitate de enzimă ce asigură sinteza ADN a ADN-polimerazei termofile, extrasă din bacteriile ce populează sursele termale şi din care cauză enzima este rezistentă la acțiunea temperaturilor înalte.

În prima etapă (fig.1), ADN-ul matricial bicatenar studiat se aduce la forma monocatenară prin încălzire timp de câteva minute până la o temperatură ce depăşeşte 95-98°C. Schema ulterioară a efectuării RPL este destul de simplă şi constă în alternarea următoarelor cicluri:

- denaturarea structurilor bicatenare formate.
- hibridizarea ADN-ului cu praimeri;
- sinteza consecutivității ADN-ului matricial complementar;

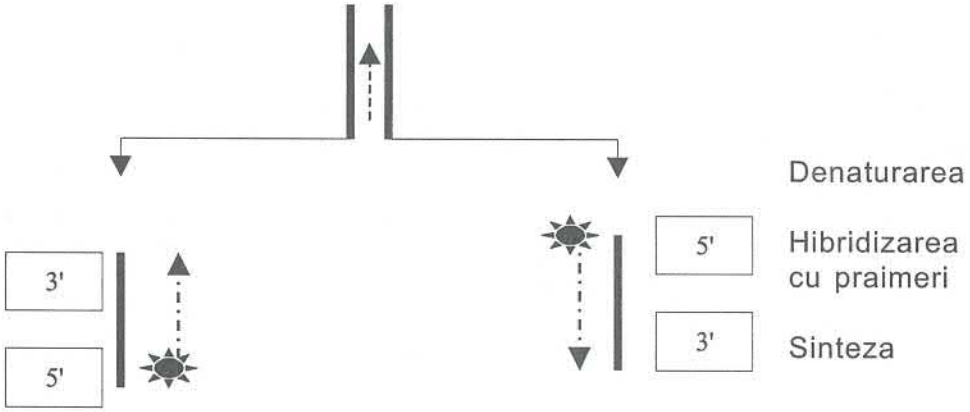


Fig.1 Schema reacției polimerazice în lanț.

Astfel, în fiecare ciclu are loc dublarea numărului de copii sintetizate ale sectorului ADN ales pentru amplificare, iar conținutul produselor amplificării în soluție creşte în progresie geometrică.

Cu ajutorul RPL, este posibilă studierea nemijlocită a regiunii de localizare a presupuselor mutații sau saituri polimorfe, precum şi studierea prezenței oricăror altor particularități specifice ale ADN. Selectarea sistemului de oligopraimeri se efectuează pe baza analizei consecutivității nucleotidelor sectorului supus amplificării.

Există diverse modificări ale RPL, care se utilizează în dependență de scopurile concrete ale reacției planificate sau de caracterul analizei moleculare ulterioare a produselor amplificării.

Astfel, pentru sectoarele dificil amplificabile de ADN şi, de asemenea, în cazurile când ADN-ul matricial este prezent în cantităţi infime, RPL se efectuează în două etape, utilizând la etapa a doua de amplificare în calitate de ADN matricial produsele RPL, sintetizate în prima etapă.

Într-o serie de cazuri este comod de a efectua RPL multiplexă, adică amplificarea concomitentă a mai multor sectoare de ADN matricial, care se utilizează pentru explorarea directă a deleţiilor extinse în gena distrofinei. RPL multiplexă, propusă de savanţii americani Jeffry S.Chamberlain et al., (1988), Abbs S.et al., (1991), Alan H. Beggs et al. (1990) pentru diagnosticarea DMP Duchenne, în prezent, se utilizează pe larg în practica medicală.

Reacţia de amplificare poate fi efectuată nu numai în soluţii, dar şi nemijlocit pe preparatele cromosomiale, unde, în cazul utilizării nucleotidelor marcate, produsele amplificării se vor hibridiza, evidenţiind sectoarele de ADN, complementare lor pe cromosomi (metoda PRINS polimerase reaction in situ). Există multe modificări ale RPL şi, în prezent, această metodă, pe bună dreptate, a devenit una din metodele de bază în diagnosticarea moleculară a maladiilor ereditare (PCR topics, 1993).

Variabilitatea genomului. Saiturile polimorfe restricţionale. Testul PLFR.

Regiunile codificatoare şi reglatoare ale genelor structurale sunt cele mai conservative în procesul evoluţiei, deoarece mutaţiile în ele sunt supuse acţiunii selecţiei naturale. Însă, circa 90% din genomul uman constă din consecutivităţi necodificante, similare ADN-urilor satelit, repetărilor moderate, entronilor şi intervalelor spacer dintre gene. Aceste sectoare sunt mai variabile şi conţin o mulţime de aşa numite mutaţii neutre (polimorfisme), care afectează saiturile de identificare ale unor sau altor endonucleaze, însă nu au o exprimare fenotipică şi nu exercită o acţiune vizibilă asupra viabilităţii şi proprietăţilor reproductive ale indivizilor şi, de aceea, nu sunt supuse acţiunii directe ale selecţiei naturale.

Fenomenul polimorfismului în cercetările genetice a fost utilizat, pentru prima oară, încă în anul 1974 de către G. Sambruck, care a realizat maparea fizică a mutaţiilor termosensibile la adenoviruşi cu ajutorul marcherilor polimorfi. Primul caz de polimorfism nemijlocit în genomul uman a fost efectuat în anul 1978 de către Can şi Dowsy. Prelucrând ADN-ul cu restrictaza Hpa1 în populaţia negroidă din San-Francisco, savanţii au depistat în locusul beta-globinei un fragment de ADN cu lungimea de 13 mii perechi de baze, ce se asocia cu beta-globina eritrocitrlor în formă de seceră, fragment ce lipsea la eritrocitele normale.

În 1978, la o conferinţă în domeniul geneticii, Botstein G. At al. (1978) a expus ipoteza despre faptul, că orice consecutivităţi anonime ale ADN

pot servi sinestătător ca o multitudine de marcheri ale polimorfismului şi pot fi utilizate în testele genetice. Aceşti autori, în colaborare cu R. Wait, au formulat principiul universal al marcajului genetic cu ajutorul sondelor ADN întâmplătoare. Acest principiu se bazează pe crearea colecţiilor de ADN marcheri clonaţi ai polimorfismului. În acest caz sectorul polimorf se poate găsi nu numai în imediata apropriere de gena cercetată, dar şi la o distanţă considerabilă de ea, însă neapărat în acelaşi locus cromozomial.

Locusurile polimorfe sunt marcheri genetici comozi. Pe baza analizei genealogice se poate urmări moştenirea lor de-a lungul generaţiilor şi cerceta înlănţuirea lor unul cu altul, cu genele cunoscute şi cu consecutivităţile ADN anonime, deci ei pot fi utilizaţi în calitate de criterii mendeliene obişnuite în analiza genetică clasică. Deoarece ei se utilizează ca marcheri neutri, atunci orice criteriu genetic ce segregă în generaţii poate fi marcat cu o anumită variantă de PLFR. Luând în consideraţie că locusurile PLFR sunt strâns înlănţuite cu gena mutantă în familiile de risc înalt (purtători heterozigoţi) şi la bolnavii respectivi, se poate spune, că această analiză constituie o etapă importantă în diagnosticul molecular al maladiilor ereditare precum fenilcetonuria, mucoviscidoza, retinita pigmentară, corea Huntington, hemofilia A şi B şi DMP Duchenne. Informativitatea locusurilor polimorfe se determină după nivelul variabilităţii genetice ale acestora în diverse populaţii.

Pe cale experimentală se identifică uşor două variante de polimorfism genomic: modificările cantitative în regiunea localizării consecutivităţilor mini- şi macrosatelite ale ADN-ului şi substituirile calitative ale unor nucleotide ce duc la apariţia saiturilor polimorfe restricţionale. Polimorfismul în saiturile restricţionale este asociat cu prezenţa mutaţiilor neutre punctiforme localizate, de regulă, în consecutivităţile unicale ale sectoarelor ADN necodificante. Asemenea mutaţii, în condiţiile codului genetic degenerat, pot apărea şi în consecutiffvităţile codificante ale genelor. Mutaţiile spontane, apărute în saiturile de recunoaştere pentru anumite restrictaze le conferă acestora rezistenţă la acţiunea enzimelor date. În mod analog, la asemenea substituiri pot fi create noi saituri restricţionale.

Variabilitatea mutaţională în saiturile restricţionale poate fi uşor depistată după modificarea lungimii fragmentelor restricţionale de ADN ce se hibridizează cu sonde ADN specifice. Analiza polimorfismului lungimii fragmentelor restricţionale, aşa numitul PLFR-test (Reatriction Fragment Length Polymorphism – RFLP analysis) include următoarele etape: extragerea ADN-ului genomic, restricţia specifică a acestuia cu ajutorul endonucleazei, separarea electroforetică a fragmentelor obţinute de ADN şi identificarea fragmentelor de ADN ce conţin saitul polimorf restricţional prin blot-hibridizare după Souzern.

Testul PLFR poate fi simplificat considerabil în cazul când e posibilă amplificarea specifică a sectorului ADN ce conține saitul polimorf restricțional. Această metodă, spre deosebire de blot-hibridizare, este mai simplă după tehnica de realizare şi posibilitatea de efectuare a analizei concomitente a unui număr mare de probe (mai mult de 20), nu necesită sonde ADN greu accesibile şi, de asemenea, nu implică în lucru substanțe radioactive. Testarea statusului locusului ADN e posibilă prin efectuarea RPL şi restricția fragmentului amplificat. În lipsa saitului de recunoaştere în regiunea ADN investigată, dimensiunea fragmentului amplificat nu se modifică după prelucrarea acestuia cu endonucleaza corespunzătoare, pe când la coincidența regiunii polimorfe cu saitul restricțional se formează diferite fragmente cu lungimi mai mici.

E cert de menționat că saiturile polimorfe restricționale întotdeauna prezintă un sistem bialel, de aceea chiar şi la cea mai înaltă variabilitate a acestui sait, numărul indivizilor heterozigoți în populație după locusul dat nu va depăşi 50%. Totuşi, numai în prezența saitului în stare heterozigotă, se poate diferenția alela mutantă de cea normală, adică e posibilă realizarea marcării moleculare a acesteia. Prin urmare, capacitatea informațională a unui asemenea polimorfism este relativ mică.

Gena distrofinei posedă saituri intragenice, care pot fi stabilite cu ajutorul polimorfismelor pERT 87-8/Tag 1, pERT 87-15/BamH1, 123/Pst1. Toate aceste polimorfisme pot fi utilizate în complex la diagnosticarea şi stabilirea purtătorului heterozigot.

Să examinăm principiul diagnosticării prin sondă cu ajutorul marcherilor înlănțuiți pentru cazul când recombinarea dintre sondele locusului DMP Duchenne nu are loc şi, prin urmare, DMP Duchenne şi alela înlănțuită cu aceasta, ce corespunde sondei, întotdeauna se moşteneşte simultan. Pentru a determina care din cromozomi a trecut la copil, se propune de a efectua următoarele etape de diagnosticare, ce permit de a diferenția aceşti cromozomi.

Prima etapă de diagnosticare constă în verificarea existenței polimorfismului în cromozomii materni în sondele din biblioteca de sonde. Pentru diagnosticare este necesară cunoaşterea alelei cu care este înlănțuită gena DMP Duchenne.

Etapa a doua de diagnosticare constă în determinarea fazei DMP Duchenne. Ea poate fi efectuată în două moduri. În primul rând, după orice membru bolnav al familiei se poate de determinat cu ce alelă este înlănțuit locusul. În al doilea rând, după tatăl femeii ce i-a transmis acesteia cromozomul ce nu conține mutațiile genei DMP Duchenne, sau după feciorul sănătos, la care alela este înlănțuită cu gena ce funcționează normal.

Etapa a treia – diagnosticul propriu-zis.

Această schemă a diagnosticării prin sondă se utilizează şi în diagnosticarea reală, însă concluziile la toate etapele vor purta un caracter aproximativ, deoarece există o anumită probabilitate a crosingoverului dintre saitul investigat şi DMP Duchenne. Astfel de crosingover este reprezentat schematic în fig. 2-3. Probabilitatea schimbului dintre două locusuri depinde de distanţa dintre aceştia. Această probabilitate se determină experimental şi este cunoscută cu exactitate pentru toate sondele cercetate în diagnostic.

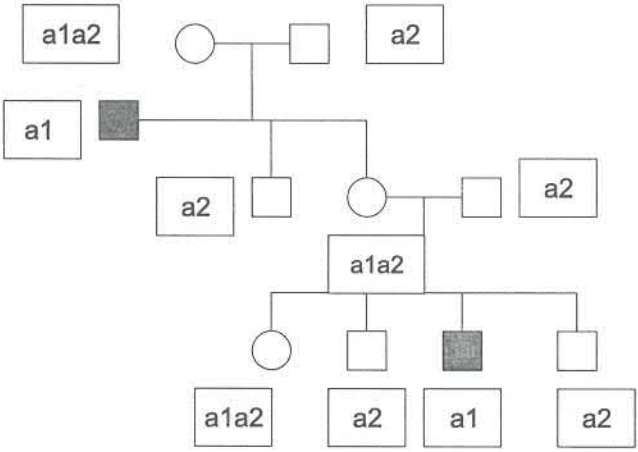


Fig.2. Genealogia familiei cu complicaţii ereditare MDD.

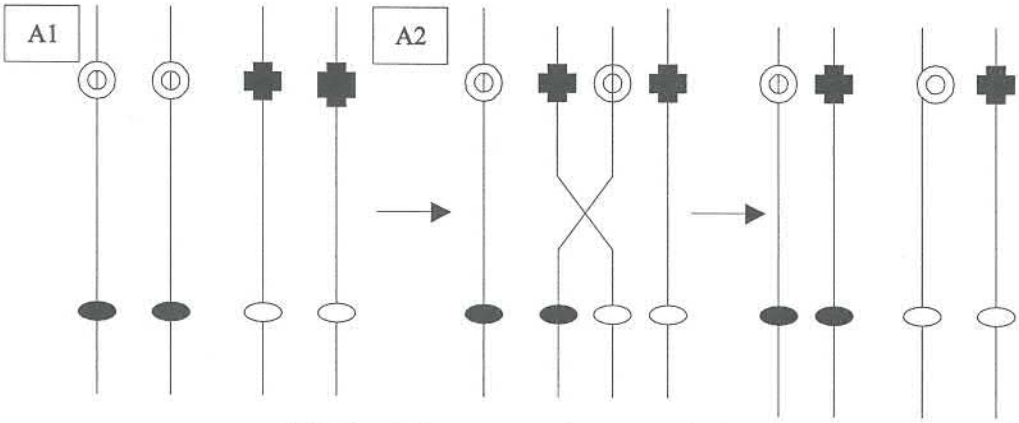


Fig.3. Schema crosingoverului.

Totuşi, se creează impresia, că în cazul DMP Duchenne, nu este posibilă obţinerea unui rezultat cu o eroare mai mică de 5%. Cu toate acestea, eroarea de 5% a prezicerii e considerată în toate cazurile satisfăcătoare. O determinare mai exactă poate fi obţinută cu ajutorul sondei flancante. Marcherii moleculari, care determină cea mai mică frecvenţă de recombinare cu DMP Duchenne (pERT, XJ), nu pot fi utilizaţi în calitate de sonde flancante, deoarece se găsesc în interiorul zonei, unde mutaţiile pot duce la DMP Duchenne (tab. 2).

Tabelul 2.

Incidenţa crosingoverului în locusurile, utilizate în diagnosticul MDD

Poziţia în genă	Locusul	Incidenţa
Proximal	21-28	0,20
	754	0,16
Intragenic	XJ 1(XJ11)	
	XJ 1,2	
	XJ 5	
	XJ 8	
	HIP 25	
	PERT87.1	0,05
	PERT87.8	0,05
	PERT 87.15	0,05
	PERT 87.30	
	J bir	
	P20	
Distal	C 7	0,12
	99,9	0,15
	RC 8	0,20

Bazele genetice ale patogeniei DMP

Investigaţiile molecular-genetice au deschis o nouă eră în studierea DMP. În 1987 a fost cartată şi caracterizată în regiunea Xp21 a cromozomului X gena responsabilă de apariţia DMP Duchenne. Identificarea genei a permis descoperirea produsului expresiei genetice, care este o proteină denumită distrofină. Aceasta proteină conţine 3685 de aminoacizi cu o masa moleculară 427 kDa. Fenotipul formei clinice Duchenne apare ca rezultat al dereglării complete al sintezei distrofinei, micşorarea sintezei de distrofină sau modificarea dimensiunii moleculei de distrofină expresează fenotipul clinic al DMP Becker.

Studiile ulterioare au evidenţiat că distrofina este o parte componentă a complexului distrofin- glicoproteidic (CDG) – o grupă de proteine membranare ce asigură conexiunea între citoscheletul intracelular şi spaţiul extracelular. Complexul dat e compus din distrofina, distroglicane α şi β, sarcoglicane, sarcospană, sintrofine. Proteine însoţitoare sunt

clasificarea distrofiilor musculare are ca punct de reper paternul musculaturii implicate, este important a stabili cum o mutație în aceeaşi genă poate produce manifestări morbide diferite.

Într-un tip de distrofii musculare (distrofia musculară progresivă facio-scapulo-humerală (DMP FSH)) de asemenea poate fi urmărită o situație neobişnuită în ce priveşte testarea genetică. În 95% din cazurile cu DMP FSH este implicată gena situată pe cromozomul 4q35. Dar, deoarece gena în cauză şi produsul ei încă nu au fost descoperite, mecanismele moleculare de instalare a acestui tip de distrofie rămân obscure.

Cunoaşterea bazelor teoretice despre substratul patologic al distrofiilor musculare permite perfecționarea diagnosticului clinic, ele fiind şi un punct de reper în evaluarea pronosticului şi efectuarea diagnosticului prenatal în scopul profilaxiei maladiilor date.

PARTICULARITĂȚILE DE EXAMINARE A PACIENȚILOR CU DMP

Studiul a fost efectuat pe un lot de 130 bolnavi (112 băieți (86,2%) şi 18 fete (13,8%)) cu diferite forme de DMP. Selectarea şi repartizarea bolnavilor după formele nosologice s-a efectuat conform criteriilor diagnostice elaborate de Centrul Neuromuscular European .

Pentru fiecare pacient, la care se depista o maladie neuro-musculară ereditară, se perfecta o fişă specială cu caracteristica minuțioasă a stării generale, descrierea statusului neurologic precum şi aprecierea forței musculare.

Repartizarea lotului de bolnavi după entitățile nozologice, sex şi vârstă sunt reprezentate în tabelul 3:

Tabelul 3.

Repartizarea bolnavilor după entitățile nosologice, sex şi vârstă

Diagnosticul	Vârsta	1-4		5-9		10-15		>15		Total (%)
	Sexul	m	f	m	f	m	f	m	f	
DMP Duchenne		4	-	59	-	14	-	2	-	79 (60,8%)
DMP Becker		-	-	2	-	7	-	5	-	14 (10,8%)
DMP de centură		-	1	4	1	3	7	5	4	25 (19,2%)
DMP FSH		-	-	-	3	3	2	4	-	12 (9,2%)

După gradul de afectare a funcțiilor motorii toți pacienții au fost împărțiți în trei loturi: uşoară, moderată, severă (tab.4). Pentru evaluarea funcțiilor motorii a fost elaborată "Scara de cuantificare a funcțiilor motorie" (tab. 5).

Tabelul 4

Repartizarea bolnavilor după severitatea procesului miodistrofic

	Uşoară	Moderată	Severă	Total
DMP Duchenne	8	57	14	79
DMP Becker	4	7	3	14
DMP de Centură	6	12	7	25
DMP FSH	4	4	4	12
Total	22 (16.9%)	80 (61,5%)	28 (21,5%)	130

Tabelul 5

Scara de cuantificare a funcţiilor motorii la bolnavii cu distrofii musculare progresive

	MEMBRELE INFERIOARE		MEMBRELE SUPERIOARE
6	Merge, urcă scările, se ridică din şezute fără suport	6	Mişcări în volum deplin, forţa musculară normală
5	Merge, urcă scările, se ridică din şezute cu suport, mersul calcigrad dificil	5	Scăderea moderată a forţei musculare: mişcări active contra unei rezistenţe moderate
4	Merge, urcă scările cu ajutor, se ridică din şezute cu suport, mersul calcigrad imposibil	4	Mişcări active contra unei forţe minimale
3	Merge cu suport, frecvent se opreşte, nu urcă scările, de pe scaun se ridică cu ajutor, din şezute nu se ridică.	3	Mişcări active contra forţei de gravitate
2	Nu merge, stă cu suport, deplasarea în cărucior, contracturi în articulaţii	2	E posibilă pronaţia şi supinaţia
1	Imobilizat la pat, şede cu suport, mişcări active minimale, contracturi şi retracţii articulare, cifoscolioză	1	Mişcări active numai în degete
0	Imobilizat la pat, mişcări nu sunt, deformaţii scheletice brutale	0	Mişcări active nu sunt

Analiza generală a dereglărilor motorii a revelat următoarele particularităţi. Pacienţi cu afecţiuni motorii uşoare se caracterizau clinic prin semne incipiente de afectare a sistemului neuro-muscular. Bolnavii se deplasau autonom, se autodeserveau, efectuau un lucru fizic uşor. Deficitul motor se depista la efort fizic majorat sau mers îndelungat. Testarea cantitativă a funcţiilor motorii a relevat un punctaj în limitele 10-12 puncte. Dereglările motorii în acest lot de pacienţi au fost considerate clinic compensate.

Dereglări motorii mult mai evidente au fost apreciate în următorul lot. La pacienţi s-au depistat schimbări ale funcţiilor motorii şi de statică. În acest lot se evidenţia aspectul caracteristic al bolnavului, ţinuta, mersul. Pacienţii se deplasau autonom la distanţe scurte, însă necesitau des un suport suplimentar (baston sau însoţitor). Se evidenţiau dificultăţi considerabile la examinarea cu efectuarea exerciţiilor fizice. Cuantificarea a funcţiilor motorii a relevat un scor în limitele de 6-9. Etapa dată de

evoluție a bolii a fost considerată ca formă subcompensată a maladiei.

Forma decompensată de evoluție a maladiei s-a caracterizat prin dereglări motorii grave. Deplasarea autonomă şi autodeservirea erau imposibile. Efectuarea testelor neurologice relevă apariția asteniilor musculare considerabile şi contracturi articulare severe. Cuantificarea a funcțiilor motorii a relevat un scor în limitele de 0-5.

Diagnosticarea DMP se efectuează în două etape:

I etapă:

a) anamneza;

b) anamneza familială;

c) examinarea clinică;

În cazul în care la bolnav era suspectată patologia în cauză se recurgea la a doua etapă de diagnostic, care constă în:

a)teste biochimice ale sângelui;

b)investigații neurofiziologice;

c)studierea histologică a bioptatului muscular;

d)investigații suplimentare: funcția respiratorie, funcția sistemului cardio-vascular etc.

Culegerea anamnezei şi anamnezei familiale

Anamneza sa cules de la copii afectați, sau de la părinți, în caz dacă examinăm un copil de vârsta infantilă. Anamneza bine culeasă poate sugera un diagnostic prezumtiv.

O deosebită atenție s-a acordat următoarelor întrebări: vârsta debutulu bolii, ameliorarea sau agravarea stării prezente pe parcursul maladiei, starea țesutului muscular (hipertrofiat sau atrofiat), acuze de miastenii, dureri musculare, crampe. S-a concretizat dacă a fost sau nu asociat debutul cu alte maladii afebrile sau febrile, intoxicații alimentare sau medicamentoase. Fiecare maladie ereditară are modul său predilect de transmitere genetică. Astfel culegerea informației familiare şi prezentarea ei grafică (fig.4) deseori ne orientează spre o anumită nosologie.

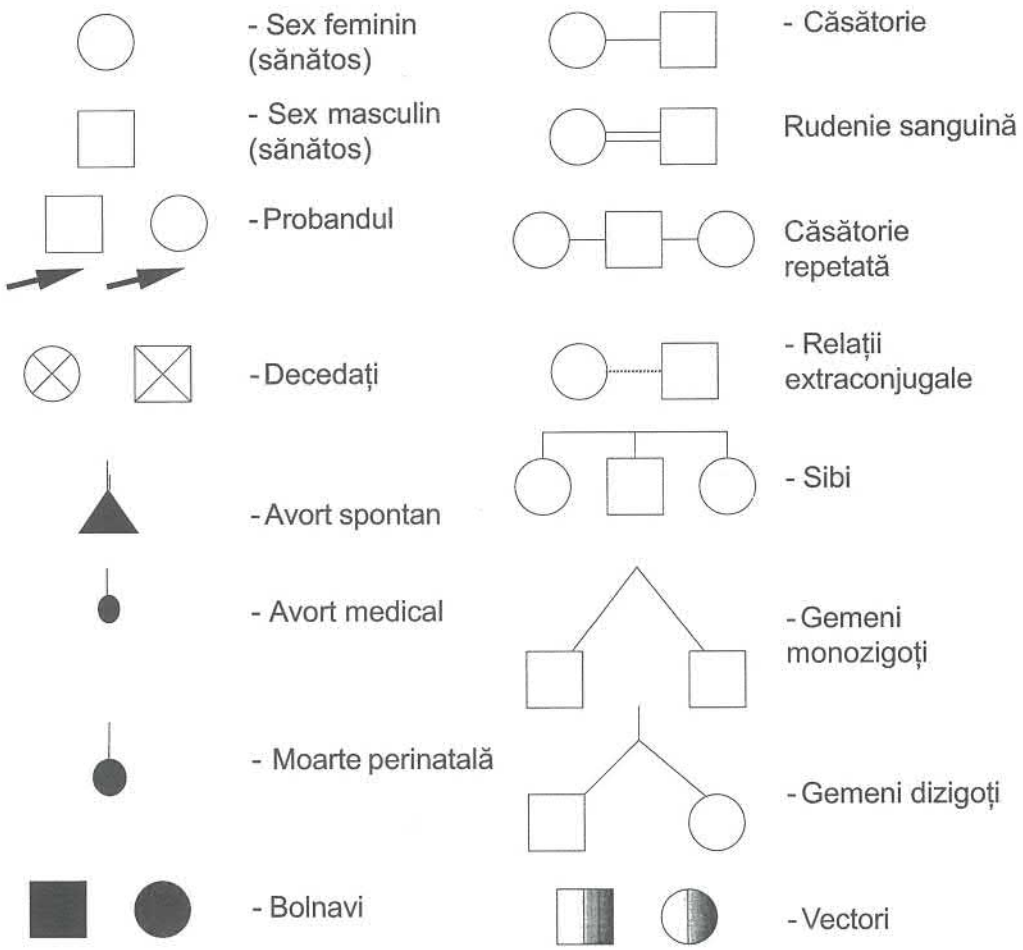


Fig. 4 Simboluri genetice

În timpul culegerii informației atenția s-a orientat asupra înrudirii de sânge pe linia maternă şi paternă pe parcursul a 3-4 generații, s-a clarificat locul naşterii probandului şi rudelor, naționalitatea lor, s-au notat datele despre avorturile spontane. În caz de moarte prenatală sau în vârsta infantilă s-a indicat cauza decesului, etc.

Particularitățile examinării clinice

Examinarea clinică a inclus examinarea neurologică standard precum şi aplicarea unor teste specifice pentru detectarea deficitului muscular. De menționat că evaluând dezvoltarea motorie, coordonatorie şi psihică la un pacient concret s-a ținut cont de posibilitățile fizice ale copiilor sănătoşi de aceiaşi vârstă.

La inspecția generală s-a urmărit la prezența unor semne ca: mărirea sau micşorarea volumului muşchilor, deformații scheletice, contracturi, mers de păpuşă, mers digitigrad, caracterele mişcărilor scapulei în sens anterior şi superior la abducția brațelor, pentru semnul caracteristic a umerilor "*scapulae alatae*" .

Analizând volumul şi consistența muşchilor s-e trage concluzia despre hipotrofia, hipertrofia sau pseudohipertrofia lor.

Majoritatea DMP sunt însoțite de slăbiciuni şi atrofii musculare, ceea ce implică secundar sistemul scheletic. Cel mai frecvent modificările scheletice se prezintă sub forma de hiperlordoză lombară, "*scapulae alatae*", contracturi talo-crurale.

După o evaluare generală s-a efectuat studiul neurologic mai detailat. S-a atras atenția la aşa semne ca schimbarea reflexelor osteo-tendinoase (ROT), prezența dereglărilor senzoriale, starea tonusul muscular, forța musculară, precum şi malfuncția musculaturii faciale sau a nervilor cranieni.

Analizând mişcările repetate ale membrelor contra rezistenței se poate trage concluzia despre forța musculară. Deficitul muscular s-a cuantificat după caracterul mersului şi gradul de rezistență la exerciții repetate: urcarea scărilor, mişcări repetate ale mâinilor împotriva rezistenței, ridicare din şezute.

Studiul morfologic al țesutului muscular.

La 38 de pacienți s-a efectuat biopsia muşchilor afectați, de obicei prelevată din muşchii gambei sau muşchii umărului. La pacienții maturi bioptatul se prelevă sub anestezia locală, iar la pacienții mai mici sub anestezie generală.

Biopsia se practică prin metoda deschisă, astfel se făcea o incizie de 2-3 cm, se lua o mostră de muşchi, apoi plaga era suturată. Mostrele obținute imediat se plasau un soluție conservantă (formalina de 10%) şi ulterior se fixau in blocuri de parafină din care ulterior se pregăteau lamele de grosime 3-5 microni. Piesele histologice au fost colorate cu hematoxilin eozină şi cu picrofuxină după metoda lui van Gieson pentru a determina țesutul conjunctiv. Preparatele s-au cercetat în microscopul MBI-6.

Examenul neurofiziologic.

Studiul electromiografic (EMG) s-a efectuat cu aparatul "Keypoint" (Danemarca).

În funcție de zonă a atrofiilor s-au investigat muşchii distali şi proximali ai membrelor, *mm. biceps şi triceps* ai umărului, mm. distali al mâinii, *mm. biceps şi quadriceps* ai femurului, mm. peronieni şi m. gastrocnemian.

Potențialul electric al fiecărui muşchi s-a înregistrat în stare de "repaus", în caz de reacții tonice respiratorii şi sinergice, în caz de

contracție musculară maximală şi contracția muşchilor antagonişti. EMG s-a analizat după structura, frecvența şi amplitudinea oscilațiilor.

Pentru stabilirea parametrilor potențialelor de unitate motorie (UM) s-au utilizat electrozi de implantare. Electrogeneza s-a studiat în trei stări: la introducerea şi avansarea acului, în stare de repaus, în condiții de contracție voluntară.

Examinarea a fost efectuată utilizând electrozi de suprafață şi de profunzime. Electrozii de suprafață sunt constituiți din 2 plăcuțe de metal, aplicate la 4-5 cm distanță una de alta, pe tegumentele de proiecție a muşchilor pe care urmează să-i explorăm. Electrozii de suprafață prezintă avantajul că nu sunt dureroşi, dezavantajul constând în faptul că detectează activitatea muşchiului în întregime, sau chiar şi a muşchilor de vecinătate, fără a putea limita explorarea la o singură UM, dând trasee EMG complexe şi mai greu de analizat.

Pentru analiza de finețe a traseelor electromiografice sunt utilizate derivațiile prin ace electrod. Prin intermediul acului-electrod se pot capta potențialele de acțiune ale unei singure UM. Electrozii de profunzime sunt similari ca aspect cu acele de seringă, confecționate din metal inoxidabil, în lumenul acului fiind amplasate unul sau mai multe fire de platină. Culegerile pot fi efectuate prin derivații mono-, bi- sau multipolare, mai frecvent fiind utilizate ace electrod monofazice, bipolare.

În "repaus" şi la reacțiile tonice, activitatea bioelectrică lipseşte; în timpul contracției voluntare maximale se înregistrează o activitate bioelectrică de frecvență înaltă, dar cu o amplitudine redusă considerabil a potențialelor. La recepționarea locală cu ajutorul electrozilor aciculari, înfipți în zona punctelor motorii ale muşchilor cvadricepşi, gastrocnemieni, tibiali şi deltoizi s-a efectuat înregistrarea în fazele de "repaus", de reacții tonice şi de contracții la efort slab şi mediu.

În faza de repaus, la majoritatea bolnavilor a fost relevată "tăcerea bioelectrică", doar la câțiva au fost remarcate potențialele împunsăturilor. Măsurarea duratei potențialelor a scos în evidență micşorarea lor până la 3-5ms (norma fiind 8-12ms) atât la contracțiile voluntare slabe cât şi la cele puternice, fapt ce constituie o particularitate a miodistrofiilor primare. Scurtarea duratei potențialelor depinde de stadiul maladiei şi de viteza cu care aceasta evoluează.

Astfel, particularitatea caracteristică grupului dat de bolnavi cu miodistrofie primară la investigația electromiografică constă în gruparea potențialelor, reducerea amplitudinii şi în numărul mare de potențiale polifazice, care au aspectul unei serii de pulsații scurte.

Separarea ADN din leucocitele sângelui venos

La 2ml de sânge colectat s-a adăugat 0,5ml anticoagulant (citrat de natriu). Sângele astfel pregătit poate fi utilizat în lucrul curent sau poate fi congelat la -20°C pentru păstrare îndelungată. În continuare se adăugau două părți de volum soluție tampon de zaharoză cu componența: 0,32M zaharoză, 5mM MgCl2 , soluție de 1% triton X-100 şi 10mM tris HCl cu pH=7,5 pe gheață. Toate acestea erau amestecate şi lăsate în frigider pe 10 minute, iar apoi centrifugate la viteza de 5mii rot./min. timp de 20 minute la temperatura -4°C. După aceasta supernatantul se înlătura, precipitatul se resuspenda în 500mcl soluție fiziologică şi se centrifuga în microcentrifugă timp de 1-2 minute în eprubete de tipul Eppendorf. Supernatantul se înlătura din nou, iar precipitatul se resuspenda iarăşi în 400mcl soluție de 75 mM NaCl, 24 mM EDTA pH=8,0; 10mM tris HCl pH=10,5 1mM EDTA, 0,15M NaCl pH=8,0.

Apoi, la compoziția obținută, se adăugau 20mcl SDS de 10% şi se amestecau, se mai adăugau 5 mcl K-proteinază (cu concentrația 25 mg/l), iar amestecul obținut se introducea în termostat pe un interval de 3 ore la temperatura 53°C sau pe noapte la temperatura de 37°C.

În scopul purificării de proteine histonice se aplica prelucrarea în etape cu fenol, fenolcloroform (1:1) şi cloroform adăugând la supernatant câte 400 mcl şi amestecând minuțios timp de 10 minute. Apoi se centrifuga 1-2 minute, selectînd faza superioară apoasă (faza fenolică nu se întrebuințează). Astfel se proceda cu fiecare component. Prin asemenea metodă, deproteinizarea decurge mai eficient, deoarece fenolul denaturează activ proteinele, fără a inhiba complet ARN-azele, cloroformul utilizat înlătură rămăşițele de fenol, iar în amestec cu alcoolul izoamilic reduce formarea spumei, în rezultat are loc separarea clară în fazele apoasă şi fenolică.

În continuare, la faza apoasă se adăugau 400mcl 3M NaCl sau 3,5M acetat de natriu cu pH 5,5, după care se mai adăugau 800mcl alcool etilic de 96°. Clorura de natriu se utilizează pentru formarea sărurilor de natriu al ADN care se precipitează bine în alcool. După aceasta amestecul se centrifuga, alcoolul se vărsa iar compoziția obținută se usca timp de 1 oră (până la dispariția mirosului de alcool) şi se adăuga 100mcl soluție tampon TE cu următoarea compoziție:

1mM tris HCl pH 7,4
1mM EDTA pH 8,0

Separarea ADN din bioptatul corionului

1. Se transferă mostra recoltată din 1xSSC, 10mM EDTA într-o ceaşcă sterilă şi se spală de câteva ori în această soluție.
2. Se transferă țesutul în epindorf.
3. Se adăugă 400mcl 10mM tris HCl ph=10,5
   10mM EDTA
   0,15M NaCl
4. Se adaugă 20 mcl SDS de 10% şi se amestecă.
5. Se adaugă 5 mcl K-proteinază până la concentrația finală de 250 mg/ml.
6. Se introduce în termostat la 55°C pe 3 ore sau la 37°C pe noapte.
7. Se minute.
8. Se selectează adaugă apoi 400mcl fenol împreună cu soluție de tampon.
9. Se amestecă timp de 10 minute. Se centrifughează timp de 2 faza apoasă superioară, fără a atinge interfaza.
10. Se repetă punctele 7,8,9 cu fenolcloroform (1:1).
11. Se repetă punctele 7,8,9 cu cloroform: alcool izopropilic (24:1).
12. Se selectează faza apoasă, se adaugă 40mcl 3M NaCl sau 3,5M NaAc (ph=5,5) şi se adaugă 800 mcl alcool etilic de 96°.
13. Se observă precipitarea ADN.
14. Se centrifughează timp de 5 minute. Se varsă cu precauție alcoolul şi se adaugă alcool de 70°, se amestecă şi se centrifughează.
15. Se varsă alcoolul, se usucă până la dispariția mirosului de alcool.
16. Se adaug soluție tampon, se dizolvă ADN-ul.

Separarea ADN din amniocite

1. Se iau 40-50ml de lichid amniotic. Se centrifughează la 5000 rot./min. la temperatura de -4°C.
2. Precipitatul se resuspenzează cu 1000mcl de 1xSSC. Se transferă în epindorf şi se centrifughează timp de 5 minute la viteza de 5000 rot./min.
3. Partea de asupra precipitatului se varsă, iar la precipitat se adaugă 400 mcl de soluție cu următoarea compoziție:
   10mM tris HCl, pH=10,5
   10mM EDTA
   0,15 M NaCl.
4. Se adaugă 20mcl SDS de 10% şi se amestecă.
5. Se adăugă 5 mcl K-proteinază până la concentrația finală de 250 mg/ml.
6. Se introduce în termostat la 55°C pe 3 ore sau la 37°C pe noapte.
7. Se adăugă apoi 400mcl fenol împreună cu soluția de tampon.
8. În scopul purificării de proteine histonice se aplică prelucrarea în etape cu fenol, fenolcloroform (1:1) şi cloroform, adăugând la su pernatant câte 400 mcl şi amestecând minuțios timp de 10 minute.

Apoi se centrifughează 1-2 minute şi se selectează faza superioară apoasă. Astfel se procedează cu fiecare component.

9. În continuare, în faza apoasă se adaugă 400mcl soluţie de 3,5M acetat de natriu ph=5,5 şi se mai adaugă 800 mcl alcool etilic de 96°.
10. După aceasta amestecul se centrifughează, alcoolul se varsă, se adaugă 100mcl soluţie tampon TE cu următoarea compoziţie:

10mM tris HCl pH= 7,4, 1mM EDTA pH=8,0.

Formarea băncii de ADN a bolnavilor cu DMP Duchenne

După consultarea familiilor cu miodistrofie Duchenne şi stabilirea diagnosticului clinic, toate familiile se introduc în registrul bolnavilor de DMP Duchenne/Becker iar de la toţi membrii acestor familii se iau probe de sânge pentru banca de ADN a bolnavilor cu DMP Duchenne/Becker.

Fiecărei familii i se atribuie un anumit număr iar fiecărui individ din familia dată i se atribue un cod, format din numărul familiei, un punct şi o cifră care exprimă gradul de rudenie al acestuia în familia dată, ADN-ul membrilor familiei se marchează şi dupa maladie, în particular, ADN-ul membrilor familiilor cu DMP Duchenne se marchează cu literele DMP Duchenne. Cifra 1 după punct (.1) reprezintă ADN-ul probandului, cifra 2 (.2) – ADN-ul mamei probandului, cifra 3 (.3) - ADN-ul tatălui probandului, 4 (.4) – ADN-ul fratelui sau sorei probandului ş.a.m.d. în conformitate cu genealogia. De exemplu, familia Sudi este numerotată cu 1, probandul Sudi Valeriu Vasile, a.n. 1985, este codificat în banca de ADN cu 1.1 şi literele DMP Duchenne (1.1 DMP Duchenne). Mamei probandului - Sudi Vera Ilie, a.n. 1964, îi corespunde codul 1.2 DMP Duchenne. Tatălui probandului – Sudi Vasile Vasile, a.n. îi corespunde codul 1.3 DMP Duchenne. Fratelui probandului – Sudi Ilie Vasile, a.n. 1987 îi corespunde codul 1.4 DMP Duchenne. Sorei mamei probandului - Velicov Nadejda Ilie – îi corespunde codul 1.5 DMP Duchenne. Fiicelor sorei mamei probandului: Marina şi Elena le corespunde codurile 1.6 DMP Duchenne şi 1.7 DMP Duchenne respectiv. În continuare toate manipulaţiile se efectuează cu ADN-urile codificate în acest mod.

Mostrele de ADN sunt ţinute în congelator la temperatura -20°C şi pot fi păstrate astfel o perioadă foarte îndelungată. Bolnavii de DMP Duchenne, spre regret, mor la vârsta de 13-17 ani, dar mostrele lor de ADN sunt păstrate în Centrul medico-genetic. Aceasta este necesar pentru viitorul familiei date, deoarece surorile sau mătuşile cu verişoarele probandului pot fi purtătoare ale acestei maladii, iar pentru efectuarea diagnosticului prenatal în această familie este necesar ADN-ul probandului, care la momentul dat poate să nu mai fie în viaţă.

Astfel, registrul operativ creat de noi şi banca de ADN a distrofiilor musculare progresive ereditare, ce includ şi DMP Duchenne, ne permite de a cunoaşte necesităţile reale ale unei sau altei regiuni a ţării în

diagnosticare moleculară, inclusiv şi prenatală. În legătură cu crearea registrului a fost perfectată o propunere de raţionalizare.

Efectuarea căutării directe a deleţiilor ample în gena distrofinei prin metoda RPLM

Amplificarea a fost efectuată după metoda Chamberlain A.(1988), AbbsS. (1991), cu modificarea pentru aparatul Techne Thermal Cycler PHC – 1A (Marea Britanie). Praimerii oligonucleotidici au fost sintetizaţi la Academia de Ştiinţe Medicale din Rusia, Moscova.

Condiţiile reacţiei: volumul total –25 mcl. 1 mcl mostră de ADN genomic se adaugă la 24 mcl compoziţie (16.6 mM sulfat de amoniu; 67 mM tris HCl pH 8,8; 6,7 mM clorură de magneziu; 10 mM 2-mercaptoetanol; 6,7 mM EDTA; 0,17 mg/ml albumină serică bovină; 1 mM de fiecare dNTP; 3,5-5 un. de activitate ADN polimerază Thermus thermophilis şi câte 0,35 unitate optică de fiecare praimer (este perfectată o propunere de raţionalizare)).

Compoziţia se prepară reieşind din numărul probelor, înmulţind cantitatea iniţială a componentelor cu numărul de probe, iar apoi la fiecare 1 mcl probă-ADN se adaugă câte 24 mcl compoziţie.

Amplificarea exonilor investigaţi s-a efectuat în următorul regim: 95°C – 0,8 min (denaturarea), 58°C – 0,8 min (călirea), 72°C – 3 min (sinteza), supus la 35 de cicluri, denaturând în prealabil ADN-ul timp de 5 minute la temperatura 94°C.

Exonii au fost investigaţi prin metoda RPL multiplexă în două "puncte fierbinţi" din gena distrofinei: exonii 43, 44, 45, 47, 48, 50, 52, 60 din regiunea 3' şi exonii 3, 8, 13, 17, 19 din regiunea 5'.

După terminarea RPL, specificul amplificării şi cantitatea amplificatului se verifica prin electroforeză. Se consideră că amplificarea este reuşită, dacă în zona corespunzătoare masei moleculare există o bandă vizibilă iar în altă zonă a gelului, asociată cu localizarea nespecifică a praimerilor, dungile lipsesc.

A fost perfectată o propunere de raţionalizare privind condiţiile de efectuare a RPLM.

Efectuarea testului PLFR în familiile cu DMP Duchenne

Analiza înlănţuirii (testul PLFR) a fost efectuată asupra trei saituri polimorfe intragenice: pERT 87-8/Tag1, 16 intron/Tag1, pERT87-15/ BamH1 la toţi membrii familiei.

a) Efectuarea RPL

Amplificarea s-a efectuat pentru polimorfismul pERT87-8/Tag1 după metoda lui Cogan, modificată pentru aparatul Techne Thermal Cycler PHC - 1A (Marea Britanie) care permite programarea termociclurilor.

Deoarece testul PLFR s-a efectuat prin metoda RPL, au fost utilizați praimerii specifici cu următoarea consecutivitate:

Pm1: GTC AGT TGG TCA GTA AAA GCC-3'

Pm2: CCA ATT AAA ACC ACA GCA G -3'

La investigarea saitului pERT87-15 al genei DMP Duchenne s-a utilizat restrictaza BamH1 iar la RPL au fost utilizați praimerii cu consecutivitatea specifică:

Pm1: CAG TAA CCG AAA GTG-3'

Pm2: ATA ATT CTG AAT AGT CAC AAA AAG-3'

La investigarea locusului 16 intron al genei DMP Duchenne s-a utilizat restrictaza Tag1 iar la RPL au fost utilizați praimerii cu consecutivitatea specifică descrisă de Chamberlain pentru exonul 17 în reacția RPLM.

Praimerii oligonucleotidici au fost sintetizați la AŞP 'Enzim' (Lituania).

1 mcl mostră de ADN genomic supus investigării se adaugă la 24 mcl compoziție (16.6 mM sulfat de amoniu; 67 mM tris HCl pH 8,8; 6,7 mM clorură de magneziu; 10 mM 2-mercaptoetanol; 6,7 mM EDTA; 0,17 mg/ml albumină serică bovină; 1 mM de fiecare dNTP; 1,25 un. de activitate ADN polimerază Thermus thermophilis şi câte 1 unitate optică de fiecare oligopraimer).

Compoziția se prepară reieşind din numărul probelor, iar apoi la fiecare 1 mcl probă-ADN se adaugă câte 24 mcl compoziție.

Amplificarea sectorului ADN pentru evidențierea saitului restricțional pERT87-8/Tag1 şi 16 intron/Tag1 s-a efectuat în următorul regim: 94°C - 0,5 min. (denaturarea), 58°C - 1,0 min. (călirea), 72°C – 1,0 min (sinteza), supus la 35 de cicluri, denaturând în prealabil ADN-ul.

Amplificarea sectorului ADN pentru evidențierea saitului restricțional pERT87-15/BamH1 s-a efectuat în următorul regim: 94°C - 0,5 min. (denaturarea), 55°C - 1,0 min. (călirea), 72°C – 1,0 min (sinteza), supus la 35 de cicluri, denaturând în prealabil ADN-ul.

A fost perfectată o propunere de raționalizare privind modificarea condițiilor de efectuare a testului PLFR.

După terminarea RPL, specificul amplificării şi cantitatea amplificatului se verifica prin electroforeză.

b) Restricția fragmentelor RPL cu endonucleazele Tag1 şi BamH1

Numărul mare de fragmente ADN obținute se prelucrau cu restrictaza corespunzătoare (Tag1, BamH1). Endonucleazele au fost sintetizate de către firma "Promega" (SUA) şi erau prevăzute cu descrierile condițiilor optime de reacție.

Restricția fragmentelor ADN amplificate s-a efectuat în conformitate cu recomandările firmei producătoare.

La 12 mcl amplificat se adăugau 2 mcl soluție tampon corespunzătoare de concentrație înzecită şi se amesteca. Apoi, se adăuga 1 unitate optică restrictază şi compoziția obținută se incuba la temperatura 65°C pe intervalul necesar de timp. După terminarea

incubării, mostrele se analizau, introducându-le în soluție 7,5% PAAG, utilizând colorantul.

Efectuarea electroforezei şi vizualizarea rezultatelor

Separarea produselor amplificării s-a efectuat în soluția PAAG la aparatul pentru electroforeză verticală cu lungimea sticlei de 15-25 cm şi la dispozitivul "Serva Flectrophoresis GMH" (Germania).

Independență de mărimea fragmentelor se selecta gelul necesar. În investigația dată s-a utilizat gelul poliacrilamidic de 5% şi 7.5%. Noi am preparat gelul poliacrilamidic după metodica propusă de T.Maniatis, modificata de noi pentru condițiile noastre.

Pentru vizualizarea datelor, gelul era privit în raze ultraviolete refractate la transiluminatorul LCB (Marea Britanie), cu fotografierea ulterioară pe pelicula fotografică "Micrat-200"

Metodele de evaluare statistică a rezultatelor explorării

Datele investigațiilor au fost prelucrate computerizat prin metodele de analiză variațională şi discriminantă.

Dependența statistică dintre parametrii calitativi s-au prezentat prin tabele de contingență, iar pentru verificarea ipotezei de independență a liniilor şi coloanelor s-a folosit criteriul "X^2".

Veridicitatea diferențelor dintre valorile medii al parametrilor studiați în diferite grupe s-a determinat folosind t criteriu Student. Informativitatea parametrilor studiați pentru diagnosticul diferențial s-a efectuat folosind analiza discriminantă pas cu pas. Metoda de analiză discriminantă fiind parte integrată din teoria metodelor matematice de identificare a imaginilor prin analiza retrospectivă poate apoi imagina reperele prognostice decisive. Analiza discriminată (1) constă în elaborarea unui set de funcții Fj ale vectorului X:

$$F_j = \sum_{i=1}^{n} A_{ij} \cdot x_i + b_j$$

j - numărul funcției discriminante (de la 1 la k)

i – numărul componenței vectorului X (de la 1 la n)

n – cifra componentelor, constituante ale vectorului X_i

A_{ij} – coeficientul ponderal la valorile vectorului X

b_j – constante libere

Observația se va referi la grupul de bolnavi, valoarea funcției, pentru care este mai mare. Informativitatea fiecărei componente ale vectorului X se determină prin calcularea criteriului statistic F- Fischer.

Pentru determinarea veridicității frecvențelor alelelor a fost utilizat criteriul lui Pirson – X2. Evaluarea veridicității s-a efectuat după tabelele general acceptate. Corelația diferitor alele precum şi homo- şi heterozigoților după polimorfismele pERT87-8/Tag1, pERT87-15/BamH1 şi 16 intron/Tag1 în populații s-a calculat după formula lui Hardy-Wainberg (p+2pq+q).

PARTICULARITĂȚILE MANIFESTĂRILOR CLINICE ÎN DMP

Studiul a fost efectuat pe un lot de 130 bolnavi cu diferite forme de DMP. Din lotul dat 112 constituiau băieți (86,2%) şi 18 fete (13,8%). După cum se vede predominanța este masculină ce se explică prin faptul că lotul principal îl constituiau bolnavii cu DMP Duchenne (60,8%), ce are o transmitere genetică legată de sex şi afectează exclusiv băieții.

Vârsta debutului al maladiei se situa între 1 şi 17 ani cu o exacerbare la 3 ani -26%. Fenomenul dat iarăşi se explică prin faptul că majoritatea copiilor era cu diagnosticul de DMP Duchenne, iar vârsta de 3-4 ani este vârsta caracteristica pentru debut al maladiei date.

Examenul general la pacienții din toate loturile studiate a revelat că hipotrofia facială moderată s-a remarcat la 25 de pacienți (19,2%) iar hipotrofia facială marcată numai la 6 pacienți (4,6%). Hipotrofia musculară moderată s-a depistat la 81 pacienți (62,3%), iar hipotrofia musculară pronunțată la 28 de pacienți (21,5%). Pseudohipertrofia musculaturii gambei moderată s-a vizualizat la 27 pacienți (20,8%) şi pseudohipertrofia pronunțată la 63 pacienți (48,5%). Modificările scheletice mai frecvent se prezintă sub forma de hiperlordoză lombară - 102 pacienți (72,5%), *scapulae alatae* – 114 pacienți (87,7%), contracturi talo-crurale la 122 pacienți (93,8%).

Deficitul muscular s-a cuantificat după caracterul mersului şi gradul de rezistență la exerciții repetate: urcarea scărilor, mişcări repetate ale mâinilor împotriva rezistenței, ridicare din şezute. Aşa dar mersul legănat s-a remarcat la 103 pacienți (79,2%), iar 17 pacienți (13,1%) erau complect imobilizați la pat. Urcarea scărilor era dificilă la 95 pacienți (73,1%) şi imposibilă pentru 22 pacienți (16,9%).

Evoluarea indicelor clinici pe parcursul maladiei a fost studiată utilizând criteriul χ^2 (tab. 6). Următorii indici clinici au demonstrat o frecvență diferită: caracteristica mersului (χ^2=100, P<0,001), urcarea scărilor (χ^2=152,4, P<0,001), hipotrofia facială (χ^2=27, P<0,001), hipotrofia musculară (χ^2=34,9, P<0,001), prezența pseudohipertrofiilor (χ^2=38,5, P<0,001), contracturi talo-crurale (χ^2=35,5, P<0,001), deformații vertebrale (χ^2=80,6, P<0,001).

Analiza discriminantă "pas cu pas" a indicelor incluşi în studiu în aspect de diferențiere în gradul de evoluție al maladiei au fost selectate următoarele 5 variabile importante în ordine discrescândă: dificultăți la urcarea scărilor, prezența "scapulelor alatae", progresarea hipotrofiei faciale, contracturilor talo-crurale, durata maladie (tab. 7). Particularitățile asocierii acestor 5 indici determină stabilirea corectă a gradului uşor al maladiei în 77,2%, moderat – în 92,5% şi sever – în 96,4%.

Tabelul 8

Evoluția indicelor clinici in diferite entități nosologice

Indicii		Formele maladiei			
		Duchenne n=79 (60,8%)	Becker n=14 (10,8%)	De centură n=25 (19,2%)	FSH n=12 (9,2%)
Sex:	M	100%	100%	48%	58,33%
	F	-	-	52%	41,67%
		χ^2=53,240	P<0,001		
Mersul:	Legănat	87,34%	71,43%	80%	33,33%
	Nu merge	12,66%	14,29%	12%	16,67%
		χ^2=38,917	P<0,001		
Urcarea scărilor:	Cu suport	75,72%	78,57%	76%	41,67
	Imposibilă	17,72%	14,29%	16%	16,67
		χ^2=15,209	P<0,019		
Hipotrofie facială:	Prezentă	17,72%	14,29%	16%	41,67%
	Pronunțată	-	-	-	50%
		χ^2=70,55	P<0,001		
Hipotrofie musculară:	Prezentă	59,49%	64,29%	64%	75%
	Pronunțată	25,325%	7,14%	20%	16,67%
		χ^2=4,298	P<0,636		
Pseudo-hipertrofia:	Prezentă	20,25%	14,29%	36%	0
	Pronunțată	62,03%	85,71%	8%	0
		χ^2=59,391	P<0,001		
Contracturi talo-crurale:	Prezente	11,39%	21,43%	48%	41,67%
	Pronunțate	86,08%	78,57%	52%	8,33%
		χ^2=65,676	P<0,001		
Deformații vertebrale:	Hiperlordoza	83,54%	78,57%	80%	41,67%
	Cifoscolioza	13,92%	-	8%	
		χ^2=35,774	P<0,001		

Analiza selectivă discriminantă "pas cu pas" a tuturor indicilor clinici în aspect de diagnostic, a determinat 9 cei mai informativi (tab 9). Astfel analiza discriminantă, folosind aceste 9 variabile, permite prognozarea diagnosticului DMP Duchenne în 97,4%, DMP Becker în 100%, DMP de centură în 80 %, DMP FSH în 91,6%.

Tabelul 9

Importanța unor indici în efectuarea diagnosticului diferențial

	Duchenne n=79 (60,8%)	Becker n=14 (10,8%)	De centură n=25 (19,2%)	FSH n=12 (9,2%)
1. Hipotrofia facială (%)	17,72	14,29	16	91,67
2. Vârsta de debut (M±m)	3,4±0,148	8,5±0,511	7,7±0,754	9,2±1,296
3. Pseudohipertrofia (%)	82,28	100	44	0
4. Sexul (%) m f	100	100	48 52	58,33 41,67
5. Schimbarea mersului (%)	100	85,72	92	50
6. Reflexele inferioare proximale schimbate (%)	93,67	85,71	100	50
7. Contracturi talo-crurale (%)	97,47	100	100	50
8. Scapulae alatae (%)	94,94	78,57	84	58,33
9. Reflexele inferioare distale (%)	89,88	85,71	80	41,67
Prognoza	97,47%	100%	80%	91,67%

Distrofia Musculară Progresivă Duchenne.

Lotul pacienţilor cu DMP Duchenne a inclus 79 de pacienţi în intervalele de vârstă de la 2 la 17 ani (8,22±0,3). Acest lot de pacienţi a fost constituit doar din băieţi. Apariţia primelor simptoame varia în diapazonul de la 2 la 7 ani (3±0,1). În 31 din cazuri (39%) pacienţii au început a merge după împlinirea vârstei de 1.5 ani. Durata maladiei varia de la 1 la 14 ani (4,8±0,26).

Lotul de pacienţi cu manifestări clinice uşoare a inclus 8 pacienţi în vârstă de 2-8 ani. Durata maladiei varia în limitele de 1-6 ani, în medie 2,6±0,63. Primele semne ale maladiei au apărut până la vârsta de 4 ani (3,25±0,63). În toate cazurile maladia a debutat cu apariţia asteniilor musculare cu o localizare în muşchii proximali ai membrelor, mai evidente fiind în centura pelviană. În toate cazurile în evoluţie apare o lentoare în cursul mersului, care treptat devine legănat. Dificultăţi la urcarea scărilor s-au înregistrat la 3 (37%) bolnavi. Anamnestic părinţii acestor copii au menţionat căderi frecvente, nemotivate. Mersul digitigrad era posibil la toţi 8 bolnavi pe când cel calcigrad era dificiliat la 3 (37,5%) pacienţi din cauza retracţiilor tendonului Achille. Pentru a se ridica de pe podea 6 (75%) pacienţii foloseau manevra Gowers. Examenul general al pacienţilor a evidenţiat hipotrofii musculare ale centurilor la 3 (37,5%) bolnavi, la 6 (75%) pacienţi s-au înregistrat pseudohipertrofia muşchilor gambei, hiperlordoză lombară la 7 bolnavi (87,5%).

Examenul pacienţilor nu a depistat patologie neurologică cerebrală de focar. Studiul reflexelor a decelat hiporeflexie cubitală la 7 din 8 pacienţi, hiporeflexie radio-carpiană la 5 (62,5%) pacienţi. Reflexele patelare erau abolite la 3 (37,5%) şi diminuate la 3 (37,5%) cazuri. Se depista o hiporeflexie achiliană la 6 (75%) pacienţi. Reflexe patologice, dereglări senzitive sau coordonatorii nu au fost constatate în lotul de pacienţi examinaţi. Ca exemplu poate servi următorul caz clinic (cazul clinic ą 118).

Pacientul D., *cazul clinic №118, vârsta pacientului - 7 ani. Internat în secţia de neurologie ICŞOSMşiC. Acuze: schimbarea mersului - mers lent, legănat, căderi nemotivate, astenie musculară.*

Anamneza vieţii. *Analiza arborelui genetic a revelat că fratele mamei, 3 unchi şi 4 verişori toţi de sex masculin au fost bolnavi şi au decedat de o maladie asemănătoare (fig.5). Acţiunea factorilor nocivi profesionali şi ecologici nu a fost depistată. Copilul născut de la prima sarcină, ce a decurs fără patologie. La naştere greutatea - 3400 g, lungimea - 52 cm. Mersul autonom de la vârsta de un an.*

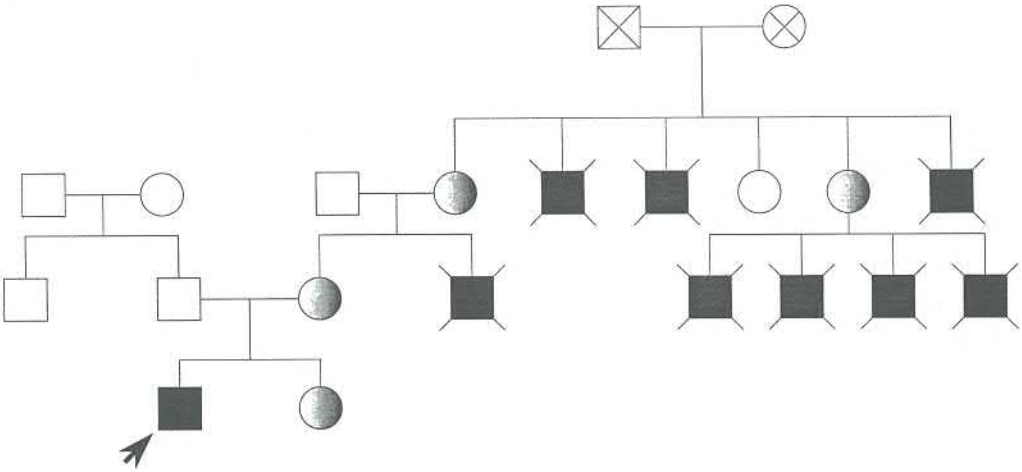


Fig. 5. Arborele genetic al pacientului D. (caz clinic № 118)

Anamneza maladiei. *Primele semne al maladiei au apărut la vârsta de 3 ani, când pentru prima dată părinții au observat schimbarea mersului, ce purta un caracter legănat, dificultăți la alergare. Se produceau căderi frecvente, nemotivate, deficit de forță, preponderent în mușchii centurii pelviene. Maladia avea un caracter lent progresiv.*

Statusul neurologic. *Nervii cranieni în limitele normei. Mișcările în membrele inferioare și superioare în volum deplin. Tonusul muscular: hipotonie difuză cu o preponderență în porțiunile proximale ale membrelor inferioare (fig.6), scapulae alatae (bilaterale. Deformații ale coloanei vertebrale slab pronunțate sub forma de hiperlordoză lombară.*

Reflexele osteo-tendinoase: bicipitale, tricipitale, carpo-radiale, patelare – abolite; achiliene - diminuate. Reflexe patologice nu s-au depistat. Dereglări senzoriale nu au fost decelate.

Mersul legănat, posibil digitigrad dificil calcigrad . Ridicarea din șezute fără suport.

Forța musculară: în membrele superioare - 6 puncte, în membrele inferioare - 5 puncte.

Examenul paraclinic și de laborator:

EMG cu electrod ac: mm. triceps sural, tibialis anterior, biceps. Concluzie: modificările potențialului unității motorii poartă un caracter evident miogenic, cu prezența de descărcări spontane pseudomiotonice.Analiza creatinfosfokinazei: ridicarea valorilor CFK până la 9502 U/l, la mamă 2005 U/l (în normă până la 200 U/l).

Studiul histologic al bioptatului muscular: fibrele musculare de dimensiuni diferite, descompuse în blocuri mici. Se vizualizează centre de regenerare cu formarea celulelor cu nuclee gigante. Pe alocuri fibrele

musculare sunt lipsite de striații şi nuclee. Concluzia: semnele histologice sunt caracteristice pentru distrofie musculară primară, stadiul de debut.

Diagnosticul: *DMP Duchenne, transmitere genetică legată de sex, debut în copilăria precoce, tetrapareză proximală flască mai pronunțată în membrele inferioare, evoluție lent progresivă, dereglări locomotorii uşoare.*

Lotul pacienților cu dereglări locomotorii moderat pronunțate includea 56 de copii, toți băieți, inclusiv: 13 aveau vârsta între 2 – 6 ani, 23 – între 7-8 ani şi 21 – între 9-14 ani. Debutul maladiei în 39 de cazuri a avut loc la vârsta de 3-4 ani, în 14 cazuri - până la 3 ani şi numai în 6 cazuri - după 4 ani. Durata maladiei varia de la 1 la 9 ani, în medie 4,46±0,22. La toți pacienții mersul era legănat, la urcarea scărilor toți aveau nevoie de suport, ridicarea din şezute era posibilă numai cu aplicarea manevrei Gowers.

Examenul general a evidențiat hipotrofie musculară. Paralel la 53 (93%) bolnavi era prezentă pseudohipertrofia muşchilor gastrocnemieni. Astenia musculară a cauzat dificultăți la deplasare şi necesitatea suportului (însoțitor sau baston) în 28 (50%) cazuri. Mersul digitigrad era posibil la toți pacienții, cel calcigrad – doar în 1 caz (1,7%), în 9 (16%) cazuri retracțiile tendinoase erau foarte pronunțate şi mersul era posibil numai pe vârful degetelor. Procesul patologic în evoluție implica musculatura tronculară, ceea ce condiționa apariția dereglărilor de statică sub formă de hiperlordoză lombară la 55 (96,6%) de pacienți, la 7 (12,5%) din ei manifestările date erau grav pronunțate (scolioză, cifoscolioză). Implicarea în procesul patologic a muşchilor centurii scapulare a dus la apariția fenomenului de "*scapulae alatae*" care era prezent la 56 (98,8%) bolnavi.

Examenul neurologic nu a evidențiat simptomatologie cerebrală de focar. S-au constatat însă deosebiri certe în starea funcțiilor motorii comparativ cu pacienții din lotul precedent. Reflexele cubitale în 22 (38,5%) din cazuri erau absente şi în 27 (48,2%)- diminuate, cele redio-carpiene în 16 (28,5%) cazuri erau absente şi în 25 (44,6%)- diminuate. Tendința de extindere descendentă a procesului patologic este confirmată şi de rezultatele examinării reflexelor pe membrele inferioare: areflexie patelară - în 47 (82,3%), achiliană - în 21 (35,9%) cazuri şi hiporeflexie patelară în 7 (12,5%), achiliană în 29 (51,7%) cazuri.

Tulburări senzitive nu au fost constatate. Dereglări de coordonare a mişcărilor nu au fost decelate, cu excepția instabilității uşoare în poziția Romberg, fapt, ce poate fi explicat prin prezența dereglărilor statice. Menținerea echilibrului presupunea prezența unei poze forțate, cu o distanțare a picioarelor. Ca exemplu poate servi următorul caz clinic (cazul clinic №10).

Pacientul B. *Cazul clinic №10, varsta pacientului 6 ani. Internat în secția de neurologie ICŞOSMşiC. Acuze: schimbarea mersului - mers lent, legănat, căderi nemotivate, fatigabilitate musculară, dificultăți la fugă şi la urcarea scărilor.*

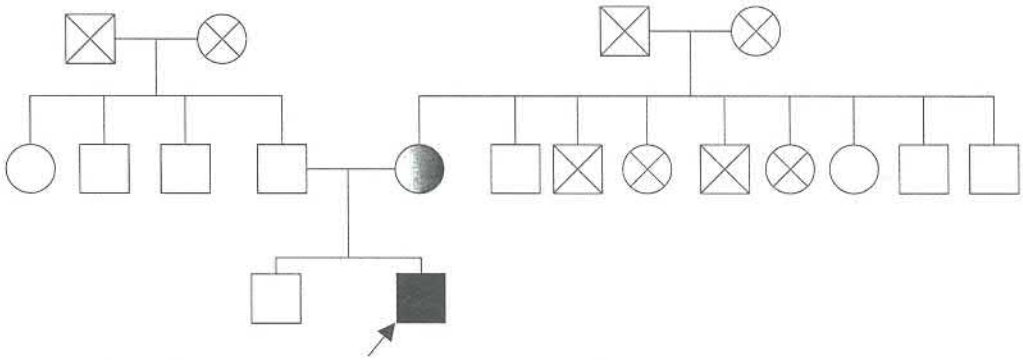


Fig. 7. Arborele genetic al pacientului B. (caz clinic № 10)

Anamneza vieții. *Analiza arborelui genetic exclude prezența unei patologii similare în pedigree (fig. 7). Acțiunea factorilor nocivi profesionali şi ecologici nu a fost depistată. Copilul e născut de la sarcina a doua, ce a decurs fără patologie. Ponderea la naştere 3400 g, cu o lungime de 53 cm. Mersul autonom de la vârsta de un an.*

Anamneza maladiei. *Primele semne ale maladiei au apărut la vârsta de 1,5 ani, când pentru prima dată părinții au observat schimbarea mersului, ce purta un caracter legănat, copilul nu alerga. De la vârsta de 3 ani se constată dificultatea de a urca scările, căderi frecvente. Maladia poartă un caracter progresiv.*

Statusul neurologic. *Funcția nervilor cranieni în limitele normei. Mişcările în membrele inferioare şi superioare în deplin volum. Tonusul muscular: hipotonie difuză cu o preponderență în porțiunile proximale ale membrelor inferioare. Pseudohipertrofia muşchilor gastrocnemieni bilateral moderat pronunțată, "scapulae alatae" bilateral. Modificări scheletice - aplatisarea lordozei lombare.*

Forța musculară: în membrele superioare scăzută până la 4 grade, în membrele inferioare până la 3 grade.

Reflexele osteo-tendinoase: bicipitale - atenuate, tricipitale, carporadiale, patelare, achiliene - abolite. Reflexe patologice nu s-au surprins. Dereglări senzoriale nu au fost constatate.

Mersul legănat, posibil digitigrad (fig.8). Semnele miopatice (manevra Gowers) (fig. 9).

Examenul paraclinic şi de laborator:

EMG. cu electrod ac au fost cercetate m. biceps al brațului drept, m. interosseul dorsal stâng, m. rectus femoris drept, m. gastrocnemian stâng. Parametrii potențialelor motorii sunt diminuați ca amplitudine, e

crescut procentul de polifazie al lor şi sunt prezente rafale pseudomiotonice, fapt care reflectă provenienţa primar musculară a modificărilor

Analiza creatinfosfokinazei: ridicarea valorilor CFK până la 26128 U/l, la mamă 1160 U/l (în norma până la 200 U/l).

Studiul histologic al bioptatului muscular: Fibrele musculare se colorează neuniform, au diferite dimensiuni. Pe alocuri atrofiate, se observă focare de proliferare a ţesutului conjunctiv şi adipos. Schimbările vasculare sunt manifestate prin îngustarea moderată a lumenului vascular. Concluzie: semne de DMP primară, moderat pronunţate.

***Diagnosticul**: DMP Duchenne, transmitere legată de sex, debut în copilăria precoce, tetrapareză proximală flască mai pronunţată în membrele inferioare, evoluţie progresivă, dereglări locomotorii moderat pronunţate.*

Lotul cu manifestări motorii severe includea 14 bolnavi, cu vârsta în limitele de 8-17 ani. Debutul în 11 cazuri era între 3-4 ani şi în 3 cazuri - după 4 ani (vârsta medie de debut 3,79±0,29). Durata maladiei varia de la 5 la 14 ani, în medie 7,71±0,68.

Dereglările motorii erau extrem de grave; mersul în 10 (71,4%) cazuri era imposibil, iar în 6 (42,8%) cazuri se efectua numai cu ajutorul suportului acordat de alte persoane sau cu căruciorul. Ridicarea de pe podea era imposibilă la toţi pacienţi din lotul dat, iar de pe scaun 2 pacienţi (20 %) se ridicau cu suport suplimentar. La toţi bolnavii din acest lot se constatau atrofii musculare ale membrelor şi trunchiului, în unele cazuri se evidenţia hipotrofia musculaturii faciale. Pseudohipertrofiile erau slab pronunţate şi s-au decelat doar în 3 (33%) cazuri, însă în restul cazurilor musculatura gambei păstra încă un caracter dur, caracteristic pseudohipertrofiilor.

Schimbările musculare menţionate cauzau modificări scheletice corespunzătoare. Pe fond de atrofie musculară se constatau contracturi severe, care pe lângă articulaţiile talo-crurale, implicau şi articulaţiile genunchilor şi cubitale. Astenia musculaturii trunculare cauza apariţia şi evoluţia deformaţiilor vertebrale de tipul hiperlordozei şi chifoscoliozei. La toţi pacienţii era prezent fenomenul de "*scapulae alatae*".

Dereglări ale funcţiilor musculaturii masticatorii au fost evidenţiate la 4 (28,6%) pacienţi şi se caracterizau prin dificultăţi de masticaţie şi deglutiţie.

În 13 (92,8%) cazuri s-a depistat areflexie cubitală şi radio-carpiană. În toate cazurile s-a observat areflexie patelară şi în 12 (85,7%) - achiliană.

Dereglări neurologice de focar (senzitive, cerebeloase) nu au fost depistate. Ca exemplu poate fi prezentat următorul caz clinic (cazul clinic №34).

***Pacientul I.**, cazul clinic №34, 9 ani. Internat in secţia de neurologie ICŞOSMşiC cu acuze la fatigabilitate musculară severă, imposibilitatea deplasării şi deservirii autonome, contracturi flexorii în articulaţiile cubitale, patelare, retracţii ale tendonului Achille.*

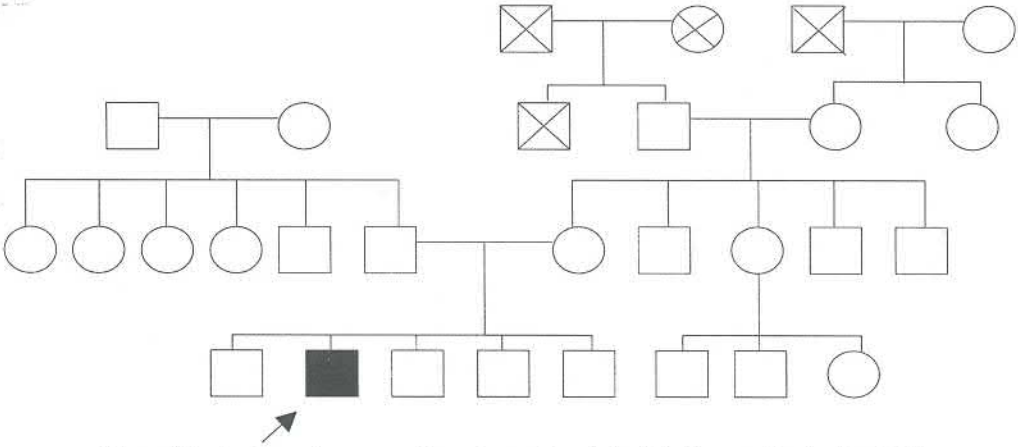


Fig. 10. Arborele genetic al pacientului I. (caz clinic № 34)

Anamneza vieții. *Analiza arborelui genetic nu a depistat maladii similare sau prezența semnelor clinice asemănătoare la alți membri ai familiei (fig.10). Acțiunea factorilor nocivi profesionali şi ecologici nu a fost depistată. Copilul de la sarcina a 2-a, sarcina a decurs pe fond de gestoză tardivă. Naşterea în termen. Ponderea la naştere 3200 g, lungimea 50 cm. Perioadă postnatală fără deosebiri. Mersul autonom de la vârsta de 1,8 ani.*

Anamneza maladiei. *Primele semne ale maladiei au apărut la vârsta de 4 ani, când pentru prima dată părinții au observat schimbarea mersului. La vârsta de 7 ani acuza dureri în picioare, dificultăți la urcarea scărilor, căderi frecvente. Progresiv se schimba mersul, forma piciorului, apare o tendință spre un mers digitigrad. Treptat se instalează amiotrofii proximale, predominant la centura pelviană, se accentuează lordoza lombară, retracțiile tendinoase inițial talocrurale, ulterior la genunchi şi coate. Deficitul de forță musculară este din ce în ce mai evident. La vârsta de 8 ani bolnavul este imobilizat.*

Statusul neurologic. *Nervii cranieni în limitele normei. Se evidențiază atonie şi slăbiciuni musculare în porțiunile distale şi proximale ale membrelor superioare şi inferioare, atrofia musculaturii centurilor pelviene şi scapulare. Deformații scheletale: hiperlordoza lombară cu accentuare în poziția şezândă, scolioză, scapulae alatae (fig. 11). La examinarea tuturor reflexelor osteo-tendinoase se constată areflexie. Reflexe patologice nu s-au depistat.*

Se menționează deficit motor grav (mersul şi ortostatismul imposibile), ridicarea din decubit dorsal în poziție şezândă posibilă cu ajutorul altor persoane. Retracții tendinoase talo-crurale, în genunchi şi coate.

Forța musculară: în membrele superioare forța scăzută până la 2 grade, în membrele inferioare până la 1 grad.

Examenul paraclinic şi de laborator.

EMG: cu electrod ac: mm. biceps al braţului drept, rectus femoris drept, gastrocnemian stâng. Parametrii potenţialelor unităţilor motorii sunt diminuaţi în amplitudine, evident e crescut procentul de polifazie al lor, fapt care sugerează originea primar musculară a modificărilor depistate.

Analiza creatinfosfokinazei: ridicarea valorilor CFK până la 12664 U/l (în norma până la 200 U/l).

Studiul histologic al bioptatului muscular. Ţesutul muscular se colorează neuniform. Fibrele musculare sunt de dimensiuni diferite, se depistează focare de clivaj. Unele din ele sunt în stare de fragmentare, altele înlocuite cu ţesut conjunctiv şi adipos care formează suprafeţe destul de extinse. Procesul de regenerare minimal pronunţat. Schimbări vasculare sub forma de îngroşare a peretelui vascular cu îngustarea lumenului vaselor până al obliterarea completă a lui. Concluzie. Semne de DMP primară, stadiu avansat.

***Diagnosticul**: DMP Duchenne, cu debut în copilărie, tetrapareză flască, proximală, evoluţie progresivă, dereglări locomotorii grave.*

Distrofia Musculară Progresivă Becker.

Lotul pacienţilor cu DMP Becker a inclus 14 pacienţi de sex masculin, în intervale de vârstă între 8 şi 26 de ani (15,1±1,5). Primele semne ale maladiei au apărut la vârsta de 6-9 ani (8,5±0,5). Durata maladiei la momentul examinării de la 1 an la 18 ani (6,6±1,5).

Manifestări clinice uşoare au fost apreciate la un grup de 4 pacienţi în vârsta de 8-11 ani. Debutul bolii s-a constatat la vârsta de 6-10 ani (7,75±0,85). Durata maladiei varia de la 1 la 4 ani, în medie 2±0,7 ani. Tabloul clinic s-a manifestat printr-un deficit motoriu uşor şi alterarea musculaturii proximale.

La momentul examinării s-au evidenţiat amiotrofii musculare la 3 pacienţi şi pseudohipertrofii bilaterale ale muşchiului triceps sural la toţi 4 pacienţi. În 2 cazuri mersul pacienţilor era uşor legănat, în toate cazurile posibil digitigrad şi dificil calcigrad în 3 cazuri (ca rezultatul retracţiei tendonului Achille). Dificultăţi la ridicarea din şezute s-au depistat la unul din pacienţi (25%). Hiperlordoză lombară se depista în 2 cazuri, "*scapulae alatae*" - într-un caz. Reflexele osteo-tendinoase: abolite – cele cubitale şi patelare într-un caz; diminuate – cubitale într-un caz (25%), radiocarpiene - în 2 cazuri, patelare şi achiliene - în 3 cazuri (75%).

Lotul pacienţilor cu dereglări locomotorii moderat pronunţate a inclus 7 băieţi în intervalul de vârsta 12-16 ani. Debutul maladiei a fost în intervalul de la 6 la 12 ani (9±0,79). Vechimea maladiei era de 3-8 ani, în mediu 5,14±0,63.

Simptomatologia de debut se manifesta prin deficit motoriu cu antrenare în proces a musculaturii preponderent proximale, predilecție - a celei pelviene.

Mersul la toți bolnavii era încet, purta un caracter legănat. Prezentau astenii la urcarea scărilor (100%) şi la alergare. Bolnavii acuzau căderi frecvente, nemotivate, la ridicarea din şezute toți pacienții foloseau manevra Gowers. În procesul de evoluție a maladiei sa constatat amiotrofii (71%) de gravitate variată, cu caracter lent progresiv. Pe acest fond se evidenția pseudohipertrofia muşchilor triceps surali (85%), care aveau o consistență sporită dură. Apăreau retracții tendinoase, mai frecvente talo-crurale (85%), ceea ce impunea un mers digitigrad (28%). Se accentua lordoza lombară (85%). Implicarea în procesul patologic a musculaturii centurii scapulare se manifesta prin apariția de "*scapulae alatae*" (100%).

Tulburări de funcție a nervilor cranieni nu au fost depistate. Reflexe osteo-tendinoase: cubitale în 4 cazuri (57,1%) - abolite, în 3 (42,9%) - atenuate; radio-carpiene abolite - în 2 cazuri (28,5%), diminuate - în 4 cazuri (57,14%); patelare - abolite - în 5 cazuri (71,42%), diminuate – 1 caz; reflexele achiliene abolite - în 4 cazuri (57,1%), diminuate - în 3 cazuri (42,9%).

Dereglări senzitive şi cerebeloase nu au fost depistate. Ca exemplu poate servi următorul caz clinic (cazul clinic № 28).

Pacientul R., *№ 28, 13 ani, a fost internat in secția de neurologie ICŞOSMşiC cu acuze de schimbare a mersului, astenie musculară preponderent proximală, dificultăți la urcarea scărilor.*

Anamneza vieții. *Analiza arborelui genetic: un unchi şi un verişor pe linia mamei suferă de o maladie asemănătoare (fig. 12). Acțiunea factorilor nocivi profesionali şi ecologici nu a fost depistată. Copilul de la sarcina 2, sarcina a decurs normal. Naşterea în termen, fără complicații. Ponderea la naştere 3700 g, lungimea 55 cm. Perioadă postnatală fără deosebiri, mersul autonom de la vârsta de 9 luni.*

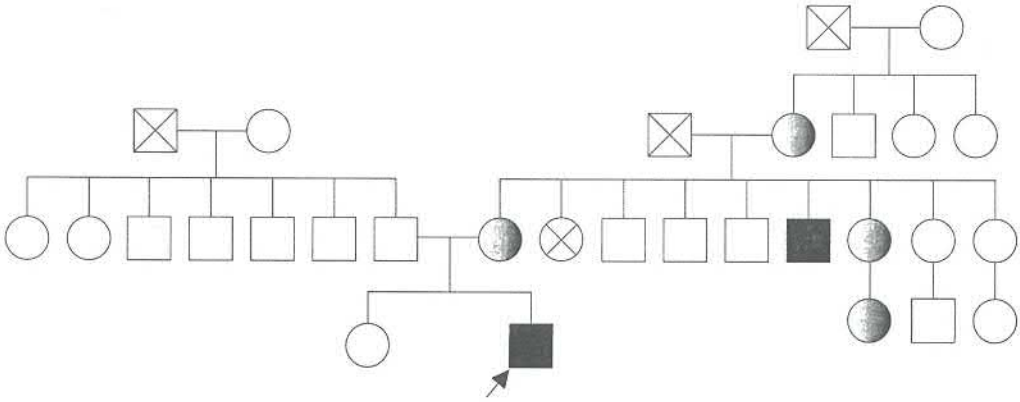


Fig. 12. Arborele genetic al pacientului R. (caz clinic № 28).

Anamneza maladiei. *Primele semne ale maladiei au apărut la vârsta de 10 ani, când pentru prima dată părinții au menționat schimbarea mersului. La vârsta de 12 ani s-au observat dificultăți la urcarea scărilor, împiedicări frecvente, nemotovate. Progresiv se schimba mersul. Maladia avea o evoluție lentă.*

Statusul neurologic. *Nervii cranieni în limitele normei. Mişcările în membrele inferioare şi superioare în volum deplin. Hipotonie musculară mai pronunțată în porțiunile distale ale membrelor. Hipotrofii proximale, pseudohipertrofia muşchilor gastrocnemieni, "scapulae alatae" (fig. 13).*

Forța musculară scăzută: în membrele superioare până la 5 grade, în membrele inferioare până la 4 grade.

Reflexele osteo-tendinoase: bicipitale, tricipitale, carpo - radiale abolite, patelare şi achiliene atenuate. Reflexe patologice nu s-au surprins.

Mers legănat, pe baza de susținere lărgită, posibil digitigrad şi calcigrad. Semnele miopatice (manevra Gowers) la ridicarea din şezute.

Examenul paraclinic şi de laborator.

EMG: cu electrod ac au fost cercetate mm. biceps al brațului, rectus femoris, gastrocnemian. Parametrii potențialelor motorii sunt diminuați ca amplitudine, e crescut procentul de polifazie fapt care reflectă provenienta primar musculară a modificărilor depistate.

Analiza creatinfosfokinazei: ridicarea valorilor CFK până la 1394 U/l, la mamă 636 U/l, la tată 130 U/l, la soră 356 U/l (în normă până la 200 U/l).

Studiul histologic al bioptatului muscular. Modificările musculare pronunțate. Fibrele musculare inegale, pe alocuri atrofiate şi înlocuite cu țesut conjunctiv şi adipos. Schimbări vasculare manifestate prin îngustarea moderată a lumenului vascular. Concluzia: semne manifestate de DMP primară, moderat pronunțate.

Diagnosticul*: DMP Becker, transmitere genetică legată de sex, debut în vârsta juvenilă, tetrapareza flască proximală mai pronunțată în membrele inferioare, evoluție progresivă, dereglări locomotorii moderat pronunțate.*

Lotul pacienților cu manifestări clinice severe a inclus 3 pacienți de sex masculin, intervalele de vârsta fiind de 24-26 ani. Maladia a debutat în jurul vârstei de 6-10 ani (8,33±1,2). Vechimea varia de la 15 la 18 ani, în medie 16,3±0,88. Simptomatologia de debut a maladiei a fost tipică: apariția fatigabilității preponderent în musculatura pelviană cu mers lent, mers legănat, dificultăți la urcarea scărilor şi alergare, ridicarea din şezute cu ajutorul manevrei Gowers.

La momentul examinării doi din pacienți erau imobilizați, deplasarea era posibilă numai cu ajutorul căruciorului. Da fiind că, centurii scapulare

erau mai puțin implicați în procesul distrofic, bolnavii aveau manualitatea relativ conservată. Un pacient se deplasa autonom pe o distanță scurtă, pentru urcarea scărilor necesita suportul altor persoane, din şezute nu se ridica, pentru ridicarea de pe scaun utiliza mişcări suplimentare.

La toți bolnavii erau pronunțate pseudohipertrofia muşchilor gastrocnemieni pe fond de hipotrofie a altor grupuri musculare. Muşchii erau indolori, fără fasciculații. Retracțiile tendoanelor talo-crurale erau pronunțate în 100% din cazuri. Din cauza dereglărilor de statică şi dinamică corporală se accentuează lordoza lombară (100%). Ca urmare a răspândirii procesului distrofic pe muşchii centurii scapulare la toți pacienții se constată semnul de "*scapulae alatae*". Reflexele în 2 cazuri erau abolite atât pe membrele inferioare cât şi pe membrele superioare. Un pacient prezenta normoreflexie osteo-tendinoasă.

În lotul analizat nu au fost constatate dereglări sensoriale şi cerebelare sau de funcție a musculaturii inervate de nervii cranieni.

Distrofia Musculară Progresivă de Centură.

Acest lot a inclus 25 pacienți, inclusiv 12 băieți şi 13 fete. Intervalul de vârsta era de la 2 la 25 de ani (13,1±1,04). Vârsta apariției primelor semne era foarte variabilă şi cuprindea un interval de la 2 la 14 ani (7,7±0,75). Durata maladiei la momentul examinării era între 1-12 ani (5,4±0,62).

Lotul de pacienți cu dereglări motorii uşoare a inclus 6 bolnavi (2 fete şi 4 băieți) în vârsta de 2 - 17 ani. Debutul maladiei s-a constatat în intervalul de 2-12 ani (5,2±1,8). Vechimea maladiei era de la 1 la 5 ani, în mediu 2,6±0,8.

Într-un caz (16%) maladia a debutat cu apariția asteniilor musculare în centura scapulară. În restul (83%) cazurilor primele semne de boală s-au manifestat prin apariția slăbiciunilor în centura pelviană.

În cazul cu debut al maladiei în centura scapulară, examenul obiectiv nu a depistat manifestări de dereglare a mersului. Pacienta se deplasa, urca scările, se ridica din şezute fără a efectua mişcări suplimentare. Examenul neurologic a revelat modificări pseudohipertrofice în tricepşii surali, dar nu au fost evidențiate hipotrofii musculare. Mersul digitigrad era posibil, însă dificil calcigrad. Reflexele osteo-tendinoase: diminuate de pe membrele superioare, reflexul patelar abolit şi cel achilian conservat.

În cazurile cu debut în centura pelviană se evidenția schimbarea mersului care era legănat, posibil digitigrad şi dificil calcigrad. Ridicarea din şezute era posibilă cu mişcări suplimentare, urcarea scărilor cu sprijin în 4 cazuri. Hipotrofia musculară şi "*scapulae alatae*" s-au depistat la 4 pacienți. În cazurile date pseudohipertrofia musculaturii gastrocnemiene

a fost prezentă la 4 pacienți. La examinarea reflexelor osteo-tendinoase – cele cubitale diminuate - în 5 cazuri, radio-carpiene - în 3 cazuri. Reflexele de pe membrele inferioare: patelare abolite - în 3 cazuri, în rest - diminuate, achiliene în 3 cazuri - diminuate.

Loturi de pacienți cu dereglări motorii moderat pronunțate a inclus 12 bolnavi: 7 fete şi 5 băieți. Limitele vârstei erau de la 6 la 20 de ani. La 7 pacienți (58,4 %) debutul maladiei s-a produs în prima decadă a vieții, în restul cazurilor 41, 6% debutul s-a situat între vârsta de 11 şi 13 ani. Vechimea maladiei era de la 2 la 8 ani, în medie 4,8±0,85 ani.

În majoritatea cazurilor (72 %) maladia a debutat cu slăbiciuni în centura pelviană, însă la momentul examinării s-au depistat semne de implicare a ambelor centuri.

La toți pacienții mersul era legănat şi la urcarea scărilor toți aveau nevoie de sprijin, ridicarea din şezute cu ajutorul manevrei Gowers (100%). Examenul obiectiv a revelat hipotrofie musculară la 9 pacienți (82%). Pseudohipertrofia musculaturii gambelor era prezentă în 5 cazuri (41,6%). Modificări scheletice de tipul hiperlordozei lombare au fost constatate în 11 cazuri (91,6%), "*scapulae alatae*" - în 10 cazuri (83,3%). La toți pacienții erau prezente contracturile în articulația talo-crurală, ceea ce cauza mers calcigrad dificil în 7 cazuri (58,3%).

Reflexele osteo-tendinoase: cubitale în 5 cazuri (41,7%) - abolite, în 7 - diminuate (58,3%); reflexele carpo-radiale în 4 cazuri (33,4%) - abolite, în 6 (50%) - diminuate; reflexele patelare în 6 cazuri (50%) - abolite şi în restul (50%) - diminuate; reflexele achiliene în 9 cazuri (75%) - diminuate, în 2 cazuri (16,7%) - abolite, în rest - reflexele conservate. Ca exemplu poate servi următorul caz clinic (cazul clinic №12).

***Pacientul C.**, cazul clinic № 12, 16 ani, a fost internat în secția de neurologie SCMU cu acuze de schimbare a mersului, împiedicări frecvente, astenie musculară, mers calcigrad dificil.*

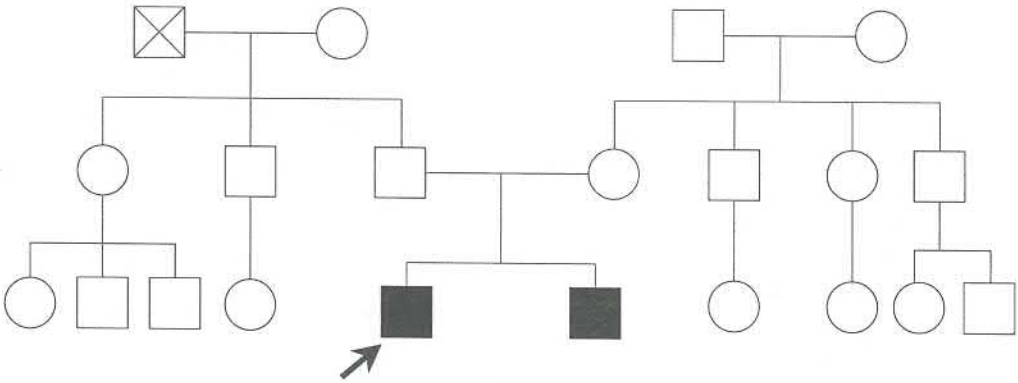


Fig. 14. Arborele genetic al pacientul C. (caz clinic Nr. 12)

Anamneza vieții. *Analiza arborelui genetic: la fratele mai mic sunt prezente semne clinice similare (fig. 14). Acțiunea factorilor nocivi profesionali şi ecologici nu a fost depistată. Copilul de la prima sarcina, gestația normală. Naşterea în termen, fără complicații. Ponderea la naştere 3500 g, lungimea 53 cm. Perioadă postnatală fără deosebiri, mersul autonom de la vârsta de 1 an.*

Anamneza maladiei. *Primele semne ale maladiei au apărut la vârsta de 12 ani, manifestându-se prin modificarea mersului, deficit de forță la membrele inferioare, dificultăți la urcarea scărilor. Progresiv se schimbă mersul, nu mai poate alerga, apare o tendință spre un mers digitigrad. Maladia are un caracter progresant.*

Statusul neurologic. *Nervii cranieni în limitele normei. Mişcările în membrele inferioare şi superioare în volum deplin. Hipotonie şi slăbiciuni musculare, preponderent în porțiunile proximale ale membrelor superioare şi inferioare, hipotrofia musculaturii centurii scapulare.*

Reflexele tendinoase: bicipitale - atenuate, tricipitale, carpo-radiale, patelare, achiliene - abolite. Reflexe patologice nu s-au depistat.

Se evidențiază schimbarea mersului (mers legănat), posibil digitigrad dificil calcigrad. Ridicarea din şezute cu suport adăugător. Deformații scheletice: hiperlordoză lombară, «scapulae alatae», retracția tendonului Achille.

Forța musculară: în mâini 5 puncte, în picioare 4 puncte.

Examenul paraclinic şi de laborator.

EMG: cu electrod ac au fost cercetate mm. tibial anterior şi supraspinatus. Activitate bioelectrică spontană n-a fost înregistrată. Potențialele unităților motorii sunt diminuate în amplitudine, e crescut numărul de potențiale polifazice. Concluzie: manifestările electrofiziologice corespund unei afecțiuni de origine miogenă.

Analiza creatinfosfokinazei: ridicarea valorilor CFK până la 3152 U/l, la frate 5713 U/l, la mamă 330 U/l, la tată 560 U/l (în normă până la 200 U/l).

Studiul histologic al bioptatului muscular. Fibrele musculare sunt de diferite dimensiuni. Pe alocuri se observă focare de clivaj şi necroză cu înlocuirea țesutului muscular cu țesut conjunctiv şi adipos. Concluzia. Semne de DMP primară, moderat pronunțate.

Diagnosticul: *DMP de centură, transmitere genetică autosom recesivă, debut în vârsta juvenilă, tetrapareză flască, proximală, evoluție progresivă, dereglări locomotorii*

Lotul pacienților cu dereglări motorii severe a inclus 7 pacienți între vârstă de 14 şi 25 ani. Maladia a debutat la vârsta de 4-14 ani, media 8±2,1. Durata maladiei era de 5-12 ani, media 8,86±1,61. În toate cazurile maladia a debutat cu slăbiciuni în centura pelviană.

Afectarea musculaturii centuri pelviene determină tulburări de statică vertebrală, manifestate prin hiperlordoză lombară (100%). Examenul clinic neurologic evidenţiază în 2 cazuri un mers legănat, posibil digitigrad, dificil calcigrad, urcarea scărilor cu suportul a altor persoane, ridicarea din şezute cu ajutorul manevrei Gowers. Doi pacienţii erau imobilizaţi şi se deplasau numai cu ajutorul căruciorului. Forţa musculară era diminuată până la 4 grade.

Studiul reflexelor osteo-tendinoase a relevat: normoreflexie - un caz; areflexie cubitală, carpo-radială şi patelară - la 3 pacienţi (75%), areflexie achiliană - la 2 pacienţi şi hiporeflexie achiliană - un caz. Ca exemplu poate prezenta următorul caz clinic (cazul clinic № 9).

Pacientul Ş. *cazul clinic № 9, 9 ani. Internat în secţia de neurologie ICŞOSMşiC cu amiotrofii musculare, «scapulae alatae», hiperlordoză lombară, facies miopatic, lagoftalmie, deficit motor şi de forţă, preponderent proximal.*

Anamneza vieţii. *Analiza arborelui genetic nu a depistat prezenţa unei maladii asemănătoare in familie (fig. 15). Acţiunea factorilor nocivi profesionali şi ecologici nu a fost depistată. Copilul de la sarcina a 2-a, pe fond de gestoză. Naşterea în termen, fără complicaţii. Ponderea la naştere 3100 g, lungimea 50 cm. Perioadă postnatală fără deosebiri, mersul autonom de la vârsta de 8 luni.*

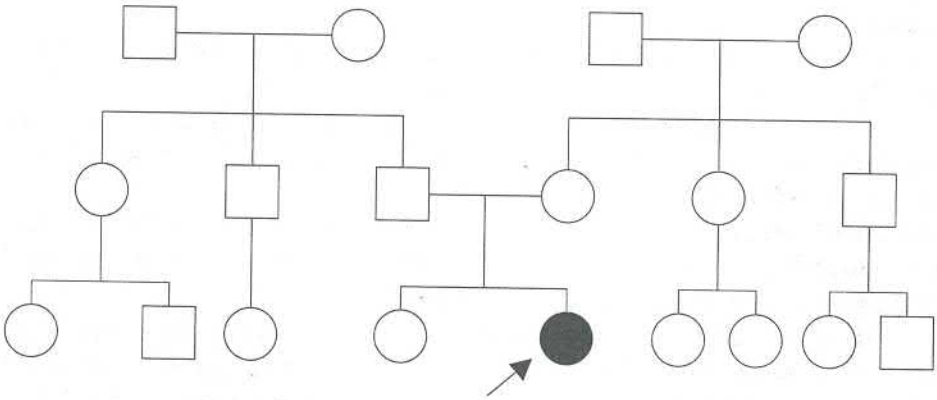


Fig. 15. Arborele genetic al pacientului Ş. (caz clinic № 9)

Anamneza maladiei. *Primele semne ale maladiei au apărut insidios în jurul vârstei de 4 ani, când părinţii au observat modificarea aspectului feţei copilului, care a devenit mai puţin expresivă. În jurul vârstei de 5 ani la schimbările faciale se adaugă un deficit de forţă a musculaturii scapulo-umerale. Musculatura centurii pelviene fiind implicată la vârsta de 6 ani.*

***Statusul neurologic**. Funcția nervilor cranieni în limitele normei. Examenul neurologic evidențiază aspectul caracteristic al feței: fața slabă, imobilă, inexpresivă, pliurile și ridurile șterse, se remarcă dificultăți la închiderea pleoapelor (fig. 16),*

Reflexele osteo-tendinoase vii. Reflexe patologice nu s-au depistat.

Mersul este legănat, posibil digitigrad, dificil calcigrad. Ridicarea din șezute prin manevra Gowers. Se evidențiază: hipotonie și deficit motor global, amiotrofii musculare pronunțate, hiperlordoza lombară, "scapulae alatae", "torace în pâlnie".

Forța musculară în membrele superioare 5 grade, în membrele inferioare 4 grade.

Examenul paraclinic și de laborator.

EMG: au fost cercetați mm. buccinator oris, biceps al brațului, soleus. Parametrii potențialelor motorii sunt diminuați ca amplitudine, e crescut procentul de polifazie al lor și sunt prezente rafale pseudomiotonice, fapt care reflectă provenienta primar musculară a modificărilor.

Analiza creatinfosfokinazei: ridicarea valorilor CFK până la 1036 U/l (în norma până la 200 U/l).

Studiul histologic al bioptatului muscular. Fibrele musculare se colorează ne uniform. Se menționează zone de necroză în focar cu fagocitoză, fibre cu degenerescență hialină, striațiile transversale parțial dispărute. Hiperplazia țesutului conjunctiv, rare nuclee interne și centralei. Concluzia. Semne manifestate de DMP primară, stadiul avansat.

***Diagnosticul**: DMP facio-scapulo-humerală, cu debut în copilărie, tetrapareza flască, evoluție progresivă, dereglări motorii grave.*

Caracteristica în ansamblu a sistemului muscular în procesul de examenului clinic obiectiv se caracteriza prin diferit aspect în dependență de forma nosologică și etapele de evoluție a maladiei. Astfel cele mai vădite schimbări au fost semnalate pentru pacienții din grupul cu DMP Duchenne.

Etapele de inițiere a maladiei se caracterizau prin apariția unor hipotrofii neînsemnate preponderent în musculatura proximală a membrelor inferioare cu o localizare simetrică și cu o progresare în evoluție.

În perioada etapei de desfășurare a simptomatologiei clinice se atestau proeminări simetrice a pseudohipertrofiilor musculaturi gambelor, se formau retracții a tendonului achille. Paralel se inițiau hipotrofii a musculaturii tronculare și a brațelor. Este important că transferul evoluării etapei clinice moderate în cea severă este însoțită de desfășurarea generalizată a procesului de atrofie cu diminuarea pseudohipertrofiilor și apariția contracturilor în articulațiile mari.

Forma Becker avea o particularitate comună de evoluare obiectivă a sistemului muscular pe parcursul etapelor de dezvoltare a maladiei. Ca particularitate diferențial diagnostică semnificativă servește vârsta debutului, viteza de evoluție a procesului miodistrofic și gradul de proeminare hipotrofiilor musculare. Raportul între vârstă, gradul de evoluare și proeminare a schimbărilor miodistrofice indică apartenența nosologiei studiate.

Contrariu, pentru pacienții cu forma DMP de centură se caracterizează prin prinderea în proces cu elemente inițiale de debut a hipotrofiilor, deasemenea simetrice însă cu localizarea în mușchii centurilor. Modificările ulterioare ale evoluției maladiei se caracterizau prin aprofundarea gradului de expresie ale amiotrofiilor. Evoluarea deasemenea poartă atât un caracter ascendent cât și descendent cu generalizarea și prinderea în proces în stadiile avansate a musculaturii faciale. O latură deasemenea specifică în diagnosticul diferențial al DMP Duchenne și DMP de centură este gradul cu mult mai puțin avansat de proeminare a pseudohipertrofiilor în unele cazuri și în altele lipsa lor complectă.

Examenul obiectiv în cadrul pacienților cu DMP FSH a apreciat schimbări musculare patognomice în dependență de etapa de evoluare. La inițierea procesului miodistrofic s-au evidențiat hipofuncții minimale în musculatura facială ce se vizualizează la probe de efort, cu proeminarea expresivității lor în etapele ulterioare, paralel cu inițierea al musculaturii scapulo humerale în etapele mai tardive. Putem afirma că interacțiunea indicelor de evoluare a gradului de proeminare și topografia musculaturii implicate în procesul patologic sunt indicii diagnostic diferențiali diferiți de celelalte forme nosologice studiate.

PARTICULARITĂȚILE MORFOLOGICE ALE DISTROFIILOR MUSCULARE PROGRESIVE

Distrofiile musculare progresive constituie un grup de afecțiuni cronice caracterizate prin afectarea musculaturii striate, apariția slăbiciunilor musculare, dereglarea funcțiilor statice şi locomotorii. Particularitățile principale se manifestă prin atrofia simetrică a musculaturii şi micşorarea forței musculare proporțional gradului de afectare. Diagnosticarea nosologică a grupului dat este foarte dificilă, însă extrem de importantă. Fără un diagnostic cert nu se poate judeca despre modul şi gradul de progresare a maladiei. În cazurile, în care diagnosticul este stabilit, se poate determina modul de transmitere genetică, ceea ce ulterior va permite determinarea riscului de moştenire a maladiei în generațiile următoare. Un diagnostic corect poate servi şi la identificarea a altor membri ai familiei, care, fiind asimptomatici, pot fi purtători ai genei patologice. În procesul de diagnosticare a distrofiilor musculare progresive poate fi foarte utilă cercetarea morfologică a țesutului muscular afectat.

Cu acest scop au fost studiate 54 bioptate musculare prelevate la 38 subiecți cu diferite forme de distrofii musculare progresive. Repartizarea pacienților după formele nosologice şi gravitatea procesului miodistrofic sunt prezentate în tab. 10.

Tabelul 10

Repartizarea lotului de bolnavi după formele nosologice şi severitatea procesului miodistrofic.

	Uşoară	Moderată	Severe	Total
DMP Duchenne	3	7	5	15
DMP Becker	3	3	2	8
DMP de centură	2	5	2	9
DMP FSH	2	2	2	6

Ca regulă maladiile neuro-musculare se caracterizează prin tablou morfologic individual, cu unele semne comune şi diferit grad de manifestare a lor. Astfel, caracteristice pentru întregul lot de pacienți studiați sunt următoarele particularități de miogeneză a procesului miodistrofic: la etapa de inițiere a maladiei se observă micşorarea numărului de miofibrile, care devin neuniforme, grosimea lor fiind diferită. Miofilamentele se atrofiază neuniform. Pe alocuri se observă distrofie hialină şi vacuolară. În unele fibre musculare se determină focare de necroză coagulantă sau în formă de disc. În procesul evoluției țesutul muscular devine hipertrofiat şi fibrilar. Fibrele musculare modificate conțin corpusculi sarcoplasmatici şi miofibrile inelare. Pe măsură avansării procesului în țesutul muscular cercetat se observă şi focare de regenerare haotică. În jurul unor miofilamente se constată o infiltrație perivasculară limfohistiocitară.

În perioada moderată a expresiei clinice tabloul histologic devine mai pronunțat. Numărul de miofilamente hipertrofiate se micşorează, iar diametrul lor tinde să fie egal. Se determină o tendință spre proliferarea țesutului conjunctiv şi celui adipos, care în stadiile finale substituie practic total țesutul muscular.

Aceste procese sunt mai caracteristice pentru DMP Duchenne. În stadiile incipiente, când în tabloul clinic se constată apariția amiotrofiilor în porțiunile proximale ale membrelor, tabloul morfologic se caracteriza prin prezența fibrelor atrofiate, unele din care suferă schimbări distrofice. Se determina schimbări distrofice mai evidente sub forma de combinare a fibrelor musculare atrofiate şi hipertrofiate. În cele intacte s-au depistat tulburări ale caracterelor tinctoriale şi nuclee deplasate spre centru. Reacțiile compensatorii se caracterizau prin hipertrofia unor fibre şi reacții de regenerare mai pronunțate în apropierea focarelor de necroză.

Evoluția tabloului clinic de pe urma avansării procesului cu apariția pseudohipertrofiilor şi agravarea amiotrofiilor este însoțită şi de o deteriorare a tabloului morfologic. Astfel creşte raportul între fibrele atrofiate şi cele hipertrofiate, apar focare de necroză a fibrelor musculare şi substituirea lor parțială cu țesut adipos şi conjunctiv.

Paralel cu agravarea clinică continuă şi deteriorarea morfologică. Se constată fragmentarea şi necroza miofibrilelor, apar focare de distrofie vacuolară şi clivaje a fibrelor musculare. Între fibrele atrofiate se observă infiltrare cu limfocite. Concomitent, pe alocuri, se surprinde procese de regenerare sub forma de regrupare nucleară. Fibrele regenerative formează grupe mici, au nuclee gigante şi o striație transversală slab pronunțată, ceea ce denotă incapacitatea lor funcțională. Focarele de țesut conjunctiv şi a celui adipos sunt extinse şi pe alocuri substituie total țesutul muscular. Țesutul conjunctiv se formează preponderent în locurile necrozate şi în jurul vaselor. Manifestările date se reflectă asupra modificărilor clinice, unde se determină o amiotrofie generalizată a tuturor grupelor musculare, diminuarea pseudohipertrofiilor, apariția contracturilor în articulațiile mari.

Un deosebit interes prezintă schimbările morfologice legate de alterări vasculare. Astfel, în bioptatele de la subiecții cu DMP Duchenne la etapele inițiale se vizualizează formarea microtrombilor parietali în vasele de calibru mediu cu revascularizarea lor ulterioară prin formare în lumenul vasului obturat a unor vase de calibru mai mic. În jurul vaselor se constată aglomerări de celule şi dezintegrare a țesutului adiacent. În capilarele de calibru mic se observă fenomene de stază. Se determină vase de calibru mijlociu cu peretele subțiat şi apariția elementelor sanguine (eritrocite) în afara vasului, cu imbibiția țesutului muscular.

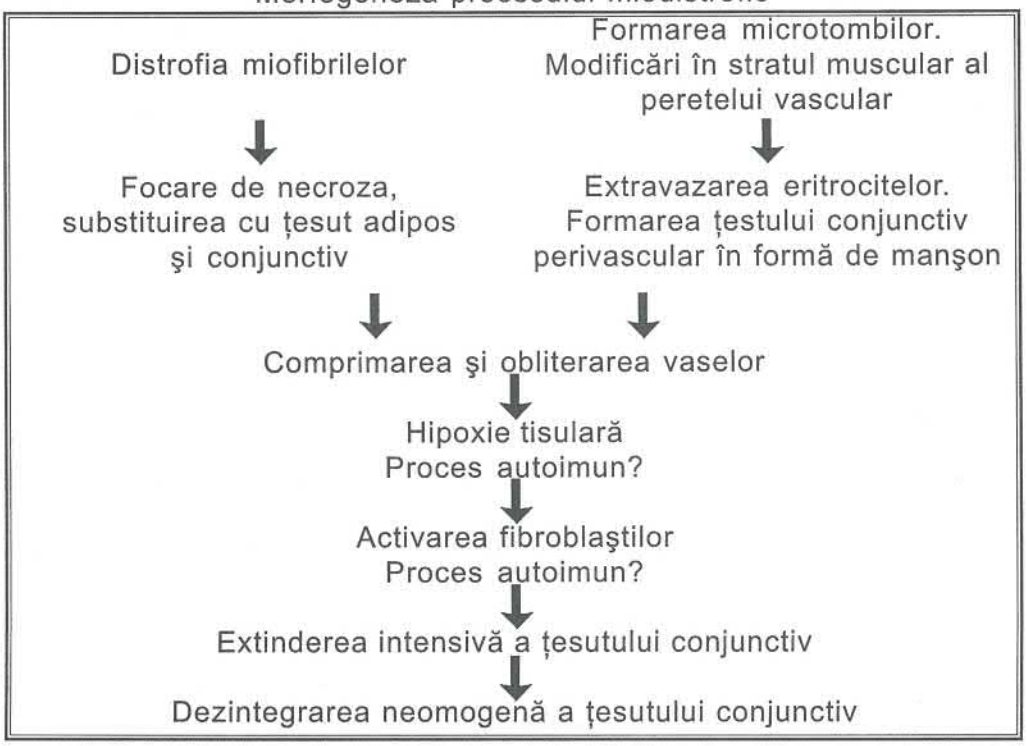
În stadiile de manifestări clinice moderate alături de modificările musculare se constată modificări vasculare, care se exprimă prin îngroşarea peretelui vascular şi reducerea fibrelor elastice şi de colagen,

cu predominarea celor netede. Predominarea modificărilor vasculare şi apariţia a mai multor vase cu trombi parietali se observă în stadiile avansate ale maladiei. Formarea micro- şi macrotrombilor parietali şi obturativi rezultă în instalarea hipoxiei duc la dezvoltarea modificărilor vasculare manifestate prin extravasarea prin diapedeză a eritrocitelor. Paralel se vizualizează zone extinse de eritrocite aflate la diferite etape de dezintegrare.

Astfel, putem conchide că procesul miodistrofic este însoţit de modificări vasculare începând cu etapa de debut. Datele descrise permit să conturăm o nouă viziune asupra conceptului de morfogeneză a procesului miodistrofic (schema 1). Paralel cu dezintegrarea şi degenerarea miofibrilelor şi necrotizarea lor se aprofundează şi are loc dezintegrarea morfofuncţională a vaselor cu extravazarea eritrocitelor. Proliferarea ţesutului conjunctiv, mai cu seamă în jurul vaselor, duce la în comprimarea şi obliterarea lor. Vascularizarea insuficientă duce la instalarea hipoxiei tisulare, ceea ce provoacă activarea fibroblaştilor care, la rândul lor, contribuie la extinderea ţesutului conjunctiv. Infiltrarea ţesutului muscular cu elemente sanguine posibil induce unele reacţii autoimune, care conspiră şi ele în morfogeneza procesului miodistrofic.

Schema 1

Morfogeneza procesului miodistrofic



În linii generale tabloul morfologic în cazurile de DMP Becker este similar cu cel descris pentru DMP Duchenne. În stadiile inițiale se constată variabilitate în diametrul fibrelor musculare, se menționează o alternanță a fibrelor musculare atrofiate şi hipertrofiate, fragmentarea şi edemul lor, contururi neliniare. Deplasarea nucleelor spre centru denotă reacția regenerativă a țesutului muscular.

În stadiile avansate se observă extinderea zonelor țesutului conjunctiv şi celui adipos, micşorarea numărului de miofibrile printre care predomină cele atrofiate. S-a observat hiperplazia țesutului conjunctiv. În focarele de necroză se observă infiltrarea cu elemente limfocitare. Limfociții formează grupe de dimensiuni diferite situate între fibrele musculare precum şi în locul clivajului. Procesul regenerativ se constată la periferie, la nivelul grupării nucleelor în formă de mioblaşti, care prin stadiul de simploblaşti ajung la stadiul de miotubulă. Modificările vasculare sunt similare cu cele din cadrul DMP Duchenne, însă sunt mai puțin accentuate.

Astfel, principalele particularități diferențial diagnostice morfologice constau în momentul manifestări, ritmul de progresare a procesului miodistrofic şi aria de proliferarea țesutului conjunctiv şi adipos.

Modificările histologice ale fibrelor musculare în stadiile incipiente ale DMP de centură se manifestă prin particularități neînsemnate ale fibrelor musculare, unele din ele fiind atrofiate, altele, având acelaşi diametru ca şi cele normale. Aspectul interior al unor fibre era modificat. Ulterior, cu progresarea procesului miodistrofic, nucleele neuniforme, formând fâşii de diferite dimensiuni localizate la periferia fibrelor musculare. Proliferarea țesutului conjunctiv nu este pronunțată. În unele cazuri se constată fibre musculare sinuoasă de diferite grosimi. Totodată se întâlnesc şi procese de regenerare în apropierea focarelor de necroză. În stadiile de manifestări clinice moderate modificările morfologice în fibrele musculare se exprimă prin intensificarea lor. Numărul fibrelor atrofiate se măreşte considerabil, predomină fibre musculare cu focare de intumescență fibrinoidă şi hialinoză, dezvoltarea țesutului conjunctiv poartă un caracter difuz, cu focare multiple de elemente celulare. Apar fibre musculare regenerative, în unele din ele se observă noi focare de diverse modificări degenerative ale fibrelor musculare.

În stadiile cele mai avansate fibrele musculare atrofiate sunt înconjurate cu țesut conjunctiv şi lipomatos interstițial, apare o transformare liposclerotică. Țesutul conjunctiv conține fibre solitare grav atrofiate.

Forma facio-scapulo-humerală debutează la o vârstă mai avansată decât celelalte forme şi evoluează mai puțin grav ca forma Duchenne. La studierea histologică s-a depistat o variabilitate în diametrul fibrelor musculare, nuclee celulare situate central. Printre fibre musculare nor-

male există fibre cu contur neclar, clivaje de fibre. Unele sunt hipertrofiate, altele atrofiate (numărul fibrelor atrofiate predomină). În fibrele musculare se observă edem, regruparea miofibrilelor. Procesul de distrofie şi necroză a fibrelor musculare era mai puţin evident de cât în formele descrise mai sus. La nivelul distrofiei şi necrozei se observă proliferarea ţesutului conjunctiv cu infiltrare limfocitară. Semnele de regenerare erau moderat pronunţate.

Astfel, în procesul studiului s-a demonstrat că tabloul morfologic în fiecare caz poartă un caracter individual şi depinde în mare măsură de forma nosologică şi etapele de evoluţie a maladiei. Însă, în întreaga selecţiune de bolnavi s-au depistat unele schimbări relativ identice, caracteristice pentru procesul distrofic, cum sunt: combinarea în stadiile incipiente ŕ focarelor de fibre atrofiate şi celor hipertrofiate, regrupare nucleară ca indice al proceselor de regenerare. Cu evoluţia maladiei procesele date au o tendinţă spre o diminuare, încep a predomina fenomenele de dezintegrare a ţesutului muscular şi substituirea sa cu cel conjunctiv şi adipos. Procesele patologice iniţiate au o acţiune devastatoare asupra ţesutului muscular, care la etapele finale ale maladiei este practic total substituit de ţesut conjunctiv şi adipos.

Mult mai evidente aceste schimbări sunt în cadrul DMP Duchenne. Paralel cu procesul de degenerescenţă a miofibrilelor şi substituirea lor cu ţesut conjunctiv şi adipos abundent, se constată şi schimbări interesând peretele vascular. Schimbările vasculare vizualizate de noi apar în perioada de iniţiere a simptomatologiei clinice, ea comportând elemente de stază cu formarea ulterioară de microtrombi pe un fond de modificare a peretelui vascular şi diminuarea stratului muscular al vasului, perturbarea barierei vasculare şi creşterea a permeabilităţii ei. Este evidentă extravazarea eritrocitelor şi posibil diapedeza altor elemente sanguine. Acest proces este însoţit de o sintetizare abundentă de ţesut conjunctiv în contiguitate. Ulterior, are loc îngroşarea şi formarea unui manşon conjunctiv în jurul vaselor cu reducerea şi obliterarea a lumenului vascular. Etapa tardivă se caracterizează prin dezorganizarea structurilor manşonului conjunctiv şi dezintegrarea ei.

Aşadar, procesul miodistrofic este însoţit de modificări vasculare începând cu etapa de debut. Paralel cu dezintegrarea şi degenerarea miofibrilelor, necrotizarea lor se aprofundează şi are loc dezintegrarea morfofuncţională a vaselor. Procesele date posibil au un rol important în patogenia formei date de DMP.

ANALIZA GENETICO-MOLECULARĂ A DMP DUCHENNE / BECKER ÎN POPULAȚIA MOLDOVEI

Căutarea directă a deleţiilor extinse ale genei distrofinei şi analiza lor la bolnavii cu DMP Duchenne

Una din sarcinile lucrării noastre a constat în studierea incidenței deleţiilor în gena distrofinei la bolnavii cu DMP Duchenne din Republica Moldova şi analiza repartizării deleţiilor în interiorul genei distrofinei.

După cum s-a menţionat în literatura mondială, în 60% cazuri, în gena distrofinei, la băieţii bolnavi cu DMP Duchenne, se depistează deleţii ample de obicei concentrate în două puncte "fierbinţi": în regiunea extremităţii-5' (exonii 3-19) şi la extremitatea 3' (exonii 40-60) a genei, regiuni care cuprind de la 1 până la câţiva exoni alăturaţi. Potrivit datelor din literatura mondială, 30% din deleţii sunt localizate în partea proximală a genei, iar 70% - în partea distală a ei.

Au fost menţionate particularităţi populaţionale ale tabloului tipic al deleţiilor la diferite populaţii europene, precum şi în populaţia Rusiei şi ţărilor CSI.

Explorarea deleţiilor extinse prin metoda RPL multiplexă a fost efectuată pe 85 mostre ADN a bolnavilor cu MD (probanzi). La 64 mostre ADN ale bolnavilor cu DMP Duchenne (76% cazuri) au fost depistate deleţii cuprinzând de la 1 până la câţiva exoni, iar la 21 mostre (24% cazuri), deleţiile nu s-au depistat.

Comparând datele proprii cu cele din literatura mondială, noi am relevat anumite particularităţi. Cota identificării deleţiilor în gena distrofinei în populaţia Moldovei este mai mare decât în populaţia Rusiei, Germaniei şi aproximativ corespunde cu datele populaţiilor din: Italia, Sri-Lanka, Franţa (tab.11).

Aşadar, analiza efectuată privind incidenţa deleţiilor în gena distrofinei a scos în evidenţă deosebiri statistic veridice în incidenţa deleţiilor la probanzii din populaţia moldovenească faţă de cei din populaţia rusă ($X2=29,19$, $df=1$, $p<0,05$) şi practic corespunderea frecvenţei deleţiilor cu cele din populaţia italiană ($X2=0,07$, $df=1$, $p<0,05$).

Tabelul 11

Procentul identificării deleţiilor în gena distrofinei în diverse populaţii.

Populaţiile	Moldova	Rusia	Germania	Franţa	Sri-Lanka	Italia
Frecvenţa, %	76	41	62	68	66	78
X2		29,19	2,74	0,8	1,3	0,07

Reieşind din sarcinile cercetării noastre, noi am analizat răspândirea deleţiilor în gena distrofinei la bolnavii din populaţia Moldovei.

Din 64 cazuri de depistare a deleţiilor la bolnavii cu miodistrofie Duchenne, în 45 cazuri (70,3%) deleţiile erau localizate în extremitatea-3'-distală a genei distrofinei, iar în 19 cazuri (29,7%) deleţiile erau localizate în extremitatea-5'-proximală a genei distrofinei. Însă în 5 cazuri deleţiile cuprindeau ambele extremităţi.

Comparând datele obţinute cu cele din literatura mondială, noi am relevat corespondenţa procentuală a acestora.

În total, au fost găsite deleţii la 105 exoni. Raportul procentual de implicare a anumitor exoni în procesul deleţional este prezentat în tabelul 12

Tabelul 12

Frecvenţa implicării exonilor în procesul deleţional

exoni	cantitatea	%
3	6	5,7
8	8	7,6
17	2	1,9
13	3	2,8
19	9	8,5
43	4	3,8
44	6	5,7
45	20	19,45
47	14	13,3
48	14	13,3
50	13	12,3
52	5	4,7
60	1	0,95
total: 13	105	100%

Analizând datele proprii, putem face următoarea concluzie: după raportul procentual de răspândire a deleţiilor în sectoarele proximal şi distal ale genei distrofinei, datele noastre corespund cu cele din literatura mondială. În populaţia Moldovei, punctul de rupere este situat pe hotarul dintre exonii 44 şi 45. Cel mai frecvent în procesul deleţional se include exonul 45 – 19,4% cazuri.

Testul PLFR după saitul polimorfic intragenic pERT87-8/Tag1

Analiza populaţională a polimorfismului ADN al locusului pERT87-8/Tag1

Una din sarcinile lucrării noastre a constat în studierea polimorfismului ADN al locusurilor pERT87-8/Tag1 şi 16 intron/Tag1 în populaţia sănătoasă a Moldovei.

Caracteristica incidenţelor alelelor E1 şi E2 la bolnavii cu DMP Duchenne

În scopul determinării incidenţei alelei fără sait restricţional E1 (460 p.b.) şi alelei cu sait restricţional E2 (250p.b.+166p.b.) pe cromozomul-X bolnav, au fost investigaţi 70 cromozomi-X bolnavi neînrudiţi.

Incidenţa alelei E1 (fără sait restricţional) a constituit 35,71%, iar incidenţa alelei E2 (cu sait restricţional) a constituit 64,28%, deci frecvenţa alelelor este respectiv q=0,3571, p=0,6428 (tab. 19).

Tabelul 19

Incidenţa alelelor locusului 16intron/Tag1 la bolnavii cu DMP Duchenne.

Locusul 16intron/Tag1	Alelele	
	E1	E2
Numărul depistat	25	45
%	35,71	64,28
Frecvenţa alelelor	0,3571	0,6428
X2	12,69	

Astfel, feciorii care au primit unicul cromozom X de la mamă au în fiecare generaţie aşa frecvenţe ale alelelor ca la indivizii materni din generaţia anterioară. Introducând aceste valori în formula lui Hardy-Wainberg, am aflat frecvenţele probabile a trei clase genotipice printre indivizii părţii feminine: p2=41,32%, 2pq=45,9%, q=12,8% .

Frecvenţele probabile obţinute a trei clase genotipice au fost comparate cu rezultatele genotipurilor obţinute la femeile înrudite cu probandul (tab. 20).

Tabelul 20

Incidenţa genotipurilor în locusul 16 intron/Tag1 la femeile înrudite cu probandul.

Indicii	Genotipurile		
	E1E1	E1E2	E2E2
Numărul depistat	2	25	13
%	5%	62,5%	32,5%
Numărul teoretic,	5,12	18,3	16,52
%	12,8%	45,9%	41,32%
Frecvenţa alelelor	0,36		0,64
X2	1,9	2,4	0,75

Interpretând datele noastre, putem face următoarea concluzie: incidenţa alelei E1 pe cromozomul X-bolnav este mai mică decât incidenţa alelei E2 de 1,8 ori. Prin urmare, alela E2 este dominantă la bolnavii cu DMP Duchenne şi, respectiv, se poate de vorbit despre înlănţuirea alelei E2 cu DMP Duchenne în populaţia Moldovei. Frecvenţa teoretică a heterozigoţilor în populaţia feminină constituie 45,9%, ceea

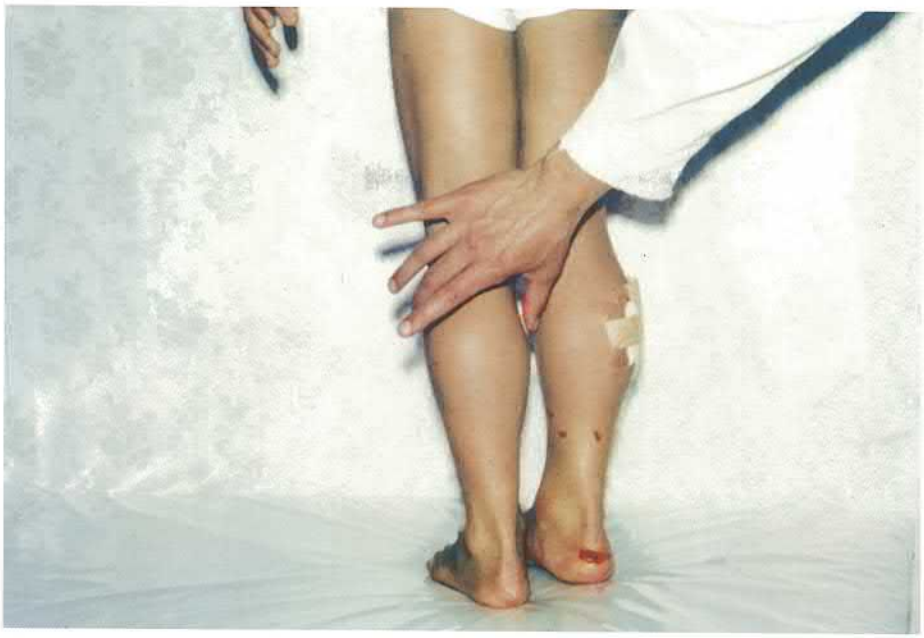


Fig 6. DMP Duchenne (caz clinic 118)
Pseudohipertrofia bilaterală muşchilor gastrocnemieni.

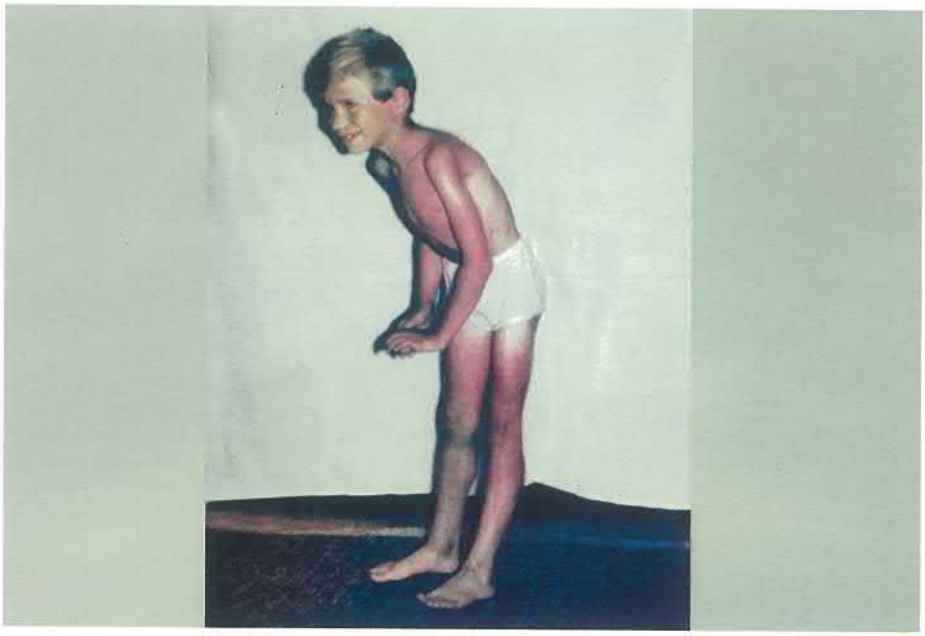


Fig 8. DMP Duchenne (caz clinic 10)
Mers calcigrad imposibil.

Fig 9. DMP Duchenne (caz clinic 10)
Manevra Gowers la ridicarea din şezute

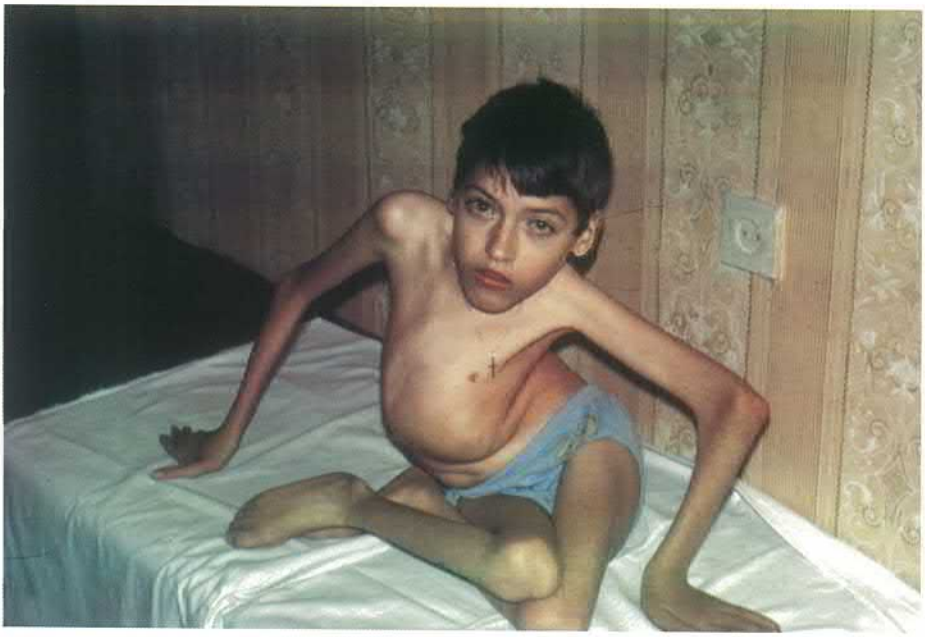


Fig 11. DMP Duchenne (caz clinic 34)
Hiperlordoza lombară, scolioză, atitudine de semiflexie în genunchi şi coate.

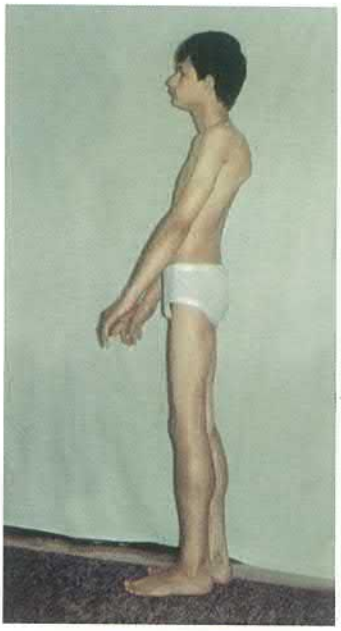


Fig. 13. DMP Becker. (caz clinic 28) Accentuarea lordozei lombare, «scapulae alatate»

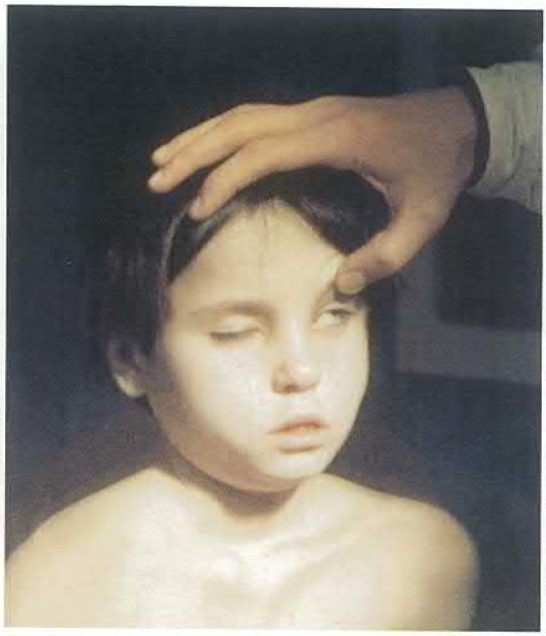


Fig. 16. DMP Facio-Scapulo-Hemerală. (caz clinic 9) Hipotrofoe facială, dificultăți la inchiderea pleoapelor, „buze de tapir"

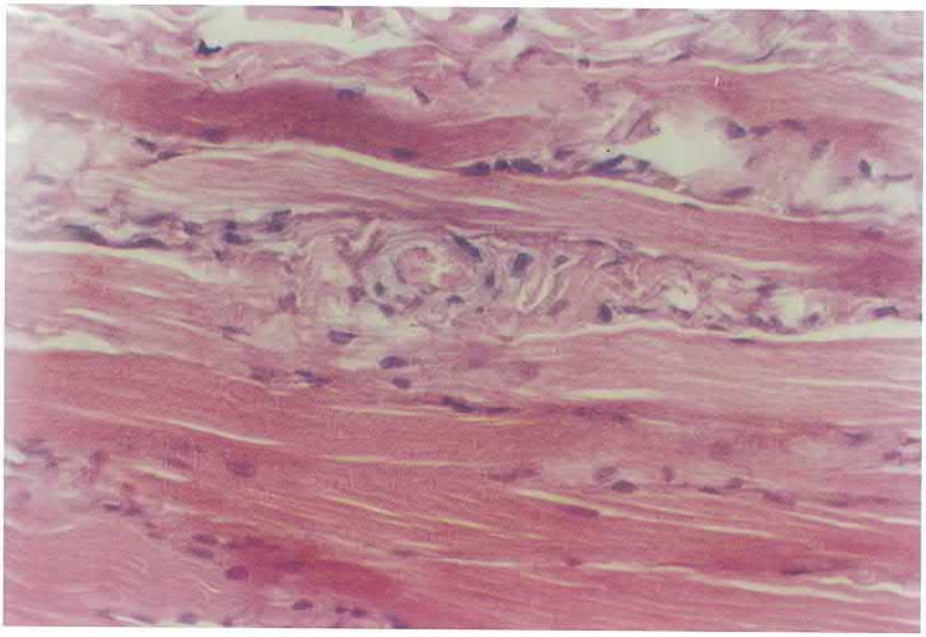


Fig 17. DMP Duchenne. Fibre musculare de diferite dimensiuni. În centrul piesei un vas de calibru mijlociu care conține mase trombocitare. Hematoxilin - eozină. x 200.

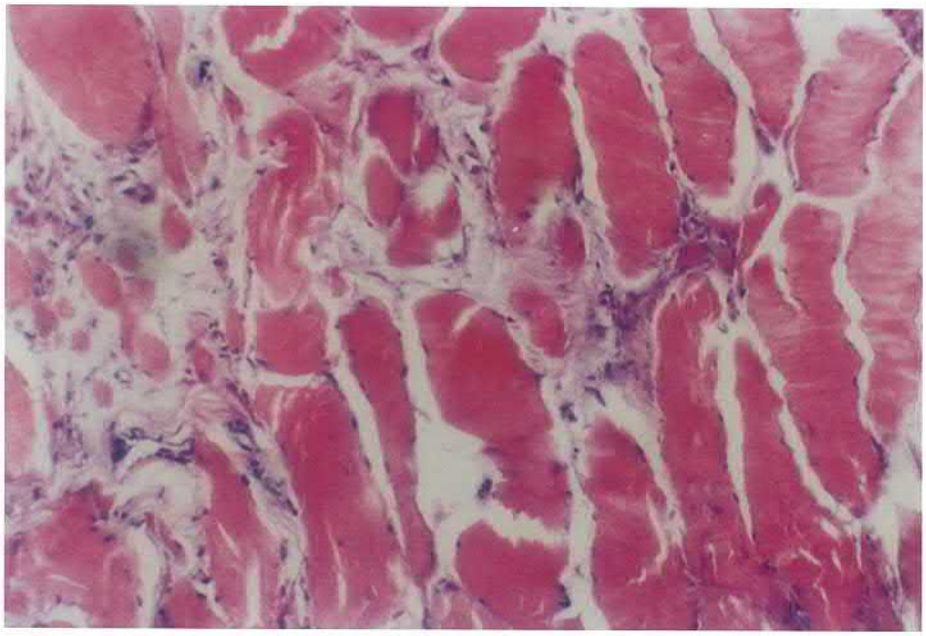


Fig 18. DMP Duchenne. Modificări tinctoriale în fibrele musculare. Fibre musculare hipertrofiate şi atrofiate. Substituirea lor cu ţesut conjunctiv şi adipos. Hematoxilin – eozină. x 200.

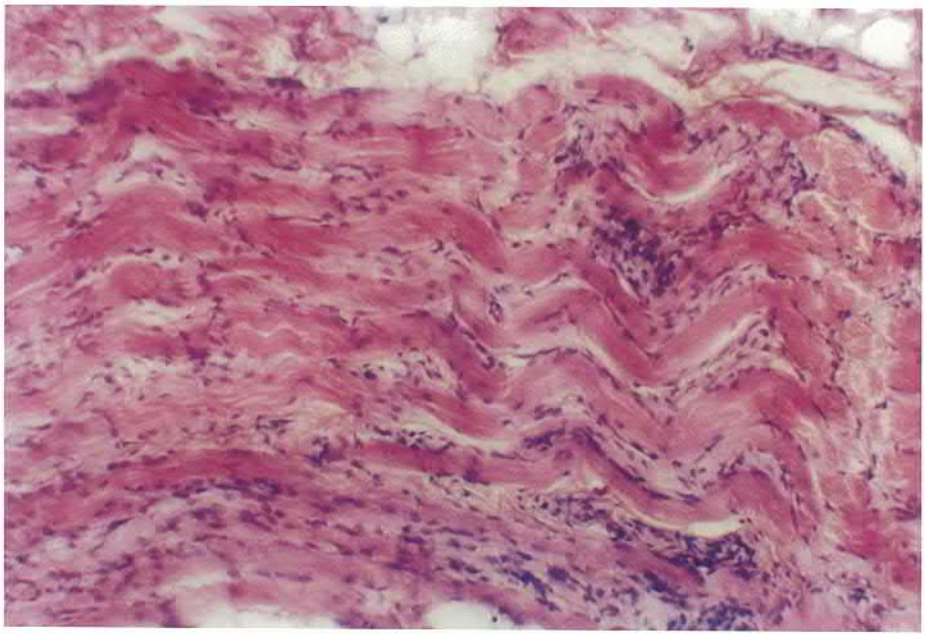


Fig. 19. DMP Duchenne. Focare de necroză şi fragmentare. Infiltrare cu celule limfohistiocitare. Apariţia focarelor de ţesut adipos. Hematoxilin – eozină. x 200.

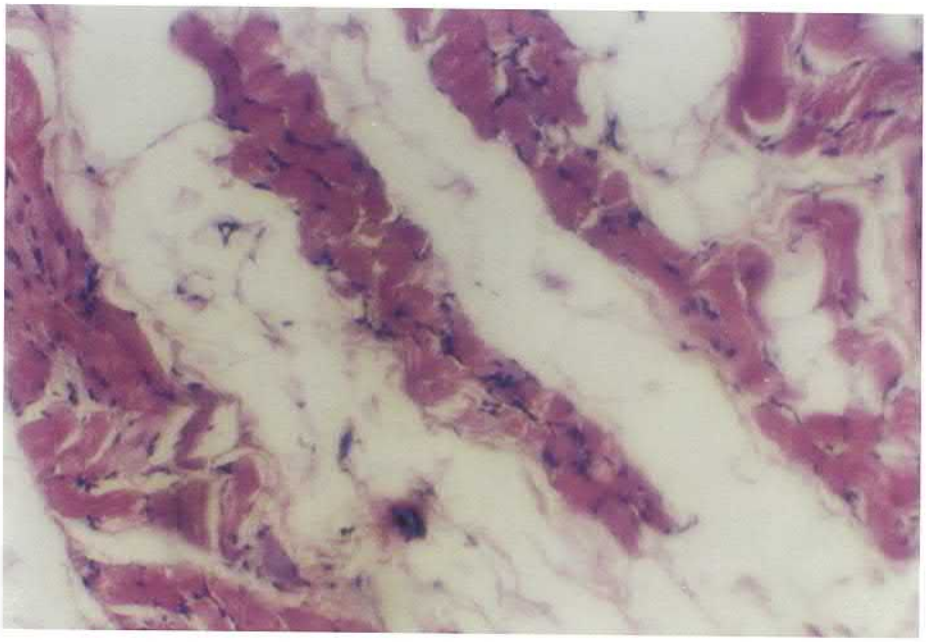


Fig 20. DMP Duchenne. Focare de țesut adipos, care substituie totalmente țesutul muscular. În centrul piesei - fibre musculare înglobate în țesut adipos. Lipsa vaselor în apropierea acestui proces. Hematoxilin – eozina. x 200.

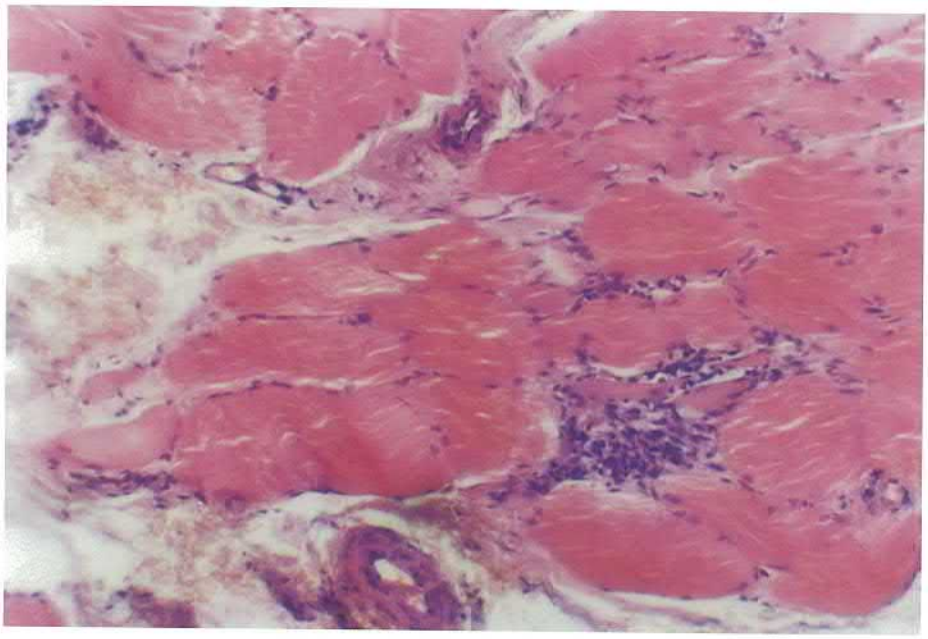


Fig. 21, a. DMP Duchenne. Modificări vasculare. Hipertrofia peretelui vascular, formarea microtrombilor parietali. Hematoxilin – eozină. x 200.

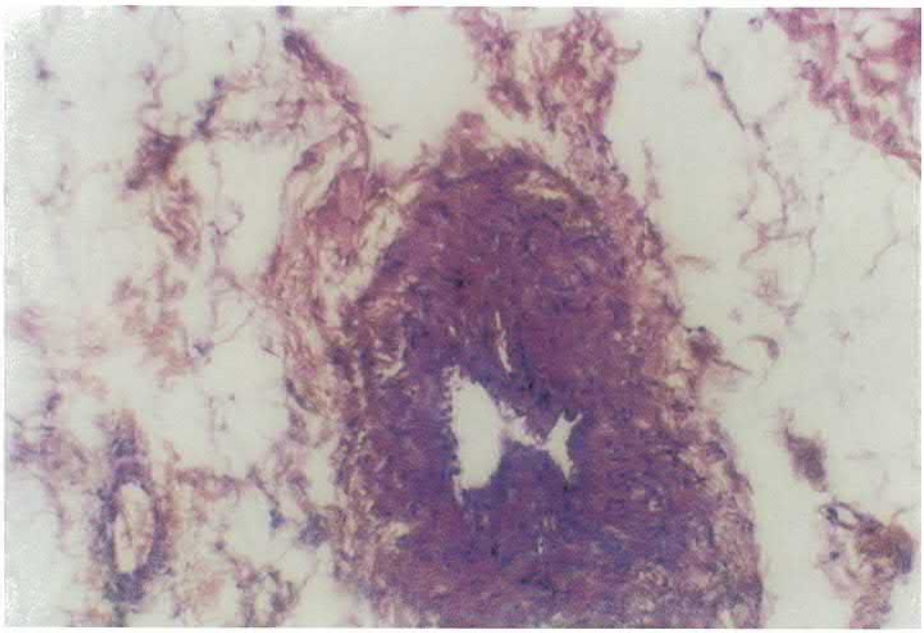
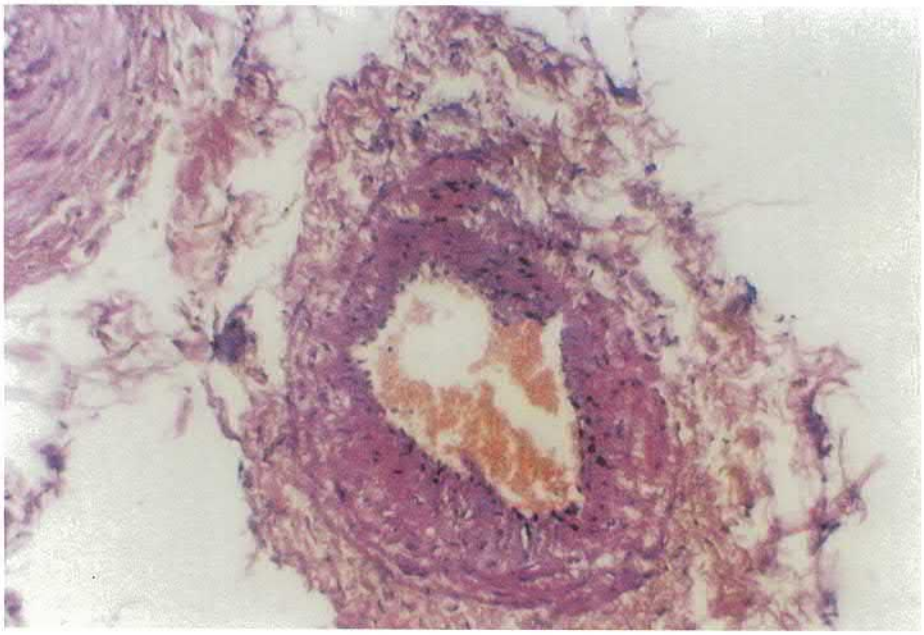


Fig. 22, DMP Duchenne. Modificări vasculare avansate. Hipertrofia peretelui vascular şi îngroşarea lumenului. Hematoxilin – eozină. x 200.



Fug. 23, DMP Duchenne. Substituirea totală a ţesutului muscular de cel adipos şi conjunctiv. Comprimarea vaselor. Clivajul fibrelor musculare. Hematoxilin - eozină. x 200.

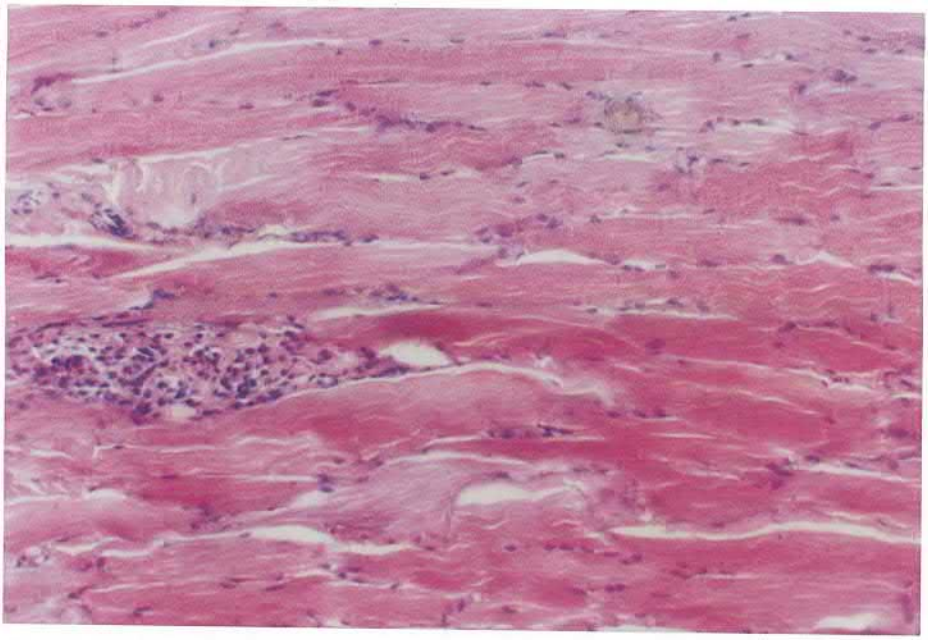


Fig. 24. DMP Becker. Modificări fibrilare superficiale manifestate prin apariția unor focare de clivaj a fibrelor. Hematoxilin – eozină. x 200.

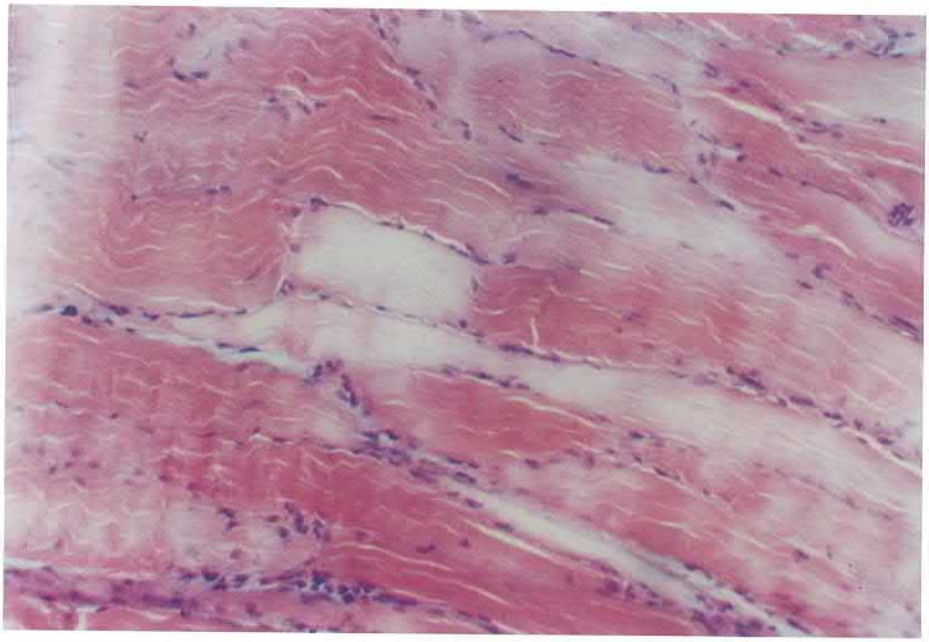


Fig. 27. DMP de centură. Modificări degenerative ale fibrelor musculare. Hematoxilin – eozină. x 200. .

şi se întâlneşte de 18 ori mai des decât alela F1. Au fost determinate frecvenţele probabile a trei clase genotipice printre indivizii părţii feminine: p2=0,9025, 2pq=0,095, q2=0,0025.

În scopul determinării incidenţei alelei F1 (216 p.b.) şi alelei F2 (166p.b.+50p.b.) pe cromozomul-X bolnav au fost investigaţi 19 cromozomi-X bolnavi neînrudiţi.

Incidenţa alelei F1 (fără sait restricţional) a constituit 15,8%, iar incidenţa alelei F2 (cu sait restricţional) a constituit 84,2%. Luând în consideraţie distribuirea echilibrată a frecvenţelor claselor genotipice în populaţii, putem conchide că q=0,158 iar p=0,842. Astfel, feciorii care au primit unicul cromozom X de la mamă au în fiecare generaţie aşa frecvenţe ale alelelor ca la indivizii materni din generaţia anterioară. Introducând aceste valori în formula lui Hardy-Wainberg, am aflat frecvenţele probabile a trei clase genotipice printre indivizii părţii feminine: p2=70,8%, 2pq=26,8%, q2=2,4% (tab. 22).

Tabelul 22

Incidenţa alelelor locusului pERT87-15

Indicii	X-cromozomul sănătos		X-cromozomul bolnav	
	F1/Y	F2/Y	F1/Y	F2/Y
Numărul depistat	1	18	3	16
%	5,26%	94,73%	15,8%	84,2%
Frecvenţa alelelor	q=0,05	p=0,95	P=0,158	q=0,842
X2	16,5	10,5		

În consecinţă, putem face următoarea concluzie: incidenţele alelei cu şi fără sait restricţional coincid între cele două grupuri investigate (cromozomii-X bolnavi şi sănătoşi), nu se observă înlănţuirea unei anumite alele cu maladia în populaţia Moldovei. În populaţia Moldovei, alela dominantă este alela F2 care se întâlneşte cu o frecvenţă de 94,73%. Frecvenţa calculată a heterozigoţilor, 0,95% este foarte mică, ceea ce indică o informativitate joasă a acestui polimorfism în populaţia Moldovei.

Investigarea polimorfismului alelic pe cromozomii mutanţi şi normali

La compararea repartiţiei frecvenţelor alelelor polimorfe de pe cromozomii ce poartă mutaţii în gena distrofinei şi pe cromozomii normali, am scos în evidenţă deosebiri considerabile.

Tabelul 23

Datele despre polimorfismele alelice de pe cromozomii mutanți şi normali.

Locusurile	alelele	cromozomul X normal	cromozomul X bolnav
pERT87-8/Tag1	1	18,5%	57,1%
	2	81,5%	42,8%
16intron/Tag1	1	71,5%	35,7%
	2	28,5%	64,3%
pERT87-15/BamH1	1	5%	15,8%
	2	95%	84,2%

Remarcă: indicele 1- alela fără sait restricțional
indicele 2 - alela cu sait restricțional

Conform datelor expuse, frecvența alelei 1 (în sistemul pERT87-8/Tag1) pe crmozomii mutanți este aproape de 3 ori mai mare decât cea de pe cromozomii normali (57,1% față de 18,5%).

În sistemul 16 intron/Tag1, frecvența alelei 1 de pe cromozomii normali este de două ori mai mare decât frecvența alelei 1 de pe cromozomii mutanți (71,5% față de 35,7%).

Şi doar în sistemul pERT87-15/BamH1, repartizarea incidențelor alelelor polimorfe pe cromozomii mutanți şi normali aproape nu se deosebeşte.

Astfel, din cele expuse anterior, se poate face următoarea concluzie: deosebirile indicate mai sus permit, in cadrul diagnosticului indirect al familiei cu DMP Duchenne (testul înlănțuirii, adică testul PLFR), de a stabili înlănțuirea unei anumite alele cu DMP Duchenne şi de a efectua urmărirea moştenirii acestei alele mutante în familie.

CONSULTAȚIA MEDICO-GENETICĂ A BOLNAVILOR CU DMP DUCHENNE.

Principiile consultării medico-genetice.

Consultarea medico-genetică reprezintă o formă nouă de lucru a clinicistului şi geneticianului contemporan, care a apărut în anii 30 ai secolului XX.

Doar în prezent a apărut posibilitatea de a propune membrilor familiilor bolnavilor cu patologie neuro-musculară ereditară informații veridice despre riscul acestei maladii pentru ei.

În cadrul Institutului de Cercetări Ştiințifice de Ocrotire a Sănătății Mamei şi Copilului din Republica Moldova, din 1989, a fost deschis centrul medico-genetic național unde pacienților li se poate acorda în momentul de față un ajutor genetic specializat, cu aspect practic (consultarea medico-genetică) şi ştiințific (laboratorul diagnosticului molecular). Anume asemenea organizare a conlucrării acestor două structuri permite de a reduce discordanța dintre elaborările ştiințifice a laboratorului şi serviciul practic al geneticii medicale în domeniul diagnosticului medical.

Cu ajutorul registrului regional computerizat al bolnavilor cu DMP şi băncii de mostre ADN a familiilor cu DMP Duchenne, create de noi, noi efectuăm diagnosticarea moleculară a DMP Duchenne şi examinăm necesitățile reale ale unei sau altei regiuni ale țării în diagnosticarea moleculară, inclusiv şi prenatală.

În capitolele precedente a fost menționată dificultatea diagnosticului diferențiat al variantelor clinice ale patologiei neuro-musculare cu forme clinice asemănătoare şi posibilitatea moştenirii unei forme după tip diferit. De exemplu, este dificil de diferențiat DMP Duchenne şi forma pseudo-Duchenne.

Însă, chiar aceeaşi formă cu una şi aceeaşi genă, unele şi aceleaşi simptoame, poate avea o evoluare a bolii diferită. De exemplu DMP Duchenne cu sfârşit semiletal la băieți şi DMP Becker cu evoluare favorabilă.

Pentru consultarea medico-genetică, noi am luat în considerație câteva condiții:

- diagnosticul exact al maladiei, stabilit după examinarea minuțioasă în clinică;
- cunoaşterea variantelor formei maladiei cu diferite tipuri de moştenire;
- examinarea rudelor bolnavului pentru concretitzarea tipului de moştenire;

Numai după culegerea tuturor acestor date, se poate de trecut la determinarea riscului apariției maladiei în familia dată şi la clarificarea

faptului dacă patologia dată este o consecință a unei mutații noi sau a apărut în rezultatul purtării ascunse a genei patologice.

La consultarea medico-genetică a maladiei cu tip de moştenire X-înlănțuit recesiv, noi am luat în considerație următoarele particularități:

- tatăl bolnav poate transmite gena patologică numai fiicelor, care vor fi practic sănătoase, dar vor fi purtătoare heterozigote;
- femeia purtătoare va transmite gena patologică la 50% din fiii săi;
- băiatul bolnav poate primi gena patologică numai de la mamă;
- femeia purtătoare poate primi gena patologică atât de la tată cât şi de la mamă;
- dacă femeia este homozigotă şi nu heterozigotă, atunci ea singură este bolnavă, deoarece a primit gena patologică de la ambii părinți, sau inițial a fost X0 după cariotip, adică această femeie este cu sindromul Turner. Toți feciorii ei vor fi bolnavi iar toate fiicele vor fi purtătoare heterozigote a genei patologice.

Toate familiile care ni s-au adresat după consultație medico-genetică au fost supuse examinării complexe, ce include examinarea neurologică aprofundată, testul biochimic (determinarea nivelului CFC în serul sangvin), investigațiile electromiografice şi genetico-moleculare.

Cea mai frecvent întâlnită situație a fost acea, cînd bolnavul era unicul în genealogie, adică s-au depistat cazuri spontane (în total 64 familii). În această situație, a fost necesar de diferențiat maladia față de alte forme de DMP Duchenne. În 10 cazuri, s-au depistat cazuri familiale ale maladiei, iar în 7 - cazuri genealogic "curate", însă cu doi băieți bolnavi.

Pentru depistarea purtătorilor camuflați şi, astfel, pentru determinarea indirectă a tipului de moştenire a fost efectuată examinarea biochimică a tuturor membrilor familiei cu copil bolnav. S-a relevat că la tați, majorarea activității enzimei-CFC, în cazul tipului de moştenire X-înlănțuit nu s-a observat, pe când la mame, majorarea acestui parametru a fost considerabilă, la surorile probanzilor majorarea activității CFC era ceva mai mică, iar la frați – şi mai redusă.

În momentul de față, a apărut posibilitatea diagnosticării ADN în familiile cu DMP Duchenne în condițiile Centrului Medico-genetic, ce include în sine două etape:

- diagnosticarea directă – căutarea directă a deleţiilor ample în gena distrofinei prin metoda RPL multiplexe;
- metoda indirectă de diagnosticare ADN cu utilizarea saiturilor polimorfe intragenice pERT87-8/Tag1, pERT87-15/BamH1, 16intron/Tag1.

Astfel, consultarea medico-genetică a familiilor bolnavilor cu DMP Duchenne asigură diagnosticul la timp al maladiei la probanzi, permite efectuarea diagnosticului preclinic la sibşii de gen masculin, identificarea

purtătorilor genei patologice cu scopul preîntâmpinării naşterii copiilor bolnavi, înfăptuind controlul complet asupra acestor familii.

Analiza informativităţii familiilor cu DMP Duchenne

Pentru diagnosticul DMP Duchenne şi determinarea purtătorului heterozigot, au fost investigaţi 300 membri ai 81 familii cu DMP Duchenne din populaţia Moldovei. Familiile cu copil bolnav la care a fost depistată deleţia şi mama căruia este heterozigotă după polimorfismul intragenic (sau după polimorfismele intragenice) au primit denumirea de familii complet informative. Familiile în care ori a fost depistată deleţia, ori mama bolnavului este heterozigotă după polimorfismul intragenic (sau după polimorfismele intragenice), au primit denumirea de familii informative.

După cum a fost subliniat anterior, diagnostica moleculară a DMP Duchenne, atât în perioada prenatală, cât şi în cea postnatală, poate fi efectuată atât prin metoda directă, cât şi prin cea indirectă.

Analiza deleţiilor în gena distrofinei a relevat un procent înalt al determinării deleţiilor la probanzi – 79% cazuri. Testul dat are o informativitate înaltă la bolnavii din Moldova.

Analiza informativităţii familiilor cu DMP Duchenne după trei saituri polimorfe intragenice: pERT87-8/Tag1, pERT87-15Bamh1, şi 16 intron/Tag1 a relevat informativitatea înaltă a polimorfismului 16 intron/Tag1 şi informativitatea redusă a pERT87-15Bamh1. Rezultatele informativităţii după polimorfisme sunt prezentate în tabelul 24.

Tabelul 24

Informativitatea familiilor după polimorfismele intragenice

Numărul familiilor	locusul	Informativitatea, %	Numărul total de familii	
			informative	neinformative
77	16intron/Tag1	46,7%	36	41
80	pERT87-8/Tag1	42,5%	34	46
19	pERT87-15/BamH1	21%	4	15

Tabelul 25

Informativitatea familiilor cu DMP Duchenne, investigate după deleţii şi polimorfisme şi posibilitatea diagnosticului prenatal.

Numărul de familii	Complet informative	Informative	Neinformative	posibilitatea diagnosticului prenatal
81	41	35	5	76
100%	50,6%	43,2%	6,17%	93,82%

Familiilor informative după polimorfisme, le este recomandată efectuarea diagnosticului prenatal indirect (testul PLFR).

Pentru familiile informative după deleţii, e posibilă efectuarea diagnosticului prenatal prin metoda directă (RPLM).

Familiilor neinformative după polimorfisme, le e recomandată efectuarea diagnosticului prenatal prin metoda directă (căutarea directă a deleţiilor ample prin metoda RPLM).

Pentru familiile complet informative e posibilă efectuarea diagnosticului prenatal atât prin metoda indirectă (testul PLFR) cât şi prin cea directă (metoda RPLM).

Astfel, luând în consideraţie rezultatele prezentate, putem face următoarea concluzie: **algoritmul investigaţiilor moleculare selectat de noi permite de a determina informativitatea în 76 cazuri (93,82%)** şi, respectiv, de a efectua diagnosticul prenatal în aceste familii.

Procentul maximal al informativităţii s-a arătat a fi la polimorfismul 16 intron/Tag1 (46,75%), ceea ce corespunde calculelor teoretice. Un procent ceva mai redus al informativităţii l-a dat polimorfismul pERT87-8/Tag1 (42,57%) şi cel mai mic procent al informativităţii (21%) a fost depistat la polimorfismul pERT87-15/BamH1, ceea ce de asemenea corespunde calculelor teoretice. Procentul depistării deleţiilor la probanzi constituie 79% din cazuri.

Determinarea purtătorului heterozigot al genei mutante a distrofinei

După cum s-a menţionat anterior, o mare importanţă în consultarea medico-genetică o are determinarea purtătorului.

Pentru identificarea purtătorului genei patologice, Mihhorat şi Goldstone în 1962 au propus următoarea clasificare a purtătorilor.

Purtători veridici ai maladiei – mama copilului bolnav şi surorile lui, ce au în familie măcar un bărbat bolnav cu aceeaşi formă de miodistrofie din partea mamei.

Purtători probabili - mamele cu copii bolnavi ce au nu mai puţin de doi copii bolnavi. Unii autori includ în această grupă femeile din familiile cu această maladie.

Purtătorii posibili – mamele ce au un copil bolnav, fără istoria familiei şi alte rude feminine din familiile cu această maladie.

Metoda genealogică de depistare a purtătorilor poate fi aprofundată prin analiza matematică simultană a genealogiei.

Noi am supravegheat 116 femei, acestea fiind mamele, surorile şi mătuşile băieţilor bolnavi; ele au fost repartizate în două grupuri după testul genealogic.

Primul grup – femeile veridic purtătoare, cu genealogie tipică, cu unchi sau bunel bolnavi din partea maternă (11 femei).

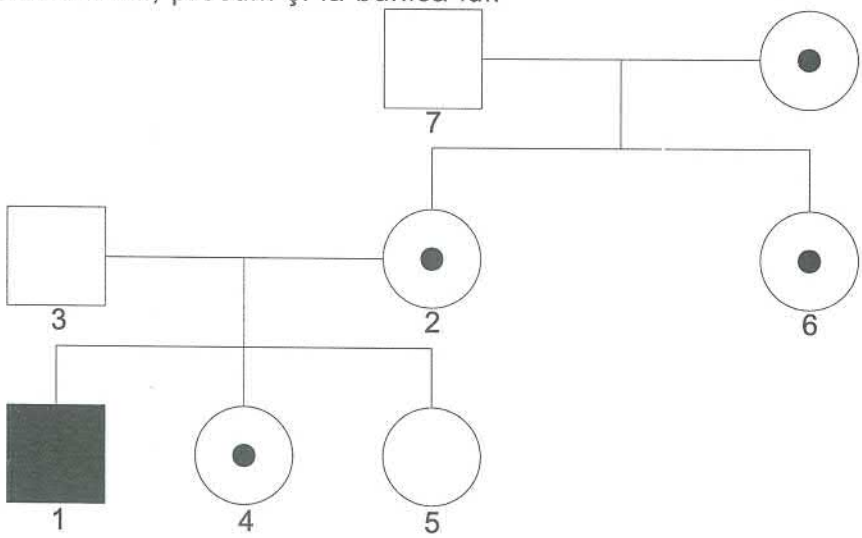
Al doilea grup – femeile posibil-purtătoare, mama şi surorile bolnavului în familie, unde cazul dat este unicul în genealogie (105 femei).

Toţi purtătorii presupuşi au fost supuşi investigaţiei biochimice (determinarea nivelului CFC în serul sangvin). În rezultat, la purtătorii veridici, s-a depistat majorarea activităţii CFC în 95% cazuri, iar la cei posibili – 76% cazuri. După cum s-a menţionat mai sus, un interes deosebit prezintă cercetarea CFC în familiile bolnavilor cu etiologie ereditară în cazul apariţiei izolate a unui asemenea bolnav în arborele genealogic. Analiza genealogiilor "mute" cu ajutorul testului CFC denota frecvent transmiterea tipică a maladiei pe linia maternă. Însă, în pofida informativităţii mari a testului dat, acesta nu garantează evidenţierea purtătorului în 100% cazuri şi nu poate fi folosit la diagnosticul prenatal.

În cercetarea noastră, a fost efectuată analiza moleculară privind determinarea purtătorului heterozigot la 116 femei. Femeilor din familiile informative (92 femei – 79,3%) le-am putut da răspuns afirmativ cu exactitatea de 95%. Purtătorul heterozigot a fost stabilit la 81 femei (88%) şi respins la 11 femei (12%). La 24 femei (20,7%) a fost imposibil de a stabili purtătorul heterozigot, deoarece familiile erau neinformative la polimorfismele date.

Drept exemplu de determinare a purtătorului heterozigot, poate servi investigarea familiei D (genealogia şi electroforegrama cu testul PLFR după polimorfismul 16 intron/Tag1 (fig. 30, a) unde feciorul este unicul bolnav în arborele genealogic dat. Determinarea CFC permite de a urmări moştenirea pe linie feminină deoarece activitatea CFC este majorată la sora probandului, precum şi la bunica lui.

A



B

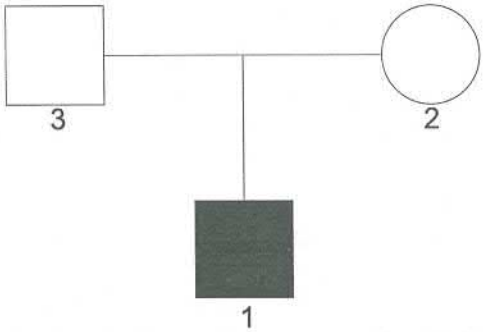


Fig. 30. Genealogia şi electroforegrama familiei după polimofismul 16 intron/Tag1. a (fam. D) şi b (fam. G)

Testul PLFR a arătat că purtători sunt una din surorile probandului, mătuşa şi bunica lui.

O problemă serioasă pentru diagnosticul purtătorului heterozigot şi, prin urmare, pentru cel medico-genetic, prezintă cazurile aşa numitului mozaicism gonadic – prezenţa de mutaţii ale genei distrofinei în celulele somatice ale gonadelor femeilor purtătoare, mutaţii, care la rândul lor, duc la apariţia câtorva generaţii (clone) de celule sexuale (ovocite) cu gene mutante şi normale ale distrofinei. Se presupune că astfel de mutaţii pot apărea chiar la nivelul celulelor sexuale primare, adică în stadiile timpurii de dezvoltare intrauterină a viitoarei mame.

În cercetarea noastră, noi am stabilit mutaţia genei distrofinei în ovocitele a două familii (ex. familiei G. fig. 30, b).

Potrivit estimărilor orientative, aproximativ 6-7% din toate cazurile sporadice sunt consecinţe ale mozaicismului gonadic la mamă. Evaluarea mărimii clonei aberante al ovocitelor pare a fi practic imposibilă. În legătură cu aceasta, pronosticarea privind sănătatea următorului copil în familiile unde la mama bolnavului cu DMP Duchenne nu poate fi determinat purtătorul heterozigot, este foarte dificilă. A fost determinat empiric că preznţa cazului sporadic de DMP Duchenne la copilul născut, în lipsa dovezilor moleculare directe ale purtătorului heterozigot al mutaţiei genei distrofinei la mamă, riscul naşterii unui alt copil bolnav poate atinge 14% .

Astfel, utilizarea metodelor diagnosticului molecular implementate în practica clinică serveşte drept profilaxie reală privind naşterea băieţilor cu miodistrofie Duchenne şi Becker X-înlănţuită. Însă toate acestea sunt posibile doar în cazul adresării acestor familii după consultaţii la Centrul Medico-Genetic.

Diagnosticul ADN postnatal, preclinic al miodistrofiei Duchenne

Actualmente, sunt descrise conform datelor lui Badalean L.O. circa 500 forme nozologice independente diferite şi variante clinice individuale de DMP. Astfel, diagnosticul clinic şi de laborator este extrem de dificil. Medicului practician care se ciocneşte rareori cu patologia ereditară musculară îi este greu să se orienteze în multitudinea formelor de DMP ce se deosebesc prin polimorfismul fenotipic şi eterogenitatea genetică.

Multitudinea recomandărilor practice şi tehnice din literatura mondială privind studierea genei distrofinei şi diagnosticul maladiei duc la necesitatea elaborării unei tactici de utilizare a metodelor geneticii moleculare pentru confirmarea diagnosticului clinic, determinarea purtătorului heterozigot şi ulterior efectuarea diagnosticului prenatal în familie.

În acest scop, luând în consideraţie posibilităţile economice ale republicii şi particularităţile populaţionale, noi considerăm de perspectivă utilizarea următoarelor metode:

1. căutarea directă a deleţiilor ample în gena distrofinei la bolnavii cu DMP Duchenne prin metoda RPL multiplexă;
2. metoda indirectă – testul PLFR după două saituri intragenice polimorfe (pERT87-8/Tag1, 16intron/Tag1). Luând în consideraţie informativitatea joasă a polimorfismului pERT87-15/BamH1, acesta se utilizează ca o metodă auxiliară în cazul informativităţii primelor două.

Având în vedere cheltuielile economice considerabile, necesare pentru efectuarea acestor analize, noi am avut o atitudine exigentă în indicaţiile referitoare la efectuarea analizelor ADN, bazându-ne pe criteriile diagnosticului DMP Duchenne (prof. L.O.Badalean, P.A.Temin,1998). Dar, cu toate acestea, noi am depistat câteva particularităţi de manifestare clinică a DMP Duchenne în populaţia Moldovei.

La analiza familiilor cu DMP Becker (în total 10 familii), noi observăm că în 5 cazuri, analiza ADN prin metoda RPLM a arătat lipsa deleţiilor în gena distrofinei. În celelalte 5 cazuri, au fost depistate deleţii (exonii 52, 43, 45-47, 3), dar care nu au provocat deplasarea cadrului de calcul.

Într-un caz, diagnosticul variantei intermediare adolescente DMP Becker a fost stabilit în baza analizei moleculare. În continuare, prezentăm următoarele observări efectuate de noi.

Familia C s-a adresat după consultaţie privitor la îmbolnăvirea a doi fii de 17 şi 15 ani. Băieţii s-au născut în urma evoluării normale a sarcinilor şi naşterilor fiziologice. S-a observat dezvoltarea timpurie normală a copiilor. Primele simptoame care au început să îngrijoreze părinţii au fost: dificultăţi în alergare, complicaţii în cadrul orelor de cultură fizică în şcoală în comparaţie cu alţi copii. La 13 ani, fratele mai mare, iar la 12

ani, fratele mai mic au început să obosească mai repede la efort fizic, să aibă probleme la urcarea scării, în acelaşi timp observându-se mărirea grosimii şi densităţii muşchilor gastrocnemieni.

La 15 ani, băiatul mai mare a crescut considerabil şi dificultăţile pe care le avea au devenit mai vizibile, el deja nu mai putea: merge pe distanţe mari, înota mult timp, să urce scările fără a se ţine de balustradă. La 16 ani, au apărut primele simptoame de miastenie a muşchilor centurii scapulare, era greu de ridicat de pe scaun. La vârsta de 17 ani, feciorul mare, iar la 15 ani cel mic, au fost internaţi în clinică.

În cadrul investigaţiei statutului neurologic al fratelui mai mare, s-a stabilit diminuarea forţei muşchilor: deltoizi, zimţaţi şi trapezi (2), pectorali (3), triceps brahial (2), biceps (3). Forţa labei mâinii s-a păstrat.

Muşchii centurii pelviene erau considerabil atrofiaţi, mai ales cei ai coapsei, forţa lor era redusă în limitele 2, mişcările active sunt posibile doar în cazul echilibrării greutăţii membrelor. Forţa grupului tibial al gambei – 2, grupului peronier – 2, flexorilor degetelor piciorului –3, tălpile sunt cianotice, umede. Reflexele tendinoase nu se observă. Copilul se ridică cu greu din poziţia "culcat". Mersul este tipic "de raţă". Din pirostrii el se ridică cu ajutorul mâinilor (procedeele lui Gowers). Pseudohipertrofiile muşchilor gastrocnemieni sunt pronunţate. Dezvoltarea psihică este obişnuită, însuşeşte cu succes programul şcolii generale.

Fratele mai mic avea aceleaşi modificări neurologice.

Nivelul CFC în serul sangvin la fratele mai mare era de 3152 un., iar la cel mic – 5716 un. La mama şi tatăl băieţilor s-au depistat majorări neînsemnate ale nivelului CFC – 330 şi 360 un. respectiv.

Investigarea EMG a arătat prezenţa afecţiunilor primare ale muşchilor.

Analiza genealogică: atât din partea mamei cât şi a tatălui nu au fost depistate rude cu maladii neuro-musculare.

Mama şi tatăl probandului sunt de origine din diferite raioane ale republicii Moldova, astfel căsătoria înrudită era exclusă.

În rezultatul analizei acestei familii în baza datelor obţinute, s-ar fi putut stabili diagnosticul: forma cingulară terminală a DMP de Centură, cu tipul autosom recesiv de ereditate.

Însă, efectuând analiza genetico-moleculară a acestei familii, a fost observată deleţia exonului 3 al genei distrofinei fără permutarea „conturului de citire" (fig. 31). În baza rezultatelor analizei genetico-moleculare a fost stabilit diagnosticul: DMP Becker, varianta intermediară.

Încă un exemplu de stabilire exactă a diagnosticului poate servi următoarul caz.

Familia G. Băiatul Alexei de 3 ani. Copilul de la a 4-a sarcină, născut la termen, naştere fiziologică. În pofida dezvoltării timpurii fără particularităţi patologice, a fost remarcată întârzierea începerii mersului sinestătător. La 2,5 ani, s-au observat schimbări în mers, acesta din urmă

căpătând un caracter "de rață" şi copilul a început să urce cu greu scara. La momentul examinării s-a evidențiat subatrofia muşchilor sectorului lombar al coloanei vertebrale, hipotrofia muşchilor distali ai membrelor, hipotonia generalizată a muşchilor. Forța muşchilor în limitele a 2 puncte. Mers pronunțat "de rață ". Procedeul Gowers pozitiv, nu se poate deplasa pe călcâie şi nu poate sări. Reflexele tendinoase sunt diminuate.

CFC în serul sangvin la proband – 418 un., la mamă – 266 un., la tată – 224 un.

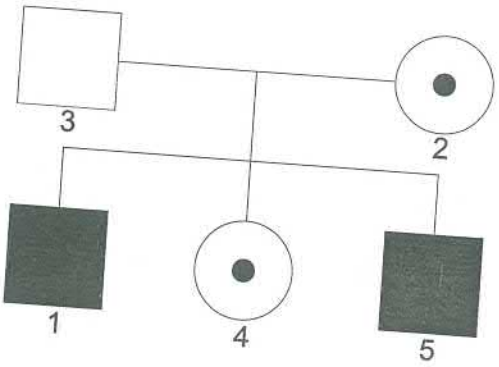
EMG – nivelul muscular primar de afectare.

Analizând datele acestei familii, noi observăm tabloul clinic tipic al DMP Duchenne cu demarare timpurie şi progresare relativ rapidă a procesului, dar cu un nivel relativ scăzut de CFC în serul sangvin şi lipsa nivelului ridicat de CFC la mama probandului. Bazându-ne pe cele expuse anterior, se poate presupune o DMP cu tipul autosom recesiv de ereditate. Însă, provoca dubii începutul timpuriu al maladiei.

În legătură cu aceasta a fost efectuat testul ADN în această familie. Căutarea directă a deleţiilor extinse prin metoda RPLM nu a dat rezultate: nu am identificat deleţii în gena distrofinei. Testul indirect – testul înlănțuirii (testul PLFR după saiturile polimorfe intragenice pERT87-8/Tag1 şi 16intron/Tag1) a demonstrat informativitate după saitul 16intron. A fost determinată mutația exactă, provenită din ovocite în perioada ovogenezei (fig. 30, b).

În consecință, în baza analizei genetico-moleculare a familiei s-a putut stabili diagnosticul DMP Duchenne.

A



B

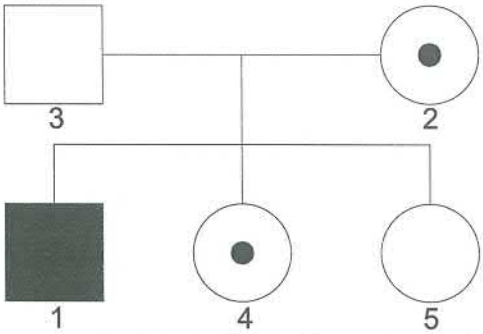


Fig. 32. **A.** Genealogia şi electroforegrama familiei C după pERT87-8/Tag1. Diagnosticul preclinic.
B. Genealogia şi electroforegrama familiei D după pERT87-8/Tag1. Diagnosticul prenatal. Fetiţă (4) – heterozigotă după saitul de restricţie.

În două familii, diagnoza DMP Duchenne a fost stabilită preclinic pentru sibsul mai mic al probandului. La momentul investigării, manifestări clinice ale maladiei la sibşi nu se observau, sibşii se găseau în primul stadiu de evoluare a bolii. Efectuînd diagnosticul ADN în familii, noi am stabilit prezenţa aceleiaşi mutaţii atât la copilul fenotipic sănătos (la momentul dat), cât şi la copilul bolnav. Prin urmare, noi am putut face presupunerea, că, cu timpul, la sibsul "sănătos" se va dezvolta tabloul DMP Duchenne (fig. 32).

Pronosticarea tabloului clinic în dependenţă de tipul mutaţiilor DMP Duchenne/Becker

După cum s-a menţionat, e stabilit alelismul genelor DMP Duchenne şi DMP Becker . La fel a fost subliniat că ambele maladii sunt condiţionate de mutaţiile genei distrofinei . În 1988, A.Monaco a propus ipoteza "conturului de citire", pe baza căreia se explică diferenţa dintre două tipuri de miodistrofii.

Noi am efectuat analiza a 105 deleţii independente în locusul DMP Duchenne/DMP Becker şi am făcut o tentativă de pronosticare a gravităţii evoluării bolii în dependenţă de tipul deleţiei mutante. Depistând o anumită deleţie, noi determinam tipul graniţei exon-intronice în dependenţă de poziţia în codificarea tripletelor şi identificam prezenţa sau lipsa deplasamentului (rupturii) "conturului de citire" după tabelul prezentat de Roberts R.G. în 1993. De asemenea, cunoaşterea structurii proteinei distrofina, permite prognozarea evoluării procesului patologic.

Analizând cazurile familiilor cu PMD Becker (în total 10 familii), noi am observat că, în 5 cazuri, testul ADN cu utilizarea metodei RPLM a arătat lipsa deleţiilor în gena distrofinei. În cele 5 cazuri rămase, au fost

depistate deleții (exonii 52, 43, 45-47, 3) ce nu provoacă deplasarea cadrului de calcul. În cazul dat s-a observat confirmarea teoriei "conturului de citire".

Analizând cazurile familiilor cu DMP Duchenne (în total 72 familii), noi am obținut următoarele date: 27 din 69 (39%) bolnavi cu DMP Duchenne aveau deleții ce depăşeau cadrul de calcul (out-of-frame deletions), prin urmare, se poate presupune un fenotip grav. Însă, 28 (40,57%) bolnavi cu DMP Duchenne aveau deleții ce nu depăşeau cadrul de calcul (in-frame deletions), astfel, se poate presupune un fenotip uşor. Dar la 9 bolnavi din 28 s-au observat deleții mari, ce cuprind câțiva exoni, din care cauză la ei se produce proteină puțin capabilă de a-şi realiza funcțiile. Prin urmare, la aceşti bolnavi se poate de aşteptat un fenotip grav. La 14 (20,28%) bolnavi cu DMP Duchenne nu s-au depistat deleții.

Astfel, numai în 58,23% cazuri la bolnavii cu DMP Duchenne/Becker, investigați de noi, s–a observat confirmarea teoriei "conturului de citire".

Manifestarea clinică a delețiilor mici a scos în evidență, în mod neaşteptat o variabilitate înaltă pentru unii şi aceeaşi exoni. De exemplu, 12 bolnavi cu DMP Duchenne au avut deleții ale exonului 45, însă la ei s-au observat dereglări de diferit grad în mişcare la momentul investigației noastre. Aceasta poate fi explicat prin faptul că, posibil, la un proces malign mai pronunțat, deleția exonului 45 captează exonul 46, deleția căruia duce la depăşirea "conturului de citire" şi, respectiv, la o evoluare malignă mai gravă.

În 6 cazuri, la bolnavii cu DMP Duchenne deleția cuprindea un exon şi nu ducea la depăşirea cadrului de calcul, în acest caz, respectiv, se poate presupune evoluarea benignă a maladiei la aceşti bolnavi.

În lucrarea noastră, însă, realizarea unei corelații numai în baza unor aşa criterii ca timpul manifestării primelor simptoame (de obicei, vârsta medie a primelor manifestări este de 6-7 ani, s-au observat şi 2 cazuri de stabilire mai timpurie a diagnosticului) şi gradul dereglărilor în mişcări, la momentul examinării primare nu este rațional, deoarece e necesar de a analiza viteza progresării procesului şi vârsta când pacientul devine complet invalid, care şi sunt criteriile principale în clasificarea DMP Duchenne şi DMP Becker. Pentru aceasta e necesar de a efectua investigarea clinică a acestor bolnavi după 5-10 ani şi de a verifica pronosticările noastre, de a realiza corelația dintre tipul delețiilor şi manifestarea clinică, de a releva polimorfismul clinic al DMP Duchenne în baza diagnosticului genetico-molecular stabilit al DMP Duchenne. Posibil, în acest caz se va mări procentul confirmării ipotezei "cadrului de calcul". Astfel, la etapa dată, grație testului ADN, noi putem prognoza după tipul delețiilor, evoluarea procesului în 58,22% cazuri, ceea ce are o importanță mare în diagnostic.

Diagnosticul ADN prenatal al fătului în familiile cu miodistrofie Duchenne.

Localizarea şi clonarea ADNc al genelor deschide în diagnosticul maladiilor ereditare posibilităţi principiale, bazate pe cercetarea alelelor mutante la pacienţi, membrii familiilor lor sau la presupuşii purtători heterozigoţi ai mutaţiilor patologice. Aceasta, în măsură egală, se referă şi la diagnosticul prenatal, care poate fi realizat cu utilizarea metodelor analizei moleculare din cele mai timpurii stadii de dezvoltare a fătului. Prioritățile decisive ale diagnosticului molecular constau în caracterul unical al acestuia, posibilitatea utilizării pentru analiză a oricăror celule sau ţesuturi ce conţin ADN, analiza putând fi efectuată la orice stadii ale ontogenezi, începând cu stadiul zigotei.

Primul nostru pas după stabilirea clinică a diagnozei constă în examinarea moleculară complexă a tuturor membrilor familiei în scopul determinării posibilităţii diagnosticului prenatal în familie. Aceste investigaţii sunt de lungă durată şi, de aceea, noi le efectuăm până la apariţia sarcinii. Rezultatele examinării moleculare a familiei servesc ca bază pentru prescrierea şi alegerea mijloacelor de diagnosticare prenatală. Toate familiile sunt informate despre posibilitatea efectuării diagnosticului prenatal. După aceasta, familia planifică sarcina şi la anumit termen femeia vizitează Centrul Medico-Genetic pentru efectuarea procedurii de colectare a ţesuturilor de origine fetală, necesare pentru diagnostic.

Primul trimestru de graviditate (săptămâna 10-12) este optimal pentru diagnosticul prenatal, deoarece în cazul unei prognoze nefavorabile sarcina poate fi întreruptă prin avort medical obişnuit. Deseori, diagnostica moleculară se efectuează şi în al doilea trimestru de graviditate (de obicei în săptămâna 16-20). Mostrele necesare de ADN fetal se extrag din bioptatul corionului, celulele lichidului amniotic (amniocite) .

Noi am efectuat diagnosticul prenatal al DMP Duchenne în 10 familii cu risc sporit, deşi la consultaţia privitoare la riscul naşterii copilului bolnav s-au adresat 14 familii (fig.33).

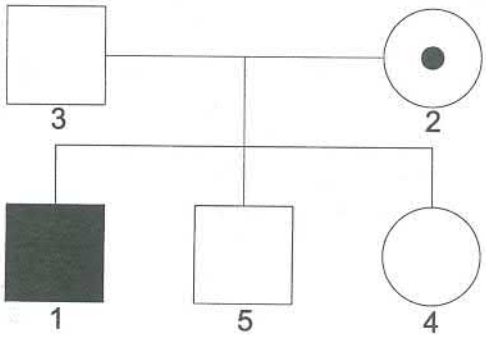


Fig. 33. Genealogia şi electroforegrama familiei informative după pERT87-8/Tag1. Diagnosticul prenatal. Fătul (5) de gen masculin – sănătos.

În 3 cazuri, mama viitorului copil era sora probandului, în celelalte cazuri, s-au adresat mame care deja aveau un copil bolnav.

După cum se vede din datele expuse, în 7 cazuri, fătul era de gen masculin, prin urmare, dacă nu se efectua investigarea genetico-moleculară, riscul naşterii copilului bolnav ar fi fost de 50% şi mamelor li s-ar fi recomandat întreruperea sarcinii. Însă, după cum se vede din rezultatele noastre, în 4 cazuri din 7, s-a stabilit că băiatul este genotipic sănătos şi mamelor li s-a recomandat să-şi continuie sarcina. Într-un caz, familia era complet neinformativă atât după polimorfismele propuse, cât şi după deleţii, astfel riscul naşterii copilului bolnav a rămas la 50%. În alte 2 cazuri, la făt a fost depistată deleţia (fig. 34), ca la fraţii săi şi fătul era hemizigot după alela mutantă.

În ce priveşte feţii de gen feminin, toate fetele erau fenotipic sănătoase, iar genotipic, una nu era purtătoare heterozigotă, pe când altele două erau purtătoare heterozigote. Prin urmare, în viitor, acestea vor trebui să efectueze diagnosticul prenatal.

Astfel, în rezultatul diagnosticului prenatal, efectuat cu ajutorul analizei moleculare a materialului fetal, obţinut prin intermediul corionbiopsiei şi amniocintezei – în 7 cazuri din 10, femeilor li s-a recomandat să-şi continuie sarcina; în două cazuri, diagnosticul s-a confirmat şi s-a recomandat întreruperea sarcinii. Într-un caz, riscul naşterii copilului bolnav a rămas la 50% din cauza neinformativităţii familiei.

Din toate mijloacele existente de diagnostic prenatal, metodele bazate pe analiza ADN sunt cele mai precise, deoarece ele scot în vileag dereglările primare în structura genelor. Însă, chiar şi în aceste cazuri, decizia finală despre sănătatea viitorului copil, deşi se apropie de veridicitatea absolută, totuşi, poartă un caracter probabilistic. Sursa principală de erori în efectuarea diagnosticului prenatal este contaminarea posibilă a materialului fetal, utilizat pentru stabilirea diagnosticului, cu alte ţesuturi, în primul rând de provenienţă maternă. De aceea, imediat după colectarea materialului diagnostic, prin biopsia corionului, la noi în centru se efectuează evaluarea minuţioasă a acestuia cu utilizarea diverselor metode de laborator.

Contaminarea materialului este deosebit de periculoasă în cazurile când prognoza se face în baza analizei fragmentelor amplificate de ADN. Celulele de provenienţă străină nimerite în mostrele testate pot servi drept sursă de ADN pentru RPL şi, astfel, pot cauza un diagnostic incorect. Noi am diminuat substanţial riscul unor astfel de erori, lucrând în condiţii sterile şi efectuând analize în câteva probe paralele. Desigur, în orice centru diagnostic, sunt posibile erori de laborator, de ordin pur tehnic ce nu depind de metodele de testare utilizate. Însă, veridicitatea prognozării bazate pe analiza directă a mutaţiilor, de obicei depăşeşte 99%. La utilizarea metodelor indirecte de diagnostic molecular, apare riscul unei

erori adăugătoare legate de posibilitatea recombinării dintre alela mutantă şi locusul marcher. Noi utilizăm marcheri a căror frecvenţă de recombinare nu depăşeşte 5%.

În cazul prognozei nefavorabile privind sănătatea viitorului copil, decizia despre întreruperea sau continuarea sarcinii le aparţine părinţilor, în baza rezoluţiei prezentate lor. După naştere, noi realizăm verificarea diagnosticului prin toate metodele accesibile, inclusiv şi a celor utilizate în diagnosticul prenatal.

UNELE CONSIDERAȚII ÎN STUDIUL DMP

Maladiile neuromusculare reprezintă una din cele mai actuale probleme ale neurogeneticii contemporane. Actualitatea studiului problemei este dată de aspectele medico-biologic şi medico-social ale maladiilor din grupul dat. Polimorfismul clinic larg, heterogenitatea genetică alimentează persistența erorilor de diagnostic şi dificilează în efectuarea diagnosticul diferențial. Nu este de neglijat nici gradul sever de handicap al pacienților ce suferă de o maladie neuro-musculară, ceea ce duce la o disadaptare şi disabilitare socială. Handicapul fizic este deseori însoțit de perturbări grave ale funcțiilor simbolici, ceea ce agravează şi mai mult starea generală.

Maladiile neuro-musculare au în bază defectul molecular penetrant în pedigree prin diferite căi de transmitere. Sarcina descifrării lor se complică şi prin faptul că aceiaşi entitate nosologică se întâlneşte sub diferite căi de transmitere: autosomal dominant, autosomal recesiv şi legată de sex. Această particularitate de o potrivă cu prezența unor fenocopii de geneză somatică, dificiliază şi mai mult diagnosticul, ceea ce se reflectă negativ în strategia curativă şi veridicitatea pronosticului.

Esența estimării clinice a maladiilor neuro-musculare are ca bază ştiințifico-practică studiul polimorfismului clinic. Anume aceasta problemă la diferite etape a atras atenția mai multor savanți. Interacțiunea particularităților ereditar-genetice cu cele ale mediului ambiant a fost, pe de o parte una din laturile ipotezei de explicare a polimorfismului clinic. Pe de altă parte, genocopiile diferă de esența conceptului dat şi îşi caută rezolvarea în studiul particularităților de mutație şi caracterului genei patologice. Un rol important în lămurirea corelațiilor genotip-fenotip i se atribuie caracterului şi localizării deleției. În acest sens a fost lansată ipoteza "conturului de citire" a lui Monaco. În dependență de particularitățile "conturului de citire" expresia maladiei va fi diferită – DMP Duchenne sau DMP Becker. Se atribuie un rol şi ipotezei "doza genelor". Astfel, polimorfismul până la sfârşit nu depinde numai de gena patologică dar de genotipul în întregime, de modul şi gradul de activare a genelor modificătoare. Deci, polimorfismul clinic rezultă din particularitățile patogenice atât interfamilial, cât şi, paralel, cel intrafamilial, care desigur nu poate fi negat. Unul din indicii de bază ai polimorfismului se apreciază prin vârsta de debut şi particularitățile de manifestare ale primului simptom. Aceste caractere sunt rezultatul expresiei activității unor gene, care accelerează evident procesul dat, altele, din potrivă, au o acțiune de inhibare.

Nu lasă dubii afirmarea lui V. Dubowitz, că mediul ambiant nefavorabil joacă rolul de trigger, ducând la dezinhibiția unor sau altor procese. În

astă optică se înscriu următoarele caracteristici ale polimorfismului clinic: celeritatea, gradul de evoluție şi prevalență simptomatologiei neurologice. Tabloul clinic al maladiei nu este identic la diferite etape de evoluție şi la diferiți indivizi. Aceasta se poate explica prin prisma ipotezei heterogenității genetice. Diferite gene duc la apariția şi influențează evoluția ei. Astfel, cunoaşterea polimorfismului are un rol important în studiul patologiei neuro-musculare contribuind la identificarea tipului de transmitere ereditară, la caracterizarea morfologică, neuro-fiziologică şi biochimică. Totalitatea particularităților clinice contribuie sugestiv la aprecierea indicilor şi importanței lor în diagnosticul diferențial.

Deşi există unele studii clinice până astăzi rămân neelucidate criteriile de diagnosticul diferențial raportate la diferite etape de evoluție a maladiei. În acelaşi sens lipsesc criteriile date în procesul de diferențiere a maladiilor similare cum sunt DMP Duchenne, Becker, de centură sau FSH.

Studiul nostru s-a focalizat asupra cercetării în dinamică a diferitelor forme de DMP. Caracteristica sinoptică a lotului de pacienți scoate în prim plan simptomatologia de disfuncție motorie. Caracteristic pentru întreaga selecțiune este alterarea paternului muscular selectiv, ceea ce, la diferite etape de evoluție, are o expresie clinică concretă. Particularitatea esențială clinică este distabilitarea motorie cu diferit grad de prevalență la diferite etape de evoluție. S-a constatat însă ca paternul muscular concret având o expresie clinică, determină limitele indicilor diagnosticului diferențial al nosologiei concrete. Studierea etapelor de evoluție a dereglărilor motorii în general a arătat că în debut aceste afecțiuni inițiază un proces uşor compensator cu posibilități nelimitate ale bolnavilor la autodeservire şi la efectuarea unui lucru fizic. Deficitul motor se conturează cert doar la efort îndelungat sau la suprasolicitare. Etapa moderată de evoluție se caracteriza prin schimbări ale funcțiilor motorii şi ortostatice. Este important că în această perioada se metamorfozează şi sunt evidente caracterele de bază ale maladiei: ținuta, mersul. Dereglări motorii grave însoțite şi de cele statice se constată la etapa de decompensare. Tabloul clinic se caracterizează prin apariția asteniilor şi contracturilor tendinoase severe.

DMP Duchenne reprezentată de un lot de 78 pacienți, exclusiv băieți, s-a caracterizat prin debutul simptomatologiei în limitele de vârstă de la 2 la 7 ani. Conform gradației manifestărilor clinice, sublotul pacienților cu manifestări uşoare se caracteriza prin proces involutiv a funcțiilor motorii cu antrenarea a paternului muscular proximal. Simptomatologia de inițiere a maladiei apare pe fondul unui retard de dezvoltare motorie a copilului în anamneză. Lentoarea în mers cu căderi frecvente, ne motivate şi asteniile constituiau esența acuzelor. Evoluția maladiei s-a caracterizat prin extinderea descendentă a procesului miodistrofic. Simptomatologia neurologică purta un polimorfism mai larg caracterizat

prin prezența hipotrofiilor musculare, pseudohipertrofia m. gastrocnemieni, apariția simptomelor de dereglări de statică. Stadiul ulterior se caracteriza prin prezența unui stop generalizat al funcțiilor motorii, el inducând modificări caracteristice scheletice cu diminuarea expresiei pseudohipertrofiilor şi antrenarea în procesul miopatic a musculaturii faciale.

În comparație cu DMP Duchenne, DMP Becker se caracterizează cu un debut mai tardiv (6-12 ani). Ea era similară cu cea precedentă după sex, sublotul fiind constituit în exclusivitate din băieți. Expresia tabloului clinic a fost marcată de prezența unui deficit motor uşor pronunțat cu interesarea paternului muscular proximal. Simptomatologia difuză neurologică se atesta prin abolirea reflexelor, şi amiotrofii minimale. Etapele ulterioare de evoluție se caracterizau prin accentuarea simptoamelor difuze motorii în asociere cu cea a amiotrofiilor şi cu interesarea ulterioară a musculaturii centurii scapulare.

Deosebirea esențială al sublotului de pacienți cu DMP de centură era prezența unui polimorfism larg intranosologic. În acest cadru se atestă variații considerabile ale vârstei de debut de la 2 la 25 de ani. Este sugestiv şi caracterul clinic al primului simptom şi, în continuare, al sindromului neurologic major. În marea majoritate a cazurilor expresia clinică rezulta din simptomatologia degenerescenței paternului muscular al centurii pelviene. Astenii musculare, dese căderi, cu o agravare la efort fizic formau esența acuzelor pacientului în perioada de debut. Tabloul clinic devine mai amplu prin *"scapulae alatae"*, hiperlordoză lombară cu hiporeflexie a membrelor. Manevra Gowers pozitivă în asociere cu mers legănat semnalează etapa moderată a evoluției maladiei. Modificările scheletice confirmau starea funcțională a pacientului. Procesul miodistrofic la etapele grave de evoluție purta un caracter generalizat, accentuat, cu implicarea în proces a paternului muscular facial. Alterarea sistemului scheletic evidențiază fenotipul pacientului şi exprimă gravitatea simptomatologiei dominante.

Ca şi în sublotul precedent, la bolnavii cu DMP FSH vârsta debutului era variată de la 4 la 14 ani. Însă, spre deosebire de subloturile anterioare acest sublot se distingea prin paternul musculaturii implicate inițial în proces. Mm. *orbicularis oris şi orbicularis oculi* erau muşchii alterați electiv de procesul miodistrofic, cauzând tabloul clinic specific cu hipomimie, "buze de tapir", râs transversal. Paralel cu simptomocomplexul facial să determină şi amiotrofii în centura scapulară. Sub aspect de diagnostic diferențial, este distinctiv şi caracterul progresării maladiei. În marea majoritate a cazurilor maladia avea un caracter staționar sau lent progresiv cu antrenarea treptată a muşchilor centurii scapulare şi celor proximali ai brațelor. Astfel, răspândirea procesului miodistrofic are un caracter descendent, antrenând în stadiile finale musculatura corporală, pelviană şi femurală.

Caracteristica de ansamblu a sistemului muscular în procesul examenului clinic obiectiv varia în dependență de forma nosologică şi etapele de evoluție a maladiei. Astfel cele mai vădite schimbări au fost semnalate pentru pacienții din grupul cu DMP Duchenne.

Etapele de debut al maladiei se caracterizau prin apariția unor hipotrofii neînsemnate, predilect, în musculatura proximală a membrelor inferioare cu o localizare simetrică şi cu o progresare în evoluție.

În perioada etapei de desfăşurare a simptomatologiei clinice se atestau predominări simetrice ale pseudohipertrofiilor musculaturi gambelor, se formau retracții ale tendonului Achille. Paralel apăreau hipotrofii ale musculaturii tronculare şi a brațelor. Este important că trecerea etapei clinice moderate în cea severă este însoțită de desfăşurarea generalizată a procesului de atrofie cu diminuarea pseudohipertrofiilor şi apariția contracturilor în articulațiile mari.

Forma Becker avea o particularitate comună de evoluție obiectivă a sistemului muscular pe parcursul escaladării etapelor maladiei. Ca particularitate diferențial diagnostică semnificativă serveşte vârsta debutului, celeritatea de evoluție a procesului miodistrofic şi gradul de predominare a hipotrofiilor musculare. Raportul între vârstă, gradul de evoluție şi predominare a schimbărilor miodistrofice sunt indicii de clasificare a nosologiei studiate.

Din contra, pentru pacienții cu forma DMP de centură este caracteristică declanşarea în debut a hipotrofiilor, deasemenea simetrice, însă cu localizarea în muşchii centurilor. Modificările ulterioare se caracterizau prin aprofundarea gradului de expresie a amiotrofiilor. Extinderea procesului deasemenea poartă atât un caracter ascendent cât şi descendent, cu generalizare şi interesarea, în stadiile avansate, a musculaturii faciale. O latură deasemenea specifică în diagnosticul diferențial al DMP Duchenne şi DMP de centură este gradul cu mult mai redus de prevalență a pseudohipertrofiilor, în unele cazuri şi lipsa lor complectă.

Examenul obiectiv sublotul pacienților cu DMP FSH a revelat schimbări musculare patognomice în dependență de etapa de evoluție. La inițierea procesului miodistrofic s-au evidențiat hipofuncții minimale în musculatura facială, ceea ce se constată la probe de efort, cu prevalență expresiei lor în etapele ulterioare, odată cu interesarea musculaturii scapulo-humerale în etapele mai tardive. Putem afirma că interacțiunea indicilor de apreciere a gradului de prevalență şi topografia musculaturii implicate în procesul patologic fac arsenalul de diagnostic diferențial cu celelalte forme nosologice.

O altă latură a studiului a fost cercetarea morfologică a țesutului muscular alterat. În acest scop au fost studiate 54 de bioptate musculare prelevate la 38 de pacienți cu diferite forme de distrofii musculare progresive.

Cele mai pronunţate schimbări au fost detectate în sublotul bolnavilor cu DMP Duchenne. În stadiile incipiente tabloul morfologic se caracteriza prin prezenţa fibrelor atrofiate. Schimbările distrofice sunt mai evidente sub forma de combinare a fibrelor musculare atrofiate şi hipertrofiate. În fibrele intacte s-au constatat modificări tinctoriale, manifestate prin colorarea neuniformă. Reacţiile compensatorii se caracterizau prin hipertrofia unor fibre şi reacţii de regenerare mai pronunţate în apropierea focarelor de necroză.

Cu evoluarea maladiei creşte raportului între fibrele atrofiate şi cele hipertrofiate, apar focare de necroză cu substituirea parţială a ţesutului muscular cu ţesut conjunctiv şi adipos. În stadiile mai avansate continuă fragmentarea şi necroza miofibrilelor, apar focare de distrofie vacuolară, între fibrele atrofiate se observă infiltrarea cu limfocite. Concomitent se vizualizează procese de regenerare sub forma de regrupare nucleară. Fibrele regenerative formează grupe mici, au nuclee gigante şi o striaţie transversală slab pronunţată. Focarele de ţesut conjunctiv şi adipos sunt extinse şi pe alocuri substituie total ţesutul muscular.

Un interes deosebit prezintă schimbările morfologice legate de alterări vasculare. Astfel, la etapele iniţiale se surprinde formarea microtrombilor parietali în vasele de calibru mediu cu revascularizarea lor ulterioară prin formare în lumenul vasului obturat a unor vase de calibru mai mic. În jurul vaselor se constată aglomerare de celule şi dezintegrare a ţesutului adiacent. În capilarele de calibru mic se observă fenomene de stază. Se găsesc vase de calibru mijlociu cu peretele subţiat şi elemente sanguine (eritrocite) în afara vasului, care imbibă ţesutul muscular. În stadiile de manifestări clinice moderate se determină modificări, vasculare care se exprimă prin îngroşarea peretelui vascular şi reducerea fibrelor elastice şi de colagen, cu prevalenţa celulelor netede.

Predominarea modificărilor vasculare şi apariţia a mai multor vase trombotice se observă în stadiile avansate ale maladiei. Formarea micro- şi macrotrombilor parietali şi obturativi duc la instalarea hipoxiei şi la dezvoltarea modificărilor vasculare manifestate prin extravasarea prin diapedeză a eritrocitelor. Paralel se vizualizează zone extinse de eritrocite aflate la diferite etape de dezintegrare.

Astfel, procesul miodistrofic este însoţit de modificări vasculare începând cu etapa de debut. Datele descrise permit să presupunem o nouă viziune asupra conceptului de morfogeneză a procesului miodistrofic. Paralel cu dezintegrarea şi degenerarea miofibrilelor şi necrotizarea lor, se aprofundează şi are loc dezintegrarea morfofuncţională a vaselor cu extravazarea eritrocitelor. Proliferarea ţesutului conjunctiv, mai cu seamă în jurul vaselor, rezultă în comprimarea şi obliterarea lumenului lor. Hipoperfuzia duce la instalarea hipoxiei tisulare, ceea ce ulterior provoacă activarea fibroblaştilor, care la rândul

lor contribuie la extinderea ţesutului conjunctiv. Infiltrarea ţesutului muscular cu elemente sanguine posibil induce unele reacţii autoimune, care conspiră şi ele în morfogeneza procesului miodistrofic.

În cazurile de DMP Becker tabloul morfologic, în linii mari îl copie pe cel descris pentru DMP Duchenne. În stadiile iniţiale se constată variabilitate în diametrul fibrelor musculare, se menţionează o alternanţă a fibrelor musculare atrofiate şi hipertrofiate, fragmentarea şi edemul lor, contururi neliniare. În stadiile avansate se observă creşterea masei ţesutului conjunctiv şi celui adipos, micşorarea numărului de miofibrile printre care predomină cele atrofiate. Procesul regenerativ se derulează la periferie la nivelul grupării nucleelor în formă de mioblaşti. Modificările vasculare sunt similare cu cele descrise în cadrul DMP Duchenne, însă sunt mai puţin accentuate.

Modificările histologice ale fibrelor musculare în stadiile incipiente ale DMP de centură se manifestă prin particularităţi neînsemnate ale fibrelor musculare, unele din ele fiind atrofiate, altele, având acelaşi diametru ca şi cele normale. Aspectul interior al unor fibre era modificat. Ulterior, cu progresarea procesului miodistrofic, miofibrile devin uşor dilacerate, nucleele neuniforme, formând fâşii de diferite dimensiuni localizate la periferia fibrelor musculare. Proliferarea ţesutului conjunctiv nu este pronunţată. În unele cazuri se constată fibre musculare cu aspect serpiginos, de diferite grosimi. Totodată se întâlnesc şi procese de regenerare în apropierea focarelor de necroză. În stadiile de manifestări clinice moderate numărul fibrelor atrofiate se măreşte considerabil, predomină fibre musculare cu focare de intumescenţă fibrinoidă şi hialinoză, dezvoltarea ţesutului conjunctiv poartă un caracter difuz, cu multiple focare de elemente celulare. Apar fibre musculare regenerative, în unele din ele se observă noi focare de modificări degenerative diverse ale fibrelor musculare. În stadiile cele mai avansate fibrele musculare atrofiate sunt înconjurate cu ţesut conjunctiv şi lipomatos interstiţial, apare o transformare liposclerotică. Ţesutul conjunctiv conţine fibre solitare puternic atrofiate.

La studierea histologică a mostrelor musculare prelevate la pacienţii cu DMP FSH s-a constatat variabilitate de diametru al fibrelor musculare, nuclee celulare situate central. Printre fibre musculare normale se găseau fibre cu conturul neclar, dilacerate, unele erau hipertrofiate, altele atrofiate (predominând cele atrofiate). În fibrele musculare se observă edemul, regruparea miofibrilelor. Procesul de distrofie şi necroză a fibrelor musculare era mai puţin evident decât în formele descrise mai sus. În locul distrofiei şi necrozei se observă proliferarea ţesutului conjunctiv cu infiltrare limfocitară. Semnele de regenerare erau moderat pronunţate.

Astfel, în procesul studiului s-a demonstrat că tabloul morfologic în fiecare caz poartă un caracter individual şi depinde în mare măsură de

forma nosologică şi etapele de evoluţie a maladiei. Însă, la întreaga selecţiune s-au constatat schimbări relativ, identice, caracteristice pentru procesul distrofic, cum sunt combinarea în stadiile incipiente focarelor de fibre atrofiate şi celor hipertrofiate, regruparea nucleară, ca indice al proceselor de regenerare. Pe măsură evoluţiei maladiei procesele date au o tendinţă spre o diminuare, încep a predomina fenomenele de dezintegrare a ţesutului muscular, înlocuirea lui cu cel conjunctiv şi adipos.

Mult mai evidente aceste schimbări sunt în cadrul DMP Duchenne. Paralel cu procesul de degenerescenţă a miofibrilelor şi substituirea lor cu ţesut conjunctiv şi celui adipos, se constată schimbări interesând şi peretele vascular. Schimbările vasculare apar în perioada de iniţiere a simptomatologiei clinice purtând elemente de stază cu formarea ulterioară de microtrombi pe un fond de modificăre a peretelui vascular cu diminuarea stratului muscular al vasului, perturbarea barierei vasculare şi creşterea permeabilităţii sale. Este evidentă extravazarea eritrocitelor şi posibil a altor elemente sanguine. Acest proces este însoţit de o sintetizare abundentă de ţesut conjunctiv în continuitate. Ulterior, în timp, are loc îngroşarea şi formarea unui manşon conjunctiv împrejurul vaselor cu micşorarea până la obturarea lumenului vascular. Procesele date posibil au un rol important în patogenia formei date de DMP.

După datele literaturii maladiile neuro-musculare reprezintă cea mai răspândită grupă din totalitatea patologiei ereditare. Deoarece până în prezent nu au fost elaborate metode efective de tratament, toate forţele trebuie să fie îndreptate la prevenirea apariţiei cazurilor noi de patologie în familiile în care deja sunt copii bolnavi. Actualmente cea mai eficace metodă de profilaxie a distrofiilor musculare progresive este consultul medico-genetic, care cuprinde trei aspecte de bază: diagnosticarea, estimarea riscului, evidenţa familiilor din grupa de risc sporit şi efectuarea măsurilor profilactice.

Pentru maladiile ereditare diagnosticarea corectă are o importanţă majoră, deoarece de un diagnostic corect depinde şi estimarea gradului de evoluţie a maladiei şi prognosticarea riscului de afectare a altor membri ai familiei, precum şi spectrul de măsuri profilactice ce pot fi aplicate.

Este indiscutabil faptul că pentru maladiile neuro-musculare e caracteristic un polimorfism clinic larg, diagnosticul nosologic se stabileşte în câteva etape, utilizând mai multe metode: genealogice, clinico-neurologice, morfologice, neurofiziologice, biochimice.

Analiza genealogică şi reprezentarea ei grafică dă posibilitatea de a stabili modul de transmitere a maladiei, ceea ce uneori poate sugera diagnosticul şi determină programul ulterior de investigaţii.

La cercetarea clinică alături de examenul neurologic standard se atrage atenţia asupra gradului şi extinderii asteniilor musculare,

consistenței muşchilor, caracterului mersului, dinamicii funcțiilor motorii. Scara de cuantificare a funcțiilor motorii la pacienții cu distrofii musculare progresive permite supravegherea în dinamică a stării pacientului precum şi determinarea gradului de handicap. Astfel, scorul de 10-12 denotă o afectare uşoară a funcțiilor motorii, de 6-9 puncte - o afectare moderată, iar scorul de 0-5 – o afectare severă.

O importanță majoră în diagnosticul grupului dat de maladii o are studierea histologică a muşchilor afectați. În caz de un proces primar muscular, în tabloul histologic vor predomina astfel fenomene ca dezintegrarea şi necroza țesutului muscular, care în stadiile finale este subtotal substituit de țesut conjunctiv şi adipos. Reacția regenerativă de obicei este slab pronunțată şi se manifestă prin plasarea centrală a nucleelor.

Schimbările distrofice ce au loc în muşchi se reflectă şi asupra traseului EMG- amplitudinea potențialului unităților motorii scade, durata lui este relativ mică, însă creşte rata potențialelor polifazice. Pe acest fond pot fi vizualizate rafale pseudomiotonice şi fibrilații solitare. În aspect diagnostic diferențial cu neuropatiile ereditare se menționează că viteza conducerii impulsului electric prin nervii periferic nu este schimbată.

Nu trebuie de subestimat şi importanța analizei biochimice în diagnosticarea stărilor date. Dereglarea permeabilității membranei celulare este urmată de pătrunderea în patul sanguin a enzimelor celulare, nivelul cărora creşte de zeci de ori mai mare comparativ cu norma. Mai frecvent se recurge la determinarea creatinfosfokinazei. De menționat, că în maladiile cu o transmiterea genetică legată de sex, valori crescute se determină nu numai la bolnav, ci şi la rudele de sex feminin, în cazul în care ele sunt purtătore asimptomatice ale genei patologice. În cazurile date analiza biochimică poate servi ca metodă de screening pentru determinarea vectoarelor.

Astfel, diagnosticarea unei maladii neuro-musculare nu este o problemă simplă şi necesită ca medicul neurolog să posede anumite cunoştințe nu numai în domeniul neuro-geneticii, dar şi în material de morfologie şi neuro-fiziologie.

Stabilirea unui diagnostic autentic este primul pas în profilaxia maladiilor date. În legătură cu aceasta, o importanță deosebită o are însuşirea metodelor moderne de diagnosticare moleculară pentru utilizarea lor în practică medicală.

Toate cercetările în domeniul DMP Duchenne efectuate până în prezent în republică nu implicau un aşa vast domeniu ca analiza genetico-moleculară a familiilor cu risc sporit de DMP Duchenne şi analiza populațională.

În lucrarea propusă, a fost făcută încercarea de a investiga familiile cu DMP Duchenne din Republica Moldova de pe poziția unității metodelor clinico-genetice şi genetico-moleculare.

Cercetarea a fost efectuată sub 5 aspecte de bază:

1) Polimorfismele intragenice şi problemele genetice populaţionale.
2) Diagnosticul ADN direct – căutarea directă a deleţiilor ample a genei distrofinei la bolnavii cu DMP Duchenne din R. Moldova.
3) Determinarea purtătorului heterozigot.
4) Registrul bolnavilor cu DMP Duchenne şi banca de mostre ADN a membrilor familiilor cu DMP Duchenne, informativitatea familiilor şi diagnosticul prenatal.
5) Pronosticarea gravităţii evoluării maladiei în dependenţă de tipul mutaţiei.

Să examinăm amănunţit fiecare din aceste direcţii, luând în consideraţie rezultatele obţinute.

Se ştie că prima genă umană (gena daltonismului), a fost cartată pe cromozomul-X uman în anul 1911, iar prima genă autosomă, doar în 1968. Spre 1973, pe toţi cromozomii umani au fost cartate în total doar 64 gene, pe când, spre 1994, pe hărţile genetice au fost localizaţi mai mult de 60000 de ADN consecutivităţi marcher (în special fragmente de ADNc ale genelor expresate - EST), precum şi mai mult de 5000 de gene structurale complete. Datorită numeroaselor saituri polimorfe şi, mai cu seamă, marcherilor sateliţi, au fost create hărţile genetice detaliate ale fiecărui cromozom uman. Aceasta a permis trecerea de la maparea funcţională la cea pozitivă, adică maparea genelor noi nemijlocit pe harta fizică ADN a întregului genom. Perfecţionarea ulterioară a tehnologiei de secvenţionare, crearea procedeelor principial noi ce permiteau creşterea de zeci de ori a gradului de automatizare a acestui proces în centrele înalt specializate, ne dau speranţa că secvenţionarea întregului genom va fi terminată către anul 2006.

Dar, în nici un caz, odată cu terminarea acestui proiect grandios, "Genomul omului", cunoaşterea problemei în cauză nu ia sfârşit. De pe acum devine evident faptul că nu există un anume genom mediu uman, fiecare genom în parte, ca şi fiece om, este strict individual. Această individualitate se manifestă nu numai la nivelul personalităţii separate, dar şi la nivelul grupurilor etnice, naţiunilor, populaţiilor şi raselor. Ca sistem dinamic, genomul omului este foarte variat. Analiza acestei varietăţi constituie una din cele mai importante continuări ale programului "Genomul omului".

Diferenţe bine conturate se observă în saiturile intragenice polimorfe la juxtapunerea frecvenţelor alelelor dintre populaţii, precum şi dintre cromozomii normali şi mutanţi. Diferenţele din urmă reflectă înlănţuirea strânsă a acestor saituri polimorfe cu gena mutantă a distrofinei. Testul PLFR înfăptuit de noi al ADN-ului locusurilor pERT87-8/Tag1, 16intron/Tag1, pERT87-15/BamH1, înlănţuite cu DMP Duchenne a determinat, de rând cu particularităţile statistic veridice ale repartiţiei frecvenţei diverselor

alele ale locusurilor date în însăşi populaţia Moldovei, deosebiri veridice ale acestor indici în comparaţie cu populaţiile cercetate anterior. Analiza comparativă a polimorfismelor intragenice înlănţuite cu gena distrofinei pe cromozomii mutanţi şi normali, a stabilit un echilibru pronunţat privind înlănţuirea în sistemele pERT87-8/Tag1, 16intron/Tag1 şi lipsa echilibrului privind înlănţuirea în sistemul pERT87-15/BamH1, fapt ce are o importanţă practică mare atât în diagnosticul prenatal, cât şi postnatal al DMP Duchenne.

Spre deosebire de diagnosticul indirect, diagnosticul direct –căutarea directă a deleţiilor ample în gena distrofinei este un test cu o informativitate mai vastă. Noi am evidenţiat anumite particularităţi: rata depistării deleţiilor în gena distrofinei în populaţia Moldovei constituie 79,0%, ceea ce denotă o imprtanţă diagnostică înaltă a acestui test în populaţia dată. Analiza efectuată privind incidenţa deleţiilor în gena distrofinei a scos în evidenţă deosebiri statistic veridice în incidenţa deleţiilor la probanzii din populaţia moldovenească faţă de cei din populaţia rusă (X2=29,19) şi practic corespunderea frecvenţei deleţiilor cu cele din populaţia italiană (X2=0,07) (3.1.1). Cercetarea genogeografiei mutaţiilor genelor structurale ar permite formularea unui şir de ipoteze privind locul apariţiei lor, căilor de migraţie şi răspândire după grupurile etnice, ceea ce poate fi studiat ulterior.

Analiza raportului procentual de răspândire a deleţiilor în sectoarele proximal şi distal ale genei distrofinei a arătat corespunderea datelor noastre cu cele din literatura mondială. În populaţia Moldovei, s-a stabilit că punctul de rupere al genei este frecvent situat pe hotarul dintre exonii 44 şi 45. Cel mai frecvent în procesul deleţional se include exonul 45 – 19,4% cazuri.

Graţie creării de către noi a registrului regional computerizat şi băncii mostrelor ADN a familiilor cu DMP Duchenne cărora li s-a efectuat diagnosticul molecular al DMP Duchenne, noi putem studia necesităţile reale ale unei sau altei regiuni a ţării în diagnosticul molecular. În total, la noi, la evidenţă sunt 83 familii cu DMP Duchenne/Becker. La selectarea bolnavilor, noi am utilizat criteriile de bază ale diagnosticului clinic propuse de profesorul L.O.Badalean în 1984. Diagnosticul molecular a fost efectuat la 81 familii. Presupunem că registrul creat de noi va contribui la micşorarea numărului cazurilor de naştere a copiilor bolnavi în familiile care au fost supuse examinării genetico-moleculare în centrul nostru.

În cercetarea noastră, a fost efectuată analiza moleculară privind determinarea purtătorului heterozigot la 116 femei. Femeilor (92) din familiile informative le-am putut da răspuns afirmativ privitor la faptul dacă ele sunt purtători heterozigoţi cu exactitatea de 95%. Purtătorul heterozigot a fost stabilit la 81 femei (88%) şi respins la 11 femei (12%). Purtătorilor heterozigoţi li s-a recomandat efectuarea obligatorie a diagnosticului prenatal.

Bazându-ne pe teoria "conturul de citire" (A.Monaco), noi am analizat 105 deleții independente în gena distrofinei şi am făcut o tentativă de pronosticare a gravității evoluării maladiei, în dependență de tipul delețiilor.

La analiza familiilor cu diagnosticul clinico-genealogic stabilit al DMP Becker (10 familii), noi observăm că raportul dintre fenotipurile şi tipurile delețiilor în 100% cazuri coincide cu teoria "conturului de citire". Însă, analizând cazurile familiilor cu DMP Duchenne (72), noi am obținut următoarele date: 50% din numărul bolnavilor cu DMP Duchenne aveau deleții ce depăşeau cadrul de calcul (out-of-frame deletions) şi, prin urmare, la ei avea loc sinteza proteinei nestabile, nefuncționale, ceea ce presupune un fenotip grav, adică se confirmă teoria "conturul de citire".

Manifestarea clinică a delețiilor mici a scos în evidență, în mod neaşteptat, o variabilitate înaltă pentru unii şi aceiaşi exoni. De exemplu, 12 bolnavi cu DMP Duchenne au avut deleții ale exonului 45, însă la ei s-au observat dereglări de diferit grad în mişcare la momentul investigației noastre. Aceasta poate fi explicat prin faptul că, posibil, la un proces malign mai pronunțat, deleția exonului 45 captează exonul 46, deleția căruia duce la depăşirea "cadrului de calcul" şi, respectiv, la o evoluare malignă mai gravă. La etapa dată, cu regret, nu avem setul întreg de praimeri, necesar pentru analiza tuturor exonilor genei distrofinei (în particular, exonul 46).

În 6 cazuri, la bolnavii cu DMP Duchenne, deleția cuprindea un exon şi nu ducea la ruperea cadrului de calcul, corespunzător, se poate de presupus evoluarea benignă a maladiei la aceşti bolnavi.

Însă, în lucrarea noastră, realizarea unei corelații a manifestării clinice în dependență de tipul mutației, numai în baza timpului manifestării primelor simptoame (de obicei, vârsta medie a primelor manifestări este de 6-7 ani, s-au observat şi 2 cazuri de stabilire mai timpurie a diagnosticului) şi gradul dereglărilor în mişcări, la momentul examinării primare nu este rațional, deoarece e necesar de a analiza viteza progresării procesului şi vârsta când pacientul devine complet invalid. Pentru aceasta, e necesar de a efectua investigarea clinică a acestor bolnavi după 5-10 ani şi de a verifica pronosticările noastre, de a realiza corelația dintre tipul delețiilor şi manifestarea clinică, de a releva polimorfismul clinic al DMP Duchenne în baza diagnosticului genetico-molecular stabilit al DMP Duchenne. Posibil, în acest caz se va mări procentul confirmării ipotezei "conturul de citire".

Astfel, la etapa dată, grație testului ADN, noi putem prognoza după tipul delețiilor, evoluarea procesului în circa 60% cazuri, ceea ce are o importanță mare în diagnostic şi pronosticare.

Cel mai important rezultat practic al lucrării constă în evidențierea importanței practice atât a căutării directe a delețiilor în genă, cât şi a saiturilor polimorfe intragenice pentru diagnostica prenatală a DMP

Duchenne. În particular, s-a stabilit că în familiile cu risc sporit la DMP Duchenne cercetate de noi, analiza moleculară complexă transformă 93,82% familii în complet informative sau doar informative (4.2). Această poziție de bază mărește considerabil posibilitățile diagnostice ale metodelor moleculare în diagnosticul prenatal al DMP Duchenne/Becker în Moldova. Utilizând metodele directă și indirectă de diagnosticare moleculară a DMP Duchenne, precum și metoda citogenetică, noi am efectuat diagnosticul prenatal la 10 familii cu risc sporit la DMP Duchenne.

Autorul este departe de ideea că toate aspectele de bază ale problemei cercetate în teză sunt soluționate suficient de amplu. Cercetarea a evidențiat și multe alte laturi ce necesită o prelucrare științifică ulterioară. La acestea se referă asemenea chestiuni ca studierea polimorfismului clinic al DMP Duchenne în baza diagnosticului molecular-genetic al DMP Duchenne stabilit. De asemeni, noi am propune pentru viitor studierea DMP la femei cu scopul relevării particularităților citogenetice, în particular a translocațiilor, extinderea posibilităților laboratorului, introducerea metodelor noi de diagnostic molecular, de asemenea, efectuarea corelației dintre tipul mutației și evoluarea clinică a maladiei și verificarea pronosticării noastre.

După cum s-a menționat deja, diagnosticarea maladiilor date se efectuiază în mai multe etape, apelând la mai mulți specialiști, și utilizând o anumită serie de teste. Deoarece trebuie să existe o consecutivitate în aplicarea metodelor diagnostice a fost elaborat un algoritm de examinare și evidență a unui pacient cu patologie neuro-degenerativă care facilitează atât stabilirea diagnosticului cât și efectuarea diagnosticului prenatal și preclinic. Astfel, dacă prin metodele descrise mai sus la un individ, a fost confirmat diagnosticul, pacientul și familia sa sunt supuse unor investigații molecular-gentice pentru confirmarea definitivă a diagnosticului și depistării stării de purtător la rudele lui. Toate acestea vor permite constituirea grupelor de risc – familii, în care există o probabilitate crescută de naștere încă a unui copil bolnav. Ulterior medicul se ocupă de informarea și educația cuplului din grupa dată, pentru ca în caz de sarcină să se poată recurge la metode de diagnostic prenatal. Rezultatul pozitiv servește drept o indicație medicală de întrerupere a sarcinii. Astfel, va fi prevenită apariția cazurilor noi de patologie în familie și consecutiv în populație.

Deoarece în procesul diagnosticării și profilaxiei acestor patologii se recurge la serviciile altor laboratoare este important de creat unele legături strânse între centrul medico-genetic și serviciile respective. Altele structuri, care necesită să fie incluse în sistemul consultului medico-genetic sunt centrele de tratament și reabilitare. De menționat, că îngrijirea unui asemenea bolnav alături de cheltuielii materiale, mai impune și eforturi morale și fizice. Toate aceste inevitabil generează situații de conflict în

familie. De aceea, alături cu programul de reabilitarea medicală se propune şi organizarea centrelor de reabilitare socială şi psihologică.

Numai prin crearea unui sistem de consult medico-genetic, bine pus la punct, se poate ajunge la unele rezultate concrete în domeniul profilaxiei maladiilor date.

BIBLIOGRAFIE:

1. Augier N., Boucraut J., Leger J., Anoal M., Nicholson L.V., Voelkel M.A., Leger J.J., Pellissier J.F. A homologue of dystrophin is expressed at the blood vessel membrane of DMD and BMD patients: immunological evidence// J Neurol Sci. –1992. –V. 107. ą 2. –P. 233-8.

2. Blake D.J., Nawrotzki R., Peters M.F., Froehner S.C., Davies K.E. Isoforms diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein// J Biol Chem. –1996. –V.271. –P. 7802-7810.

3. Bowman R., James E. Screening Newborn Infants for Duchenne Muscular Dystrophy// The British Medical Journal. –1993. -Vol. 306. -ą 6874. –P. 349.

4. Bradley D.M., Parsons P.E., Clarke A.J. Experience with screening newborns for Duchenne muscular dystrophy in Wales. BMJ. –1993. –V. 306. -P.357-360.

5. Brenman J.E., Chao D.S., Xia H., Aldape K., Bredt D.S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy// Cell. –1995. –V.82. –P. 743-752.

6. Bushby K. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophy: Report of the ENMC consortium on limb-girdle dystrophies// Neuromusc Disord. –1995. –V.5. –P. 71-74.

7. Bushby K. The clinical, genetic and dystrophin characteristic of Becker muscular dystrophy// J. Neurol. -1993. -Vol. 240. -ą 1. -P.98-104.

8. Bushby K. The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms// Hum Mol Genet. –1999. –V.8. -ą 10 (Review Issue). –P.1875-1882.

9. Carrié J.A., Piccolo F., Leturcq F., et al. Mutational diversity and hot spots in the a-sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D)// J Med Genet. – 1997. –V. 34. -P. 470- 475.

10.Coral-Vazquez R., Cohn R.D., Moore S.A., Hill J.A., et al. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy// Cell. –1999. –V. 98. -ą 4. –P. 465-74.

11.Delaporte C., Dautreaux B., Rouche A., Fardeau M., Kaido M., Arahata K., Hoffman E.P., Nonaka I., Sugita H. Muscle histology in Becker muscular dystrophy// Muscle Nerve. –1991. –V. 14. -ą 11. –P.1067-73.

12.Drousiotou A., Ioannou P., Georgiou Th. et al. Neonatal screening for Duchenne muscular dystrophy: a novel semi-quantitative application of the bioluminescence test for creatin kinase in a pilot national programme in Cyprus//. Muscle & Nerve. –1998. -Supplement 7. -P.86.

13.Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M, et al. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy// N Engl J Med. –1997. –V. 336. –P. 618-624.

46.Дунаевская Г.Н. Структура диагноза нервно-мышечных заболеваний// Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. –1997. –Том 97. -№ 2. –С. 39-43.

47.Евграфов О.В. ДНК-диагностика и особенности медико-генетического консультирования// Медико-генетическое консультирование в профилактике наследственных болезней. – Москва, 1997. –С. 32.

48.Евграфов О.В., Гроппа С.А. ДНК-диагностика наследственных заболеваний. –Кишинёв, Штиинца, 1992. –24 с.

49.Евграфов О.В., Макаров В.Б. Диагностика миодистрофии Дюшенна с помощью зондов ДНК// Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. –1987. –Т. 87. -№ 11. –С. 1732-1736.

50.Иванова-Смоленская И.А. Клинические и молекулярно-генетические аспекты изучения наследственных заболеваний нервной системы// Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. –1996. –Том 96. -№ 1. –С. 29-33.

51.Иванова-Смоленская И.А., Маркоба Е.Д., Иллариошкин С.Н. Современные проблемы нейрогенетики (клинико-генетические и молекулярно-генетические аспекты)// Материалы первого (третьего) российского съезда медицинских генетиков. –Москва, 1994. –С. 160.

52.Копьёва Т.Н., Потомская Л.З. Скелетные мышцы при миопатиях// Архив патологии. –1980. –Т. XLII. -№ 1. –С. 78-80.

53.Копьёва Т.Н., Потомская Л.З. Скелетные мышцы при нервно-мышечных заболеваниях// Архив патологии. –1980. -№ 3. –Т. XLII. –С. 76-78.

54.Малыгина Н.А. Молекулярно-генетические исследования миодистрофии Дюшенна и Беккера. Корреляция тяжести заболевания с типом делеции// Молекулярная диагностика наследственных болезней и медико-генетическое консультирование. –1995. –Т. 2. –С. 5-13.

55.Преображенская И.С. Заболевания мышц и периферических нервов: некоторые аспекты патогенеза, диагностики и лечения// Неврологический журнал. –1997. -№ 1. –С. 59-62.

56.Тёмин П.А. Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна. Патогенез, диагностика, лечение, гормонально-обменных нарушений. –Автореферат диссертации доктора медицинских наук. –Москва, 1988. –103 с.

57.Тёмин П.А., Заваденко Н.Н., Каменных Л.Н., Никанорова М.Ю. Особенности диагностики прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. –1989. –Том 89. -№ 3. –С. 93-96.

Anexa 1

CRITERIILE DE DIAGNOSTIC AL DMP

Distrofia musculară Duchenne

Elemente de bază

1. Semnele apar până la vârsta de 5 ani.
2. Semnele clinice: miastenii simetrice progresive; muşchii proximali ai membrelor sunt afectaţi mai mult de cît cei distali; iniţial sunt afectaţi numai muşchii membrelor inferioare; mai frecvent este prezentă hipertrofia m. gastrocnemian.
3. Sunt excluse: fasciculaţiile, pierderile de sensibilitate.
4. Imobilizarea se produce până la vârsta de 13 ani
5. Creşterea activităţii creatinkinazei serice (CFK) minimum de 10 ori (în funcţie de vârstă şi mobilitate)
6. Biopsia musculară: se constată variaţii în diametrul fibrelor musculare (fibre atrofiate şi hipertrofiate), focare de fibre necrotice şi regenerative, fibre hialinizate, creşterea ţesutului endomisial conjunctiv şi adipos.
7. Biopsia musculară: distrofina nu poate fi demonstrată, cu excepţia unor fibre musculare (la mai puţin de 5% din fibre).
8. ADN: mutaţie de tip Duchenne în gena distrofinei, haplotip identic, sunt implicaţi markeri linkaţi, se remarcă antecedente familiale.
9. Anamneza familială este pozitivă, compatibilă cu transmiterea recesivă legată de sex

Evaluarea

Diagnosticul este cert, când:

A. Primul caz apare:

a. la vârsta < de 5 ani: (2), 3, 5, 6, 7, (8) - toate prezente.
b. la vârsta 5-12 ani: 1, 2, 3, 4, 5 (cel puţin unu), 6, 7, (8) - toate prezente.
c. la vârsta > 12 ani: (1), 2, 3, 4, 5 (cel puţin unu), 8, (sau 6 şi 7) - toate prezente.

*B. * Alt caz în familie (corelat cu elementul 9) se supune criteriilor de la punctul A:*

a. la vârsta < de 5 ani: 5 şi 9 sunt prezente
b. la vârsta 5-12 ani: 1, 2, 3, 5 (cel puţin unu) - sunt toate prezente
c. la vârsta > 12 ani: (1), 2, 3, 4, 5 (cel puţin unu) - toate prezente.

* Când anamneza familială este pozitivă (corelat cu elementul 9) şi B nu este aplicabil, e necesar de luat în consideraţie criteriul A.

Distrofia musculară Becker

Elementele de bază

1. Semnele clinice sunt: miastenia simetrică progresivă şi atrofierea muşchilor proximali ai membrelor mai pronunţată de cît în muşchii distali: iniţial este afectată numai musculatura membrelor inferioare. Frecvent este prezentă hipertrofia m. gastrocnemian. Apar slăbiciuni în m. quadriceps femoris, aceasta poate fi unica manifestare îndelungată. La unii pacienţi este însoţită de crampe musculare declanşate de efort. Contracturile flexorilor cotului survin în stadiile avansate ale maladiei. În DMB poate fi prezentă miocardiopatia.

2. Sunt excluse fasciculaţiile şi pierderea capacităţilor senzitive.

3. Persoana afectată nu este dependentă de cărucior până la vârsta de 16 ani.

4. Creşte activitatea CFK mai mult de 5 ori (în funcţie de vârsta şi mobilitate)

5. Electromiografia (EMG): potenţialul unităţii motorii este de durata scurtă, amplitudinea joasă, potenţialul de acţiune polifazic, fibrilaţii şi unde pozitive. Viteza de conducere prin nervii motorii şi senzitivi este normală.

6. Biopsia musculară: variaţii anormale ale diametrului fibrelor musculare (fibre atrofice şi hipertrofice dispersate în grupuri mici), focare de fibre regenerative, mai diseminate sunt fibrele necrotice. În funcţie de stadiul şi evoluţia maladiei, modificările histochimice ale fibrelor musculare, precum şi proliferarea ţesutului conjunctiv si adipos, pot atinge grad diferit

7. Biopsia musculară: distrofina cu masa moleculară şi/sau cantitate anormală.

8. ADN: prezentă mutaţie de tip Becker în gena distrofinei, haplotip identic, markerii sunt strâns linkaţi, ca şi în antecedentele familiale.

9. Anamneza familială pozitivă, compatibilă cu transmiterea recesivă legată de sex.

Evaluarea

Diagnosticul este cert când:

A. Apare primul caz în familie:

(1), 2, 3, 4, 5, şi 8 sau 6 şi 7 - toate prezente.

B. * Alt caz în familie (corelat cu elementul 9) ce se supune criteriilor A:

1. Dacă bolnavul este rudă de gradul I, atunci 4 este prezent (cel puţin 2 ori).
2. Altă situaţie: (1), 2, 3, 4, 5, şi 8 sau 6 şi 7 - toate prezente.

* Când anamneza familială este pozitivă (în corelaţie cu elementul 9) şi când B nu este aplicabil, e necesar de luat în consideraţie A.

Distrofia Musculară Emery-Dreifuss

Stabilirea clară a transmiterii legate de sex în caz de DM Emery-Dreifuss (EMD) necesită prezența a cel puțin două persoane afectate de sex masculin cu transmitere obligatorie a genei de la femeie care este asimptomatică sau are defect de conducere cardiacă sau semne de miocardiopatie . Diagnosticul de EMD în familie poate fi stabilit având un singur caz cu toate semnele tipice sau câteva cazuri cu anumite semne clinice tipice. Apare o altă problemă, aceia a clasificării bărbaților ca afectați sau ne afectați. Femeile, ocazional, pot manifesta semne clinice suficiente pentru a avea certitudinea de vector.

În clasificarea criteriilor date, cele de includere se indică - I, cele de excludere - E, comentariile - C.

1. Cerințele pentru diagnosticul ferm de EMD legate de sex în familii utilizând analiza de linkaj

SUMAR

Semnele care stabilesc diagnosticul de EMD legate de sex în familie sunt următoarele (dar nu e necesar la un singur pacient):

1. Contracturi timpurii ale tendonului Achille, ale coatelor şi ale coloanei vertebrale.
2. Progresia lentă a asteniei şi hipotrofiei musculare cu distribuție predominant humerală (mâna proximală) şi peronieră (piciorul distal), bilateral şi aproximativ simetric.
3. Apar defecte ale conducerii cardiace şi/sau alte semne de miocardiopatie .
4. Biopsia musculară demonstrează semne miopatice sau distrofie musculară accentuată.
5. Genealogia corespunde cu transmiterea ereditară legată de sex.

VÂRSTA DE DEBUT

C: De obicei copilăria. Rar după vârsta de 20 ani.

CONTRACTURI TIMPURII

I: Contracturile se manifestă până la apariția asteniior semnificative. Ele interesează coatele, ceia ce rezultă în poziția flexorie ai brațelor; tendonul lui Achille, pacientul merge pe degete; şi coloana vertebrală, ceia ce rezultă în limitarea flexiei, în particular, a gâtului.

C: Pot exista contracturi extensive ale carpului şi/sau contracturi ale flexorilor degetelor.

HIPOTROFIA ŞI ASTENIILE MUSCULARE

I: Hipotrofia şi asteniile musculare cu distribuţia predominant humerală (braţul proximal) şi peronieră (piciorul distal).

I: Bilateral şi aproximativ simetric. Pot apare miastenii mai tardive în centura scapulară, pelviană şi coapse.

C: Unii pacienţi pot avea miastenii faciale. Pot fi hipotrofii /astenii ale sternocleidomastoidienilor.

HIPERTROFIE MUSCULARĂ

C: De obicei hipotrofia m. gambei.

E: Hipertrofia marcată a gambei.

EVOLUŢIA

C: Progresarea maladiei e de obicei lentă.

IMPLICAREA CARDIACĂ

I: Defecte ale conducerii cardiace (bradicardie, extrasistole, bloc atrio-ventricular, bloc al ramurii drepte) şi/sau semne de miocardiopatie (cardiomegalie, afectarea funcţiei ventriculului stâng). Aceste defecte pot fi confirmate numai cu ajutorul ECG monitoringului de 24 de ore.

CONFIRMAREA TRANSMISIEI LEGATE DE SEX

I: Genealogia compatibilă cu transmisia legată de sex cuprinde cel puţin doi bărbaţi afectaţi şi se transmite obligatoriu prin femei asimptomatice sau care au defecte de conducere cardiacă şi/sau miocardiopatie evidenţiată.

C: Doi bărbaţi afectaţi având aceiaşi mamă nu confirmă suficient o transmitere legată de sex, aceasta poate rezulta şi din mozaicismul germinal. Dacă mama manifestă semne de EMD, familia poate fi autosom dominantă.

INTELECTUL

E: Retardul mental sever exclude diagnosticul.

CFK

C: De obicei moderat mărită dar poate fi normală.

EMG

C: Miopatică şi/sau neurogenă şi nu contribuie la diagnostic.

BIOPSIA MUSCULARĂ

I: Semne de miopatie sau distrofie de diferit grad. În unele cazuri apar focare de fibre atrofiate simulând o «denervare».

C: Distrofina este normală.

ANALIZA ADN-ULUI

C: În cazuri atipice este necesară excludere a deleției în gena PMD Duchenne/Becker .

2. Cerințe minime pentru a confirma afectarea bărbatului, în familie cu transmisie legată de sex confirmată.

I: Orice semn inclusiv descris în secția 1.

C: Evaluarea numai a CFK este sugestivă dar nu concludentă.

C: Anomaliile musculare evidențiate la ultrasonografie sau CT pot fi utile pentru confirmarea afectării subiectului.

C: Monitoringul ECG de 24 ore sau ecocardiografia pot fi utile în confirmarea bolii subiectului

3. Cerințe pentru a confirma că bărbatul este neafectat

I: Vârsta peste 20 de ani.

I: CFK normală.

I: Nu sunt evidente semnele clinice de miocardiopatie .

I: Excluderea EMD de către un medic expert în patologia dată .

4. Cerințe minime pentru a confirma că subiectul e purtător într-o familie cu transmisie legată de sex confirmată.

I: Orice semn inclusiv descris în secția 1.

C: Evaluarea numai CFK este sugestivă dar nu concludentă pentru statusul de purtător.

Distrofia Musculară Facio-Scapulo-Humerală

Există patru criterii de bază prin care se identifică distrofia musculară facio-scapulo-umerală (FSHD):

1. debutul maladiei în muşchii faciali sau ai centurii scapulare; muşchii extrinseci ai ochilor, m. faringieni şi linguali şi miocardul rămân funcționali;

2. membrii familiilor afectate prezintă slăbiciuni faciale în proporție >50%;

3. în cazurile familiale transmiterea este autosomal- dominantă; şi

4. miopatia este confirmată la EMG şi în biopsia musculară la cel puțin unul din membrii afectați, se constată semne puțin specifice, dar caracteristice pentru un diagnostic alternativ.

Criterii mai detailate, pentru diagnosticul standard, sunt descrise mai jos. Ele oferă geneticienilor cea mai bună garanție în studierea clinică a sindroamelor genetic omogene. În baza studiului molecular genetic criteriile pot fi în viitor ajustate. Criteriile inclusive se notează - I, exclusive - E. Comentariile ('C') servesc drept ghid pentru diagnostic.

Expresiile folosite se definesc astfel:

I. 'ne-penetrante' se referă la purtători obligatorii ai genei dar fără simptoame (acuze sau semne subiective) sau (fenomene obiective) legate cu maladia;

II. 'presimptomatic' denotă că persoana nu are acuze (simptoame) legate de maladie, dar examinarea fizică relevă astenie însoțită de atrofie musculară. Sunt 'cazuri abortive' şi 'pacienți minimal afectați'; şi

III. 'simptomatice' se referă la semne obiective ale pacientului cu acuze de astenii şi atrofii musculare în FSHD.

I. CRITERII CLINICE

DEBUT

I: Debutul maladiei în muşchii faciali sau ai centurii scapulare este legat, de obicei, de astenii sau hipotrofii musculare.

E: Debutul la m. centurii pelviene sugerează un alt diagnostic, cu toate că implicarea ulterioară a centurii scapulare nu este neobişnuită pentru FSHD

C: Vârsta de debut clinic este variabilă, iar vârsta de manifestare simptomatică este şi mai variabilă. Vârsta medie de debut evident (chiar şi presimptomatic) este în decada a doua (între 10-20 ani). Debutul până la vârsta de 5 ani este rar dar nu exclude diagnosticul. Debutul la vârsta infantilă necesită prezența miasteniilor faciale, în caz contrar diagnosticul nu este ferm.

FAȚA

I: Astenia facială afectează închiderea pleoapelor (orbicularis oculi) şi muşchii peri-orali (orbicularis oris) şi se constată în marea majoritate a cazurilor. În absența asteniilor faciale diagnosticul de FSHD poate fi acceptat numai în cazul în care majoritatea membrilor prezintă miastenii faciale.

E: Musculatura extra-oculară, masticatorie, faringeală şi lingulală este neafectată.

C: Miastenia facială poate fi subtilă (neînsemnată) şi uneori se exprimă numai prin asimetria prosoposcopică.

UMERII

C: Fixatorii scapulari sunt muşchii cel mai pronunțat implicați. M. pectoralis major, în majoritatea cazurilor de asemenea este afectat timpuriu. M. deltoid rămâne timp îndelungat neafectat şi apare frecvent ca un model particular de atrofie (parțial şi proximal).

ASIMETRIA

I: Asimetria, interesează, de regulă, mm. centurii scapulare, de obicei partea dreapta este afectată mai timpuriu.

C: Asteniile simetrice şi atrofiile simetrice depăşesc acest cadru şi până la acceptarea diagnosticului de FSHD se interpretează cu mare precauție. Asimetria mm. faciali este frecventă.

C: NMR, ultrascanarea sau CT-scanarea pot fi utile în detectarea asimetriei şi a atrofiilor musculare.

PROGRESAREA

I: Progresarea este inevitabilă, dar foarte variabilă şi în unele cazuri virtual imperceptibilă.

E: Regresarea semnelor şi simptoamelor nu are loc şi exclude diagnosticul.

C: Progresarea maladiei, include de obicei, extensorii abdominali şi ai piciorului în stadii timpurii; astenii ale centurii pelviene şi ale părţii proximale al mâinii pot să apară oricând, după debut în centura scapulară.

C: Astenia extensorilor cervicali, muşchilor interni ai mâinii şi a tricepsului sural nu este comună, dar poate fi observată ocazional în familii şi nu depinde de vârsta avansată sau de severitatea afectării.

SEVERITATEA

C: Maladia are limite largi de severitate, la orice vârstă.

Este necesar de notat două aspecte:

i. cazurile presimptomatice pot avea debutul la orice vârstă şi probabil cuprind 30% din toate cazurile de FSHD din familii mari;

ii. devenind simptomatice, cu toate că maladia progresează în majoritatea cazurilor, rata de progresie este variabilă. Perioade lungi de stagnare ale bolii sunt rare.

C: Nu sunt diferenţe de vârsta medie a decesului, între pacienţi şi rudele lor neafectate.

CONTRACTURI

C: Pot avea loc contracturi şi pseudohipertrofii musculare

E: Contracturile severe şi difuze exclud diagnosticul de FSHD.

MALADII CARDIACE

E: Miocardiopatia nu face parte din maladie. Prezenţă ei sugerează un diagnostic alternativ.

PIERDEREA AUZULUI

C: Pierderea auzului în aceasta maladie apărea şi debutează cu surditate perceptivă pentru tonuri înalte, poate implica toate frecvenţele sonore în mod progresiv. Severitatea pierderii auzului este variabilă la subiecţii de orice vârstă şi are tendinţa de progresare. Investigaţiile auditive trebuie făcute pentru mai mulţi membri ai familiei, astfel obţinându-se un plus de certitudine în diagnostic.

MALADII RETINIENE

C: Vasculopatia retiniană cu telangiectazie capilară, microanevrisme şi obturaţia capilară sunt prezente la unii membri ai familiilor cu FSHD. Până în prezent nu este clar dacă aceasta este o asociere specifică şi dacă ea trebuie folosită în scopuri diagnostice.

RETARD MENTAL

C: Au fost raportate cazuri de retard mental. Este recomandabil ca în investigaţia cazurilor date să se includă analiza cromozomială, focalizând atenţia pe braţul lung distal ale cromozomului 4.

II. CRITEII DE LABORATOR

C: Nivelul CFK poate fi normal, frecvent poate fi crescut, rar poate depăşi de cinci ori limita superioară a normei. Dacă nivelul CFK este persistent ridicat, atunci se exclud alte patologii neuromusculare.

C: EMG cu frecvenţă arată potenţiale polifazice de durată scurtă, amplitudine joasă. Unele semne neurogene, de exemplu, potenţialele de, amplitudine înaltă şi undele ascuţite pozitive sunt ocazional prezente, dar nu caracterizează familia individului. Viteza de conducere a influxului prin nervii senzitivi şi motorii e normală.

C: Biopsia musculară poate revela orice criterii miopatice standarde. În plus, se mai constată unele fibre mici ungulare şi fibre moth-eaten (mâncate de molii). Grupuri mici de fibre atrofice pot fi, ocazional, observate (în astfel de cazuri se recomandă biopsia repetată). Infiltratele celulare sunt obişnuite pentru FSHD şi pot fi extinse, dar semnificaţia lor nu este cunoscută. În cazurile date modelul de transmitere autosom dominant impune stabilirea diagnosticului de FSHD.

Distrofia Musculară de Centură

CRITERII DE DIAGNOSTIC

Distrofia musculară de centură (DMC) este o grupă de patologii musculare genetic determinate, în care, centura scapulară sau cea pelviană este implicată predominant sau primar. Termenul a fost sugerat de recunoaşterea existenţei unor cazuri ce nu puteau fi definitiv diagnosticate ca distrofie legată de sex sau distrofie facio-scapulo-humerală în clasificarea lui Stevenson în 1953 şi Walton & Nattrass în 1954. De atunci s-a pus întrebarea privind existenţa grupei ca entitate separată. Aceasta din cauza coincidenţei parţiale a simptomatologiei cu pacienţi la care, actualmente, se poate dovedi existenţa unei patologii clinice şi genetice distincte. De exemplu, pacienţii cu DM Becker şi purtătorii manifestaţi ai mutaţiei distrofinei se diagnosticau frecvent ca pacienţi cu "DMC" din cauza accesibilităţii analizei genetice directe şi analizei distrofinei pentru stările date. Maladii ca atrofiile musculare spinale, miopatii mitocondriale şi metabolice făceau subiectul unor confuzii de diagnostic. Cauza constă în faptul că toate maladiile sus numite pot prezenta miastenii cu distribuţie pe centură.

Există unii pacienţi la care este stabilit diagnosticul de DMC, dar ei rămân o grupă heterogenă. Categoria de DM forma centurilor include un număr de condiţii separate, genetic distincte, suportul molecular al unora dintre ele fiind actualmente rezolvat. În baza analizei datelor colectate de la mai mult de 90 de familii şi cazuri sporadice de DMC au fost sugerate următoarele criterii de includere şi excludere. Criteriile date cuprind un număr de simptoame şi semne din diferite grupe diagnosticate

ca DMC şi motivate pentru o revizuire a situaţiei actuale referitoare la diagnosticarea condiţiilor date. Deoarece, baza molecular-genetică a varietăţilor fenotipice ale DMC este determinabilă, devine posibilă elaborarea criteriilor de diagnostic pentru fiecare în parte (criteriile de includere se indică - I, criterii de excludere - E, comentarii - C).

I. CRITERII CLINICE

DEBUTUL

I: Debutul poate fi în centura pelviană sau scapulară, sau simultan în ambele; simptoamele iniţiale se evidenţiază, de obicei, în una din grupele date. Contracturile timpurii nu sunt caracteristice pentru formele recesive. Ele pot fi observate la unele forme dominante. Hipertrofia mm. gambei este frecventă, dar nu este un semn constant şi pot exista variaţii intrafamiliale considerabile pentru acest semn.

E: Debutul asteniei în mm. distali, faciali sau extraoculari trebuie se sugereze un diagnostic alternativ, deşi nu se exclude să fie interesaţi şi ei pe parcursul maladiei.

C: Debutul e posibil la orice vârstă. În familii recesive debutul după vârsta de 20 de ani este rar, dar în cazurile dominante un debut poate fi mai tardiv.

PROGRESAREA

C: Progresarea asteniilor este inevitabilă, dar variabilă, de la escaladarea dramatică a etapelor, la foarte lentă. Interesarea musculară poate fi asimetrică. Implicarea cardiacă este puţin frecventă.

Subsetul cu transmitere autosom recesivă are debut timpuriu şi progresie rapidă, similară cu evoluţia clinica a DM Duchenne. În alte familii cu transmitere autosom recesivă progresarea poate fi mai lentă. În familiile cu transmitere dominată evoluţia are tendinţe relativ benigne. Pacienţii cu maladie dominantă au un mod de implicare musculară ce se aseamănă cu FSHD, dar fără interesarea musculaturii faciale.

MODUL DE TRANSMITERE

C: DMC poate fi transmisă pe calea autosom dominantă sau recesivă. În absenţa anamnezei familiale, în prezent, nu dispunem de indicatori clinici clari, care să distingă aceste două căi, deşi CFK, în medie, are valori mai joase în familiile dominante decât în cele recesive.

II. CRITERII DE LABORATOR

I: CFK, întotdeauna, este ridicată în cazurile recesive, chiar şi când maladia este activă. Analiza poate fi utilizată ca test presimptomatic, în familiile în care creşterea timpurie a CFK este documentată. În unele familii cu CFK moderată apar cazuri asimptomatice, cu biopsia musculară normală şi este posibil, cf în familiile date, la purtători, CFK să fie moderat crescută. În unele cazuri dominante valoarea CFK poate fi normală. În

CUPRINS

Machetarea: ***Eudochia Scutelnic,***
Veaceslav Popovschi
Coperta: ***Veaceslav Popovschi***

Com. 5740. Tiraj: 150 ex.
Î.S. Firma editorial-poligrafică "Tipografia Centrală",
MD-2068, Chişinău, str. Florilor, 1
tel. 43-03-60, 49-31-46
Ministerul Culturii al Republicii Moldova
Departamentul Activităţi Editoriale, Poligrafie şi Aprovizionare cu Cărţi