

Ministerul Sănătății al Republicii Moldova
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
“Nicolae Testemițanu”

FACULTATEA MEDICINĂ 1
Catedra Anatomie Topografică și Chirurgie Operatorie
Laboratorul Inginerie Tisulară și Culturi Celulare

TEZĂ DE DIPLOMĂ
ROLUL CELULELOR STEM HEMATOPOETICE ÎN STIMULAREA
REGENERĂRII ȚESUTURILOR MUSCULARE

Autor: REPEDE Ana, studenta anul VI, gr.1632

Conducător științific: NACU Viorel, dr.hab.med., prof.univ.

Chișinău, 2014

CUPRINS

Lista abrevierilor	4
INTRODUCERE	5
I. ANALIZA BIBLIOGRAFICĂ A TEMEI	9
1.1. Definiție	9
1.2. Clasificarea celulelor stem	9
1.3. Concepte actuale în miogeneza mușchilor scheletali	11
1.3.1. Miogeneza antenatală	11
1.3.2. Miogeneza postnatală	15
1.4. Distrofiile musculare	18
1.5. Impactul procesului patologic de bază a unei boli musculare asupra particularităților regenerării mușchiului striat	24
1.6. Mecanismele de miogeneză ale celulelor stem hematopoetice	26
1.7. Aplicații clinice ale miogenezei regenerative prin celule stem hematopoetice	29
II. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	31
2.1. Metodologia cercetării teoretice	31
2.2. Materialul de laborator și metodologia de lucru	32
2.2.1. Prelevarea celulelor stem hematopoetice murine	32
2.2.2. Izolarea celulelor stem hematopoetice murine	33
2.2.3. Cultivarea celulelor stem hematopoetice murine	33
2.2.4. Inducerea leziunii musculare	35
2.2.5. Protocolul de iradiere	36
2.2.6. Protocolul de transplantare a celulelor stem hematopoetice	36
2.2.7. Analiza histologică a fragmentelor de țesut muscular striat	37

III. REZULTATE OBȚINUTE ȘI DISCUȚII	38
3.1. Metode de colectare și cultivare a celulelor stem hematopoetice	38
3.1.1. Surse și metode de prelevare a celulelor stem hematopoetice	38
3.1.2. Tehnici de cultivare și medii de cultură	40
3.1.3. Modalitățile de administrare a celulelor stem hematopoetice la om	43
3.2. Rezultatele studiului pe animale de laborator	44
3.3. Morbiditatea prin distrofii musculare în Republica Moldova	45
IV. CONCLUZII	48
BIBLIOGRAFIE	49

LISTA ABREVIERILOR

CTX	Cardiotoxină
DMD	Distrofia Musculară Duchenne
EGFP	Proteină verde-fluorescentă amplificată (engl: <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
FACS	Sortarea celulelor activate prin fluorescență (engl: <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBS	Ser fetal de vițel (engl: <i>Fetal bovine serum</i>)
G-CSF	Factorul de stimulare a coloniei granulocitare (engl: <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>)
H&E	Hematoxin-Eozină
HSC	Celule Stem Hematopoetice (engl: <i>hematopoietic stem cells</i>)
iPS cells	Celulele stem pluripotente induse (engl: <i>induced pluripotent stem cells</i>)
MAPC	Celule progenitoare multipotente adulte (engl: <i>multipotent adult progenitor cells</i>)
MSC	Celule Stem Mezenchimale (engl: <i>mesenchymal stem cells</i>)
PCR	Reacția de polimerizare în lanț
SMALD	Celulele mușchiului scheletic pozitive pentru aldehyd-dehidrogenază (engl: <i>Skeletal Muscle Aldehyde Dehydrogenase-Positive Cells</i>)
α -MEM	Mediul minim-esențial Alfa (engl: <i>Minimum Essential Medium Alpha</i>)

INTRODUCERE

Actualitatea temei:

Țesutul muscular este cel mai vast țesut din corpul uman (40-45% din masa corporală totală) și cedează doar măduvei osoase în capacitatea de regenerare post-traumatică, atât în cazurile acute (expunerea la toxine, exercițiile fizice intense), cât și în cele cronice (distrofiile musculare) [29, 79, 71]. Abilitatea regenerativă a mușchiului striat matur (postmitotic) este atribuită activării celulelor satelite, care sunt celulele stem ale mușchiului postnatal și în mod fiziologic rezidă între plasmalema și membrana bazală a fibrelor musculare [10, 8, 69]. Distrofiile musculare se caracterizează prin cicluri repetitive ale de- și regenerării fibrelor mușchilor scheletici, cu implicarea frecventă a miocardului. Întrucât, în timpul cursului de durată a distrofiilor musculare este o permanentă necesitate de progenitori miogeni, devine imperativă recrutarea precursorilor miogeni adiționali dintr-un fond de celule nediferențiate, permanent înnoite, precum sunt celulele măduvei osoase [8].

Măduva osoasă conține celule stem hematopoetice (HSC) și celule stem mezenchimale (MSC), care se pot diferenția într-o varietate de țesuturi mezenchimale: osos, muscular, cartilaginos, adipos [30]. Recent, Ogawa et al. a calificat HSC în calitate de celulă pluripotentă, nu doar ”hematopoetică”, în baza revizuirii studiilor deja publicate și prin intermediul studiului propriu asupra plasticității HSC, implicând transplantarea unei singure celule HSC [50].

Distrofiile musculare sunt un grup de boli musculare noninflamatorii, progresive, în lipsa afectării centrale sau periferice a nervilor. Boala afectează mușchii prin degenerescență evidentă a fibrelor, însă în absența aberațiilor morfologice. Distrofia musculară Duchenne, distrofia musculară Becker, deficitul de sarcoglican și distrofia musculară merozin-deficitară sunt boli congenitale mio-degenerative, pentru care nu

există un tratament satisfăcător. Sarcopenia, o reducere a masei și funcției musculare dependentă de vîrstă, asociată cu fibroză progresivă și metaplazie adipocitară, este o afecțiune frecventă a carei incidență crește odată cu avansarea în vîrstă a populației [32, 22].

În pofida progresului semnificativ, rămîne evazivă identificarea HSC optime pentru regenerarea musculară. Pentru a beneficia ”din plin” de potențialul celulelor derivate din măduva osoasă în calitate de opțiune terapeutică, persistă necesitatea în experimente exhaustive orientate spre identificarea proteinelor celulare de suprafață unice și stabilirea amprentelor genetice ale HSC cu potențial miogen [7].

Gradul de studiere a temei investigate:

Terapia celulară aplicată în distrofiile musculare constă în injectarea locală sau sistemică a celulelor cu potențial miogen. Celulele transplantate trebuie să poată fuziona cu miofibrele existente sau să formeze noi fibre musculare, iar nucleeele celulelor transplantate care devin incluse în miofibre, ar exprima produsul genei absente [75].

Celula ideală pentru terapia transplantatională trebuie să corespundă cîtorva criterii: (a) să poată fi ușor amplificată *in vitro* fără a pierde proprietățile miogene și de celulă stem, pentru a asigura repleția nișei de celule satelite și repara/substitui fibrele afectate în cazul injectării *in situ*; (b) pentru tratamentul întregului organism, ele trebuie să poată fi administrate sistemic, pentru a ajunge spre toți mușchii afectați; (c) să poată supraviețui, prolifera și migra în cadrul întregului mușchi al gazdei [75].

Celulele cercetate în strategiile de terapie celulară cu intenție miogenă sunt: mioblaștii (celulele satelite multiplicare *in vitro*), celulele perivasculare (pericitele și celulele similare mesoangioblaștilor), celulele mioendoteliale, celulele mieloide CD133+, HSC, celulele mezenchimale umane din țesutul adipos, celulele mezenchimale din

membrana sinovială, celulele SMALD, celulele stem embrionale, celulele stem pluripotente induse (iPS cells) [75].

Gradul în care măduva osoasă contribuie la un program regenerativ în mușchiul lezat rămâne disputat [29]. Abedi et al. a obținut fuziunea celulelor donatorului cu mușchiul recipientului - 12% [3], Bossolasco et al. – 0,06-0,26% [9], Gussoni et al. – 4% [28], Ferrari et al. - <1% [26], LaBarge et al. – 3,5% [36], discrepanță argumentată probabil prin protocoale experimentale diferite. Nivelul grefării în țesutul muscular la administrarea sistemică a HSC variază în dependență de mușchi, panniculus carnosus încorporând miofibre donatoare circa 5%, comparativ cu tibialis anterior care în medie încorporează 0,07% miofibre [66]. McKinnell et al. [7] conchide că frecvența contribuției măduvei osoase în favoarea mușchiului scheletal este raportată a fi între 0.01-0.1% pentru mușchiul în repaus, și crește pînă la circa 5% și chiar 12% din totalitatea fibrelor - post-lezional, demonstrînd că leziunea musculară joacă un rol integral în direcționarea celulelor derivate din măduva osoasă către mușchii scheletici.

Scopul și obiectivele tezei:

Scopul: analiza contribuției celulelor stem hematopoetice în miogeneza regenerativă postnatală, și în particular în distrofiile musculare.

Obiective:

1. Studiarea sistematizată a literaturii actuale de specialitate cu privire la originea hematopoetică a miogenezei postnatale regenerative.
2. Analiza incidenței distrofiilor musculare (G71.0) la populația din Republica Moldova.
3. Argumentarea raționalității și elucidarea critică a eficienței terapiei celulare prin celule stem hematopoetice în distrofiile musculare.

Noutatea științifică a rezultatelor obținute:

Medicina regenerativă, în care se include terapia celulară, este o disciplină nouă și nu este confirmat pe deplin aportul celulelor stem hematopoetice în regenerarea musculară secundară.

Importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării:

Importanța teoretică a lucrării constă în sistematizarea mecanismelor miogenezei postnatale regenerative la recipient în transplantarea de celule stem hematopoetice, iar valoarea aplicativă este de a optimiza tratamentul și calitatea vieții la pacienții cu distrofii musculare.

I. ANALIZA BIBLIOGRAFICĂ A TEMEI

1.1. Definiție

Celulele stem sunt celule nespecializate care se pot reînnoi nelimitat și se pot diferenția în celule mai mature cu funcții specializate [17, 80]. Celula stem este definită de 3 criterii esențiale: autoreplicare (autoînnoire), abilitatea de diferențiere în mai multe tipuri de celule, și abilitatea de a reconstitui *in vivo* un anumit țesut [38].

1.2. Clasificarea celulelor stem

Deși proprietatea de autoînnoire definește la general celula stem, pentru a categoriza brut celulele stem este utilizat gradul potenței, adică diapazonul variantelor de diferențiere [7]. **Celulele stem totipotente** sunt abile de a produce toate celule diferențiate ale unui organism. Zigotul este celula totipotentă umană care poate forma nu doar celulele mezodermului, endodermului, ectodermului și celulele germinale, dar și țesuturile trofoblastului necesare pentru supraviețuirea embrionului aflat în dezvoltare. Astfel, celulele totipotente sunt situate la vârful ierarhiei proliferative [38]. Celulele stem embrionale, izolate din masa celulară internă a blastocistului, pot forma mezodermul, endodermul, ectodermul și celulele germinale, dar nu și țesuturile extra-embriionale, astfel sunt numite "pluripotente". Deci, **celulele stem pluripotente** (umane) sunt celulele ce pot diferenția în oricare dintre cele trei straturi germinale umane, însă nu pot forma un organism în întregime. Celulele stem izolate din diverse organe "adulte" se auto-înnoiesc și diferențiază în mai multe tipuri celulare organ-specifice, fiind denumite **celule stem multipotente**. Aceste celule stem sunt mai puțin plastice și mai mult diferențiate, iar potențialul lor de specializare este limitat către mai multe linii celulare. Deci, multipotența este abilitatea unui tip de celule de a se transforma în mai mult de un tip de celule din cadrul organismului, dar nu în celulele tuturor straturilor germinale [38, 21, 66]. **Celulele stem oligopotente** sunt celule abile de a se diferenția în 2 sau mai multe tipuri de celule

dintr-un singur țesut, de ex.: celula stem limfoidă sau mieloidă. **Celulele stem unipotente** au proprietatea de a se reînnoi, însă se pot diferenția doar într-un singur tip de celule specializate.

Descendenții unei celule stem suportă o schimbare ireversibilă care îi determină a fi permanent angajați (committed) unei căi *în aval* de progenitori nediferențiați, progenitori angajați și celule angajate într-o linie celulară (lineage-committed cells) [19]. **Celulele angajate** (committed cells) au capacitatea de auto-replicare mică sau absentă și diferențiază într-un singur tip celular definit, fiind denumite celule progenitoare sau precursorare [38].

Deci, celula stem diferențiază în **celule progenitoare**, care sunt evolutiv ”mai angajate” într-o linie celulară decât celulele stem, însă totuși rămân nediferențiate sau imature comparativ cu celulele tisulare specializate. Termenul general de celulă progenitoare poate fi aplicat oricărei celule care se divide și are capacitatea de a genera un alt tip de celule. Include celulele stem ”posibile” la care încă nu a fost demonstrată capacitatea de auto-înnoire [24, 66]. Celulele progenitoare pot fi unipotente sau multipotente [52].

Ierarhia proliferativă nu este unidirecțională, deoarece în anumite circumstanțe o celulă stem poate dediferenția spre a forma celule cu o potență superioară [7].

Celulele stem pot fi clasificate în două grupe principale: celule stem embrionale (totipotente și pluripotente) și celule stem adulte (multipotente).

O altă clasificare subdivide diverse celule stem multipotente în dependență de țesutul pe care-l pot genera, de ex.: celule stem hematopoetice, celule stem spermatogonice, celule stem satelite, celule stem neurale, etc. Hotarele nu sunt stricte, astfel este posibilă transdiferențierea unei celule stem tisulare într-o altă linie tisulară. Deoarece o funcție

celulară este determinată de interacțiunea complexă și îndelungată a diferitor clase de molecule, este dificil de a o cuantifica. De aceea, o clasificare pur funcțională a celulelor stem este uneori inutilă în practică. Astfel, categorizarea celulelor stem din considerente practice este bazată pe markerii moleculari [7].

Fenotipul celulelor stem hematopoetice (HSC) umane este caracterizat de următorii markeri moleculari: CD34+, CD59+, CD38^{low/-}, CD45+, CD49f+, Thy1+, C-kit^{-/low}, lin⁻, CD133/AC133+, ș.a. [41, 7, 18, 6, 81, 64, 74, 54].

Acești markeri celulari pot fi identificați prin anticorpi monoclonali cuplați cu o etichetă fluorescentă și selectați din măduva osoasă printr-o metodă de flux-citometrie numită FACS, acronim englez descifrat ca analiza de sortare a celulelor fluorescent activate.

1.3. Concepte actuale în miogeneza mușchilor scheletali

1.3.1. Miogeneza antenatală

Pe parcursul embriogenezei, oscilațiile locale ale expresiei genice și gradientele morfogene induc condensări perechi ale mezodermului paraxial - somitele, care se dezvoltă progresiv cranio-caudal și sunt dispuse la intervale regulate de-a lungul embionului în formă de mase sferice de țesut primordial. Mușchii scheletici ai corpului, cu excepția câtorva mușchi ai capului, derivă din somite - segmente ale mezodermului paraxial care se formează de ambele părți ale tubului neural și coardei dorsale. Somitul constă dintr-un miez mezenchimal înconjurat de o sferă de celule epiteliale (Fig.1.1). Somitele suportă un program stereotactic de diferențiere. Debutul diferențierii este marcat de porțiunea ventromedială, care efectuează o tranziție din epiteliu în țesut mezenchimal spre a forma sclerotomul, care generează scheletul axial. Regiunea dorsală rămîne ca țesut epitelial, denumit dermomiotoom, compus din celule multipotente care generează mușchii

scheletici și dermul regiunii spatelui. Odată cu maturarea somitelor, celulele progenitoare miogene sunt deținute de epiteliul dermomiotomului. Miogeneza este inițiată prin delaminarea celulelor de pe marginea acestei structuri, care odată detașate se diferențiază în miocite. Celulele dermomiotomului sunt marcate de expresia factorilor de transcripție Pax3, Pax7, Myf5, MyoD. MyoD și Myf5 sunt ambii considerați markeri ai specificării terminale a liniei musculare [5, 12, 41, 37, 4].

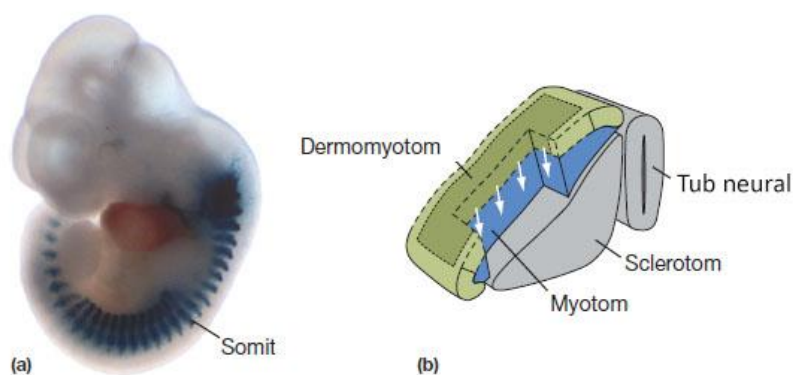


Fig. 1.1 (a) Embrion de șoarece cu somitele evidențiate prin colorație pentru b-galactozidază; (b) Secțiune printr-un somit. Tradus după sursa: Bassel-Duby [4].

În decursul dezvoltării embrionului, partea centrală a dermomiotomului dezintegrează, iar celulele progenitoare musculare se diferențiază spre a forma miotomul primar. Această populație de progenitori generează o fracție de celule satelite, rezidente în mușchii scheletici postnatali.

Odată cu progresarea miogenezei celulele progenitoare devin mioblaști, celule musculare mononucleate, care sunt angajate să devină celule musculare striate scheletice. Mioblaștii proliferază, migrează și se agregă în clustere, apoi fuzionează spre a deveni miotubuli multinucleați (Fig.1.2). Alungirea are loc prin fuziunea mai multor mioblaști cu extremitățile miotubilor. Miotubii primari, primii formați, se separă în clustere și sunt înconjuțați de membrana bazală. Mai mulți mioblaști se agregă sub membrana bazală și

fuzionează spre a forma miotubii secundari. Dezvoltarea ulterioară face ca miotubii primari să se diferențieze în fibre musculare mature, cu nucleele deplasate periferic, odată ce miofibra se încarcă cu proteine contractile. Miotubii secundari încep, de asemenea, a se matura în fibre, astfel încât miotubii primari și secundari să fie conținuți într-o membrană bazală comună. Odată ce miogeneza avansează, fibrele musculare devin lente sau rapide, în dependență de tipul de inervație și expresia spațiotemporală a factorilor reglatori [4, 60].

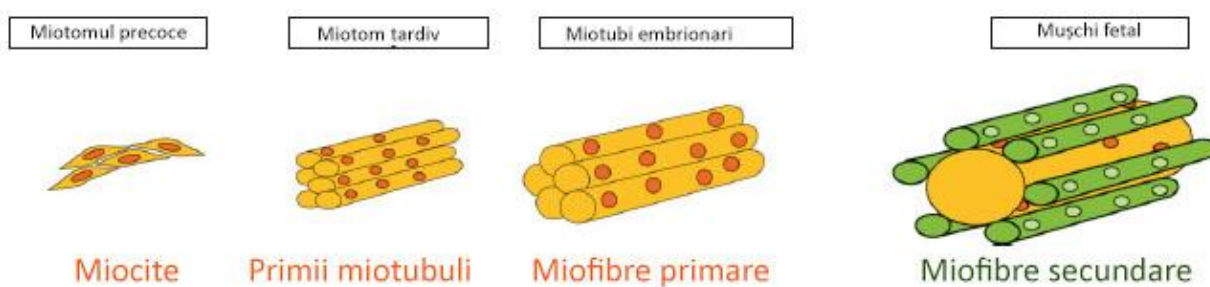


Fig. 1.2 Formarea mușchiului scheletic. Tradus după sursa: Buckingham M., Mayeuf A. Muscle, 2012 [13].

Miogeneza antenatală poate fi divizată în: (1) miogeneza embrionară, soldată cu formarea fibrelor musculare primare, care sunt fibre lente și își au originea din mioblaștii primari; și (2) miogeneza fetală (secundară), unde în jurul fibrelor primare mioblaștii secundari formează fibre musculare secundare. Ultimele, sunt mult mai subțiri, tind a fi fibre rapide și exprimă izoforme specifice ale enzimelor musculare, precum B-enolaza [57, 13].

Mușchii dorsali sunt formați de partea epaxială a dermomiotomului și miotomului, iar trunchiul lateral și membrele derivă din domeniile hipaxiale (Fig.1.3). Majoritatea mușchilor trunchiului cresc din miotomul inițial, unde ulterior miocitele suportă fuziune celulară spre a forma fibre musculare multinucleate, urmînd clivajul și reorganizarea

masei musculare în dezvoltare. Mușchii parietali ai corpului sunt generați de elongarea ventrală a dermomiotomului și miotomului. Mușchii extremităților, diafragul și choarda hipoglosă derivă din celule miogene cu capacitate migratorie extensivă, care delaminează de la marginea ventrolaterală a dermomiotomului la nivel de membre. Choarda hipoglosă este o structură tranzitorie dispusă la nivel toracic, ce constă dintr-un strat de celule miogene și se extinde anterior de la dermomiotomul hipaxial, spre a forma câteva somite occipitale și cervicale, contribuind astfel la mușchii somit-derivați ai gâtului, inclusiv și câțiva mușchi ai limbii. Mușchii capului și gâtului, numiți mușchi brahiometrici, sunt formați de celulele cu originea în mezodermul arcurilor brahiale și mezodermul prechordal și faringian al capului [5, 12, 41, 13, 4, 71].

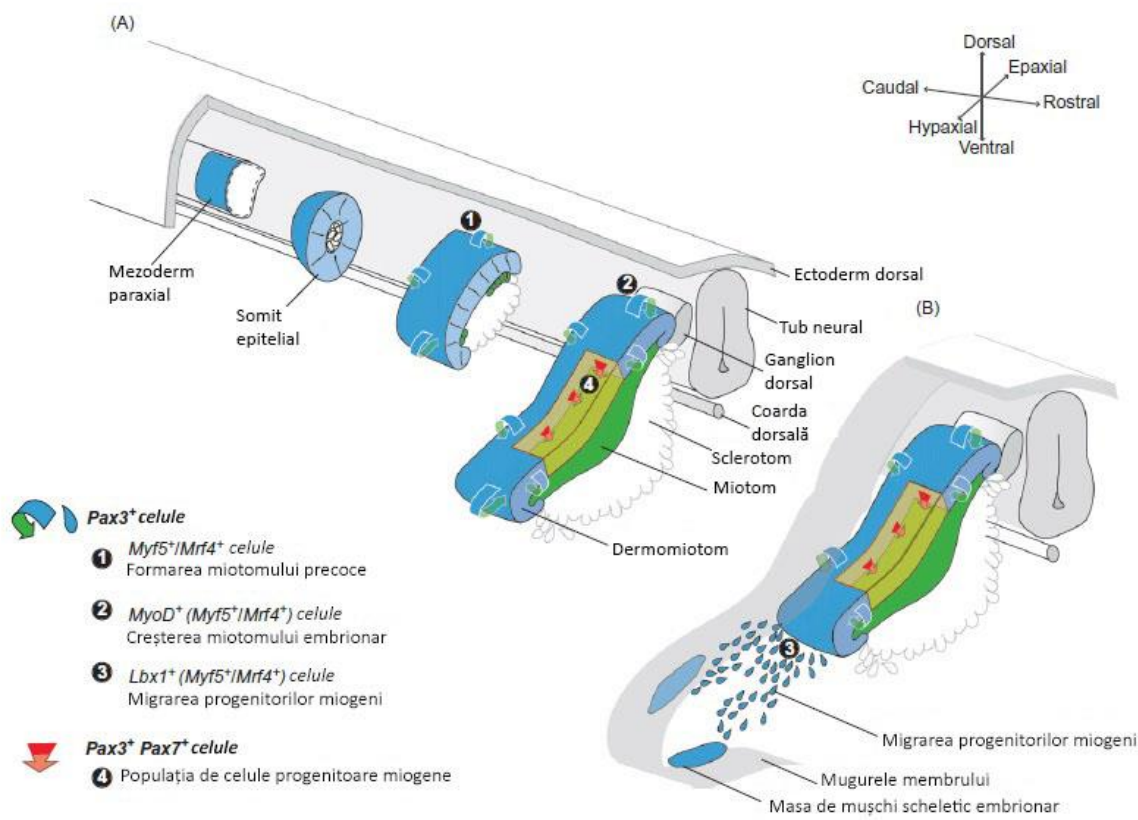


Fig. 1.3 (A) Originea mușchilor scheletici ai trunchiului și membrilor. Somitele se formează prin segmentarea mezodermului paraxial. Inițial, ele au o structură epitelială și

porțiunea lor ventrală suportă tranziție epitelio-mezenchimală, formînd sclerotomul. Epiteliul este menținut în porțiunea dorsală a somitului, în calitate de dermomiotoom, ale cărui celule exprimă Pax3. Primul mușchi scheletic, miotomul, este progresiv format prin delaminarea celulelor progenitoare (Pax3+), care au Myf5/Mrf4 active (*săgeți albastre*). Porțiunea centrală a dermomiotomului apoi se rupe, iar celulele ce exprimă Pax3 și Pax7 intră în miotomul primar (*săgeți roșii*). Miotomul, ulterior crește spre a genera toți mușchii trunchiului. (B) La nivelul mugurilor membrelor, progenitorii Pax3+, prezenți în marginea hipaxială a dermomiotomului, delaminează și migrează în membre unde formează mușchii scheletici. Tradus după sursa originală: Buckingham M., Mayeuf A. Muscle, 2012 [13].

În funcție de factorii genetici stadial-asociați sunt propuse cîteva etape ale miogenezei embrionare: delaminare, migrare, proliferare, determinare, diferențiere, formarea mușchilor specifici, generarea celulelor satelite [57].

Majoritatea mușchilor trunchiului cresc din miotomul inițial, de unde mioblaștii se diferențiază în miocite, care subsecvent fuzionează spre a forma miotubuli polinucleați, iar ulterior după inervație - fibre musculare multinucleate, urmînd clivajul și reorganizarea masei musculare în dezvoltare [13, 11]. Precursorii mioblaștilor în miogeneza embrionară sunt somitele, anume celulele mezenchimale multipotente ale dermomiotomului, iar precursorii mioblaștilor în miogeneza adultului sunt celulele satelite [11].

1.3.2. Miogeneza postnatală

Mușchiul scheletic este un țesut post-mitotic ce constă din miofibre sincițiale lungi, fiecare fiind multinucleată, și aflată în G_0 - fiind incapabile de diviziune. Astfel, creșterea și regenerarea are loc din precursorii miogeni, sursa predominantă fiind celulele satelite.

Acestea sunt o formă de celule stem mezenchimale și reprezintă 1-5% din totalul mionucleelor din mușchi adulți [53, 68].

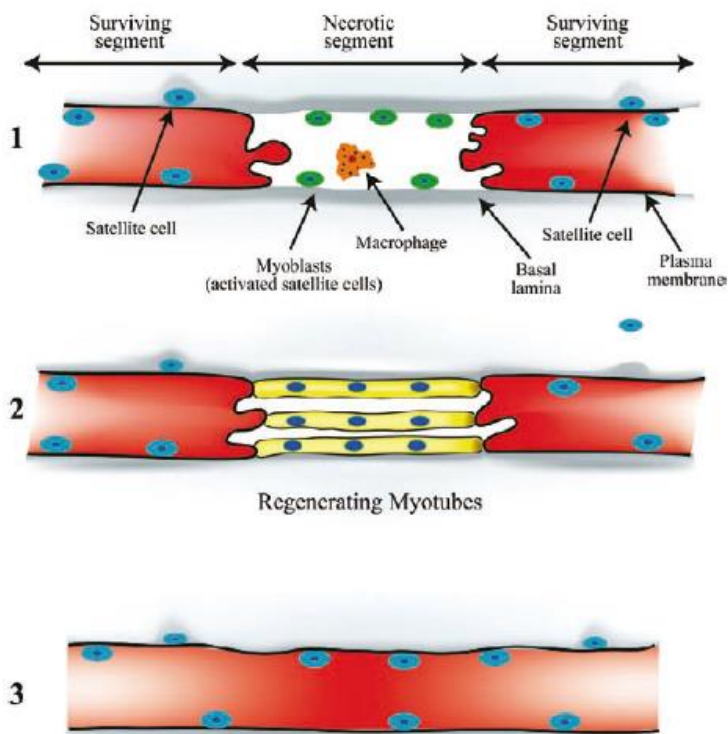


Fig. 1.4 Ilustrarea schematică a regenerării unui segment nerotic de fibră musculară.
Sursa: Advances in Muscle Research [34]

Spre deosebire de formarea embrionară *de novo* a mușchiului, regenerarea musculară depinde de prezența în țesutul lezat a structurii scaffold a matricei extracelulare, care ar servi șablon pentru formarea fibrelor musculare.

Postnatal, creșterea și repararea fibrelor țesutului muscular este mediată de populația rezidentă de precursori miogeni mononucleari - celulele satelite (Fig. 1.4). Aceste celule, localizate între sarcolema și membrana bazală a fibrei musculare, se divid cu o rată lentă spre a susține atât autoreplicarea, cât și creșterea țesutului diferențiat. În răspuns la leziunea musculară, sau la persoanele cu miopatii cronice degenerative, celulele

satelite se divid și fuzionează pentru a repara sau substitui fibrele lezate. Apariția nucleelor localizate central în miofibre indică regenerarea musculară, iar ulterior, în timpul maturației miofibreii, nucleele se deplasează în stratul subsarcolemic (Fig. 1.5). Deși celulele satelite sunt activate circa 24 ore post-lezional, faza de regenerare musculară începe în zilele 3-5 după leziune, în dependență de tip și severitate. Când regenerarea eșuează, adipocitele infiltrează celulele lezate (distrofie lipidă) și generează o cicatrice fibrotică. Potențialul autoreplicativ al celulelor satelite adulte este limitat, descrește cu vârsta, și poate fi suprasolicitat de un proces regenerativ cronic precum în distrofiile musculare severe, unde majoritatea țesutului muscular este eventual pierdut și înlocuit de țesut conjunctiv [25, 79, 71].

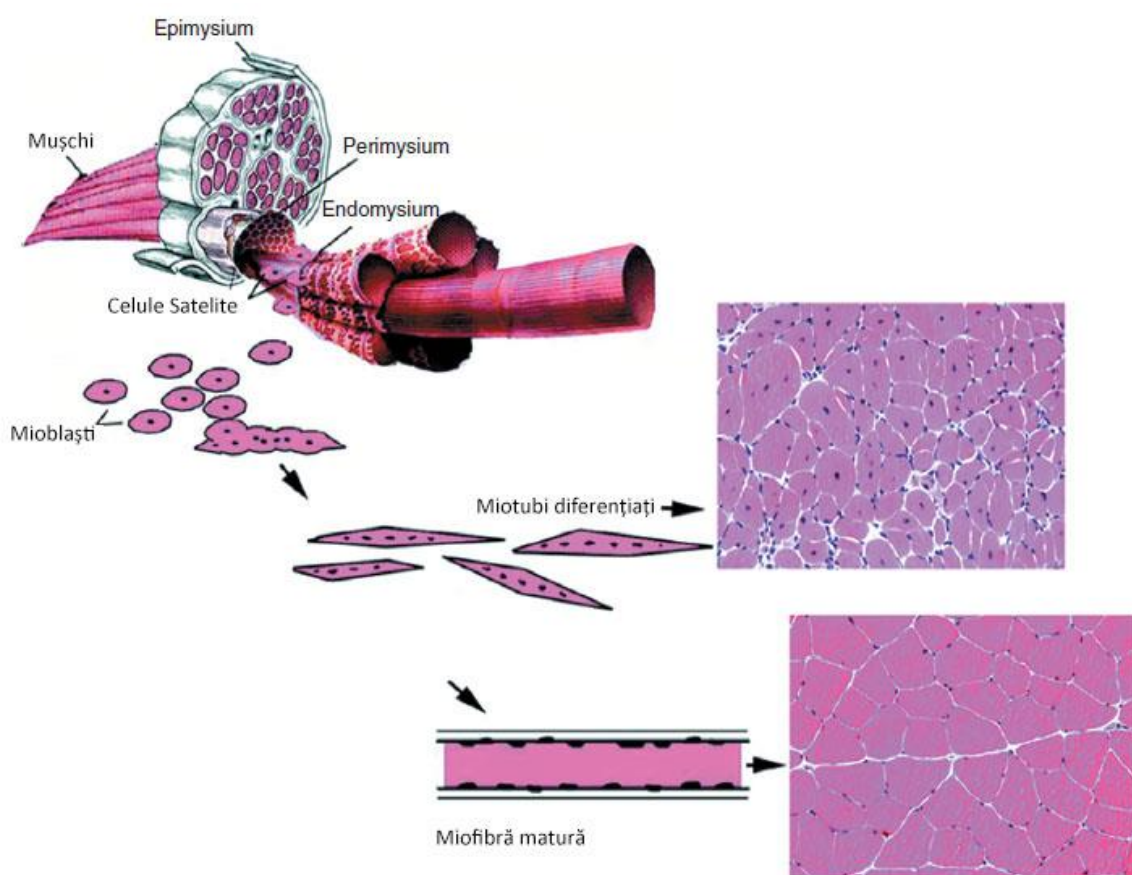


Fig. 1.5 Structura schematică a mușchiului scheletic. În mușchiul lezată, celulele satelite sunt eliberate și activate spre a deveni mioblaști. Acestea fuzionează cu miofibrele lezate

sau între ele spre a regenera țesutul muscular. Miofibrele în regenerare conțin nucleii situați central, care la maturare migrează la periferia miofibrei. Tradus după sursa: Wei S., Huard J. [79].

Numărul celulelor satelite rezidente în mușchiul adult este mult mai mic decât numărul precursorilor miogeni angajați care populează țesutul muscular îndată după lezare. Au fost propuse mai multe explicații pentru acest paradox, de la migrarea celulelor satelite din fibrele adiacente, sau chiar mușchii vecini, pînă la recrutarea în miogeneză a celulelor rezidente non-miogene [25].

1.4. Distrofiile musculare

Distrofiile musculare sunt un grup de boli musculare noninflamatorii, progresive, în lipsa afectării centrale sau periferice a nervilor. Deși sunt variații minore, toate tipurile de distrofii musculare au în comun astenia musculară progresivă, care tinde a se instala în direcție proximo-caudală. Diminuarea forței musculare la persoanele afectate poate compromite mobilitatea pacientului, și eventual funcția cardiopulmonară. Adicional, se pot dezvolta contracturi structurale ale țesuturilor moi și deformități spinale, datorită posturii proaste cauzate de deteriorarea progresivă a mușchilor și disechilibru, împreună compromițînd funcționalitatea și longevitatea. Contracturile echinovarus încep ca deformități dinamice flexibile, dar avansează spre contracturi rigide. Această anatomie alterată previne deplasarea normală, încălțarea încălțăminteii, și transferul. În mediu, pentru fiecare 10° incurbare în scolioza toracică, capacitatea vitală forțată diminuează cu 4%. La un pacient cu sistemul cardiopulmonar deja slăbit, această diminuare în capacitatea vitală forțată poate rapid deveni fatală. Astfel, scopul abordării ortopedice este de a prolunga statul deplasării pacientului pe cît de mult posibil, fapt asigurat prin eliberarea retractorilor țesuturilor moi și stabilizarea precoce a coloanei vertebrale [22].

Deoarece distrofiile musculare au origine genetică, clasificarea lor este în dependență de ereditate: (1) sex-linkate: Duchenne, Becker, Emery-Dreifuss; (2) autosomal-dominante: facioscapulohumerală, distală, oculară, oculofaringiană; (3) autosomal-recesivă: forma membre-centură. Distrofia musculara Duchenne (DMD) este forma cea mai răspândită de distrofie musculară, afectând circa 3 baieti din 1000. În distrofiile X-linkate, precum Becker și Duchenne, defectul este localizat pe brațul scurt al cromosomului X (Xp21). Gena codifică un component al citoscheletului. Distrofina este distribuită nu doar în mușchiul scheletal, dar și în cel neted, cardiac, și chiar în creier. Distrofia Emery-Dreifuss este deasemeni cuplată cu crs.X, însă mutația responsabilă este localizată pe brațul lung al crs.X (q28). În distrofia autosomal-recesivă, defectul genetic este localizat în locusul 13q12. În distrofia autosomal-dominantă facioscapulohumerală mutația este situată în locusul 4q35. În distrofiile distale, localizarea defectului genetic este în locii 2q12-14 [22].

În interacțiunea complexă a membranei miocitului cu mediul extracelular sunt implicate multiple proteine. Pentru stabilitatea sarcolemei, elemente importante sunt distrofina și glicoproteinele asociate distrofinei (DAG, engl: *dystrophin-associated glycoproteins*). Distrofina reprezintă doar 0,002% din proteinele mușchiului striat, însă are importanță majoră în menținerea integrității membranei miocitelor. Distrofina se agregă ca un heterotetramer la nivelul costomerelor din fibra musculară striată, de asemenea, se asociază la actină prin capătul N-terminal și la complexul DAG prin capătul C-terminal, formînd un complex stabil care interacționează cu laminina din matricea extracelulară. Absența distrofinei induce instabilitate celulară la nivelul acestor legături, cu scurgerea progresivă a componentelor intracelulare; fapt ce rezultă în nivel înalt de creatin fosfokinază (CPK) determinată la analiza biochimică a pacienților cu distrofie Duchenne. Costomerele sunt atașamentele ”sub formă de coaste” la periferia miofibrelor adiacente sarcolemei, prezente de ambele părți ale liniei Z [22].

Formele mai puțin active ale distrofinei pot funcționa în calitate de ancoră sarcolemică, însă acestea pot să nu fie atât de eficiente ca reglatori ai porții, deoarece permit o oarecare scurgere a substanței intracelulare. În acest mod decurge procesul în distrofia Becker clasică. Atât în DMD, cât și în Becker, fibra musculară treptat degenerază, cu invazia ulterioară a macrofagelor. Deși distrucția nu este imun-mediată, pe membranele miocitelor distrofice sunt identificați antigeni leucocitari umani de clasa I (HLA); această particularitate determină mușchii să devină mai susceptibili către atacul mediat de limfocitele T. Hibridizarea cu anticorpi monoclonali selectivi a fost utilizată spre a identifica limfocite T citotoxice, implicate adițional macrofagelor invadante; de asemenea, au fost relevate complexe de atac al membranei complement-activate în miocitele distrofice. Pe parcursul timpului, miocitele necrozate sunt substituite prin infiltrat fibro-adipos, care clinic se manifestă ca pseudohipertrofie a mușchilor. Lipsa unității funcționale a mușchilor determină astenie, și eventual, contracturi [22].

Alte distrofii musculare sunt cauzate de alterarea codificării uneia dintre proteinele complexului DAG. Locii genelor codificatoare pentru fiecare dintre proteinele complexului DAG sunt amplasați în afara cromosomului X. Defectele genetice în aceste proteine, de asemenea, induc alterarea permeabilității celulare; însă, din cauza unui mecanism de acțiune puțin diferit, cât și datorită localizării acestor proteine în corp, sunt anumite efecte asociate, precum cele din tipul distrofiilor oculară și membru-centură [22].

În DMD, în absența anamesticului heredocolateral sugestiv, nu este prezent nici un indiciu deviant la naștere, iar manifestările impotenței musculare nu debutează pînă copilul nu începe a merge. Sunt notate 3 momente majore în evoluția DMD, cînd pacientul începe a merge, cînd pierde abilitatea de a se deplasa, și momentul decesului. Etapele de dezvoltare motorie a copilului pot fi în limitele de sus a normei, sau pot fi puțin întîrziate. Uneori întîrzierea poate fi cauzată de astenia musculară inerentă, însă un component responsabil derivă din implicarea cerebrală. Deși asocierea afectării intelectuale în

distrofiile musculare este recunoscută de mult timp, inițial se considera un rezultat al oportunităților educaționale limitate. Studiile psihometrice au relevat un coeficient al inteligenței inferior la pacienții cu DMD, în pofida egalizării oportunităților educaționale. IQ mediu la pacienții cu DMD este 85 puncte, comparativ cu 105 puncte la populația generală. Adițional deficitului mental, copii cu DMD nu încep a merge pînă la circa 18 luni sau mai tîrziu. După studiul lui Dubowitz, 74% copii cu DMD au manifestat boala către vîrsta de 4 ani. Către 5 ani boala se manifestă la toți copiii afectați, cînd ei simt dificultate pentru activitățile în relație cu școala (ex. urcatul scării, mișcări reciproce în timpul activităților, etc.) [22].

Alte particularități precoce includ anormalități ale mersului, care clasic este un mers clătinat ("mers de rață"), cu pași largi, și hiperlordoza coloanei lombare, mersul fiind pe vîrful degetelor (mers digitigrad). Clătinarea este datorită slăbiciunii în mușchii gluteu mare și gluteu mediu, și inabilității pacientului de a suporta postura într-un singur picior. Copilul înclină corpul către cealaltă parte pentru balansarea centrului său de greutate, iar mișcarea este repetată cu fiecare pas. Astenia în mușchii extensori rezultă în înclinarea în anterior a pelvisului, fapt translat clinic prin hiperlordoza coloanei vertebrale spre a menține postura. Copilul apoi merge digitigrad, deoarece îi este mai ușor de a rămîne vertical în poziția echină a plantei, decît în poziția plată; deși la această etapă încă nu există retracția la nivelul tendonului Achilles. Treptat se observă dificultăți notabile în pășire. Au loc căderi frecvente, fără împiedicare sau poticnire, fapt descris de pacienți ca "talpa fiind spălată de sub picior". Copilul apoi începe a avea probleme la ridicare din poziție șezîndă sau decubit, și se poate ridica în postură verticală doar manifestînd semnul Gower. Semnul Gower este o obiectivizare clasică la examenul fizic în distrofie musculară și rezultă din astenia mușchilor proximali ai coapsei. Pentru a se ridica din poziție șezîndă sau decubit, copilul trebuie inițial să se sprijine în coate și genunchi. Ulterior, genunchii și coatele sunt extinse spre a ridica corpul. Apoi, palmele și tălpile sunt treptat aduse

împreună spre a deplasa centrul gravitațional deasupra picioarelor. La această etapă copilul poate elibera pe rând câte o mână și o sprijini pe genunchi odată ce își tîrîie piciorul spre a ajunge în poziție verticală. Deși semnul Gower este clasic, el nu este patognomic, fiind posibil în alte afecțiuni cu astenie musculară proximală. Fiind încă mobil, copilul la această etapă poate deja avea deformități minime, inclusiv rigiditatea iliopsoasului sau tendonului Achilles. Poate fi prezentă scolioză moderată în cazul cînd copilul pășește asimetric. Implicarea membrului superior are loc rar la început, deși astenia musculară în mână poate fi evidentă la testarea forței musculare manuale. Cînd implicarea membrului superior se manifestă în stadiile tardive ale DMD, aceasta este simetrică și odată cu slăbiciunea distală, de obicei, urmează o înrăutățire rapidă a situației copilului spre restrîngere la scaunul cu roțile [22].

A doua fază importantă în DMD este pierderea mobilității. Aceasta de obicei are loc între vîrsta 7-13 ani, unii pacienți devenind restrînși la scaunul cu roțile cîtred vîrsta de 6 ani. Dacă pacienții cu distrofie musculară sunt încă mobili după vîrsta de 13 ani, diagnosticul de DMD trebuie pus la îndoială, deoarece acești pacienți, de obicei, au distrofie Becker, o formă mai ușoară a bolii. Conform lucrării lui Emery, percentila 50-a pentru pierderea mobilității la pacienții cu DMD este vîrsta de 8,5 ani, iar percentila 95-a la 11,9 ani; percentila 99-a la 13,2 ani. Odată cu pierderea mobilității, de obicei urmează un curs rapid progresiv de contractură musculară sau retracție a tendonului și scolioză [22].

DMD este o boală fatală, în care decesul survine, de obicei, în decada 3-a a vieții, în majoritate datorită compromiterii funcției cardiopulmonare. Cel mai frecvent eveniment incitant este o infecție respiratorie, care progresează extrem de rapid în pofida cursului său inițial benign. Insuficiența respiratorie rezultantă poate ușor să apară din cauza hipoventilației nocturne progresive și hipoxiei, sau din cauza unei insuficiențe cardiace acute [22].

Alte modificări clinice în DMD includ: absența relexelor osteotendinoase profunde în extremitățile superioare și patelă (deși reflexul achilian rămâne intact chiar și în stadiile avansate ale bolii), durere în gambe la efort (<30% pacienți), pseudohipertrofia gambelor (60%) și macroglosie (30%) [22].

Distrofia Becker este similară DMD, însă deoarece pacienții au o oarecare cantitate de distrofină funcțională, manifestările distrofiei Becker apar mai târziu și sunt mai ușoare. Pacienții supraviețuiesc peste 40-50 ani [22].

Distrofia musculară Emery-Dreifuss este rară și se prezintă cu contracturi precoce și cardiomiopatie. Prezentarea tipică implică contracturi ale tendonului Achilles, contracturi ale flexiei cotului, contracturi ale extensiei gâtului, rigiditatea mușchilor paravertebrali lombari și afectare cardiacă. Decesul poate surveni în decada 4-a sau a 5-a de viață în rezultatul blocului atrio-ventricular, patologie de obicei absentă la debutul bolii [22].

Distrofia musculară distală autosomal-dominantă este o formă rară aparentă către vârsta 30-40 ani, și este mult mai frecventă în Suedia comparativ cu oricare alt stat. Acest tip de distrofie musculară cauzează slăbiciune ușoară ce afectează membrele superioare înaintea membrelor inferioare [22].

Distrofia facioscapulohumerală autosomal-dominantă determină astenia mușchilor faciali și membrului superior, diminuarea amplitudei mișcării scapulotoracice cu instalarea deformației de scapule alate. Acest tip de distrofie musculară poate afecta ambele sexe și apărea la orice vârstă, deși este mai obișnuită în adolescență [22].

Distrofia oculofaringiană autosomal-dominantă se instalează către vârsta 20-30 ani. Afectarea mușchilor faringieni determină disartrie și disfagie, care pot necesita miotomie cricofaringiană paliativă. Componenta oculară determină ptoză, care poate să un fie evidentă pînă la vârsta de 50 ani [22].

Niciuna dintre distrofiile musculare autosomal-dominante nu afectează longevitatea [22].

1.5. Impactul procesului patologic de bază a unei boli musculare asupra particularităților regenerării mușchiului striat

Regenerarea fibrelor musculare decurge doar în acele afecțiuni musculare în care este prezentă necroză. În DMD, ciclurile repetate implacabile de necroză induc activitate regeneratorie repetitivă, însă capacitatea proliferativă a celulelor satelite treptat se epuizează, și în rezultat regenerarea eșuează. Se presupune că populația de celule stem miogene adulte, care sunt imortale, nu este suficientă pentru a menține un număr adecvat de miogeni progenitori spre a compensa ciclurile implacabile de necroză a fibrelor musculare și a preveni pierderea fibrelor musculare.

Tabel 1.1

Bolile mușchilor scheletici majore cu sau fără regenerare musculară semnificativă.

Sursa: Advances in Muscle Research [34].

Boli musculare necrotice cu regenerare	Boli musculare non-necrotice, fără regenerare
Distrofii	
Duchenne	Distrofia miotonică tip I și II
Becker	Distrofia facioscapulohumerală
Majoritatea distrofiilor centurii membrelor	
Boli inflamatorii musculare	
Dermatomiozită	Miozită prin corpi incluși
Polimiozită	
Boli musculare metabolice	
Boala McArdle	Boli mitocondriale
Criză hipertermică malignă	

Miopatii congenitale

Deficiența de carnitin-palmitoil-transferază

Miopatia Nemaline

Boala nucleului central

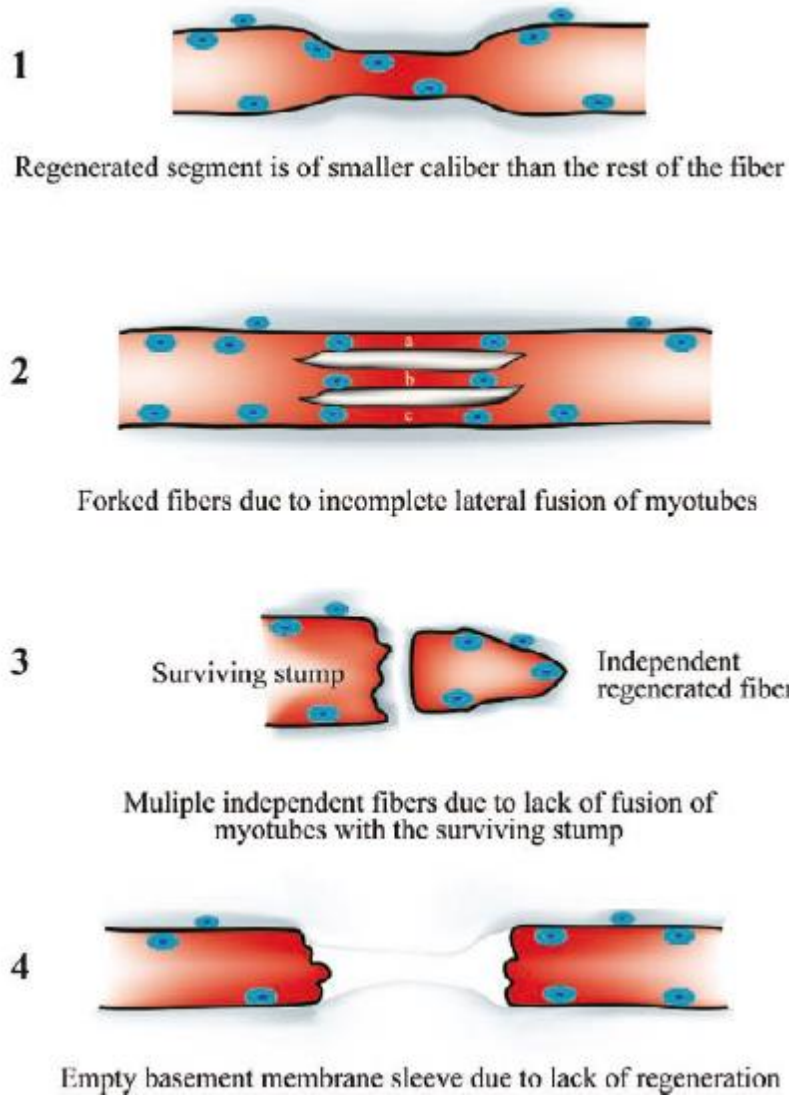


Fig. 1.6 Aberații ale regenerării fibrei musculare. Sursa: Advances in Muscle Research [34].

În DMD acumularea progresivă a țesutului conjunctiv endomisial este o proprietate proeminentă a cărei impact asupra regenerării este examinată. O teorie susține că

acumularea țesutului conjunctiv are loc deoarece în locul eșecului regenerării, sculurile de lamină bazală goală servesc în calitate de focare pentru depozitarea progresivă a colagenului. În conformitate cu altă teorie, acumularea țesutului conjunctiv endomisial este rezultatul unei activități înalte a fibroblaștilor endomisiali secundar concentrației înalte de citokine fibrogene în spațiul endomisial, eliberate de macrofagi și alte celule inflamatorii în mușchiul distrofic. Nu poate fi exclusă posibilitatea operării ambelor procese; iar, odată ce fibroza endomisială extensivă este nocivă pentru funcția musculară, inhibiția cytokinelor fibrogene ar putea avea valoare terapeutică [34].

Diminuarea circumferinței fibrelor regenerate (Fig.1.6) (1) este datorită numărului insuficient de mioblaști care generează un număr mai mic decât necesar al mionucleilor în segmentul regenerat. Acest fapt va determina un volum celular redus pentru a menține raportul standard al numărului mionucleilor la volumul citoplasmic. Fenomenul propriu-zis explică prezența fibrelor de calibru mic în DMD, unde ciclurile de necroză repetitivă progresiv reduc numărul celulelor satelite și ”vigoarea regenerativă”. Furcarea fibrelor musculare (2) are loc când fuziunea laterală a miotubulilor regeneratorii nu are loc, adesea datorită unei înlăturări proaste a debrisiului necrotic de fagocite ”leneșe”, fapt atestat în miopatiile inschemice precum dermatomiozita. Altă aberație rară este eșecul miotubulilor regeneratorii de a fuziona cu unul sau ambele ”cioturi” supraviețuitoare, întrerupând continuitatea fibrei musculare și afectând negativ generarea forței de această fibră, chiar dacă segmentul regenerat a obținut un calibru normal [34].

1.6. Mecanismele de miogeneză ale celulelor stem hematopoetice

Celulele stem hematopoetice (HSC) exprimă markerul panhematopoetic CD45 [10]. Mai multe studii au cercetat la nivel preclinic [3, 9, 28, 36, 26] și clinic [69, 35, 73] incorporarea celulelor stem din măduva osoasă - în mușchii scheletici, originea

hematopoetică fiind argumentată de prezența markerului CD45 în celulele selectate pentru transplantare, obținând rate variabile de fuziune.

Rudnicki M.A. analizează 3 mecanisme raportate prin care celulele stem transplantate potențial participă în miogeneza regenerativă: (1) HSC derivate din măduva osoasă circulă spre locurile de leziune musculară, unde formează celule musculare satelite care efectuează repararea țesutului; (2) celulele inflamatorii (mieloide), precum monocitele, macrofagele și neutrofilele fuzionează cu o rată mică cu miotubulii în timpul regenerării musculare; (3) mușchii conțin o populație rezidentă de celule stem mature, care formează celule satelite în condiții fiziologice [12].

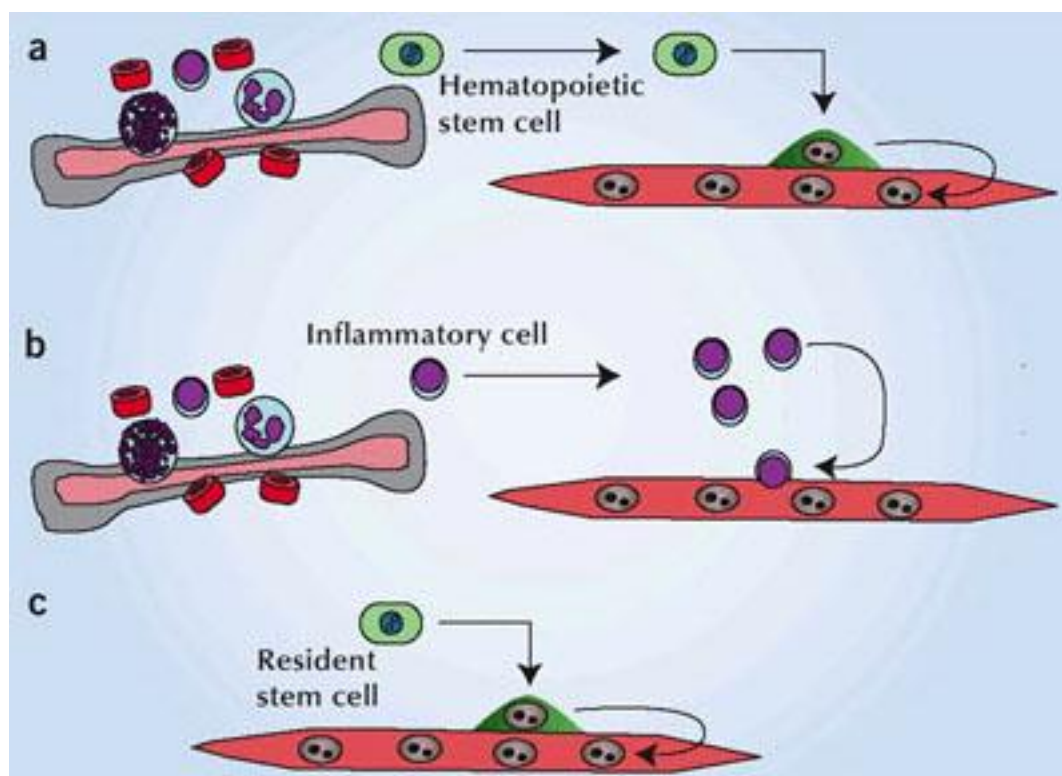


Fig. 1.7 Mecanisme diferite prin care o celulă stem transplantată potențial participă în miogeneza regenerativă. Sursa: Medscape [61].

LaBarge et al. [36] a raportat progresia biologică din celulele adulte ale măduvei osoase spre celule stem musculare mononucleate (celule satelite), și apoi spre fibra musculară multinucleată.

Camargo et al. [14] a demonstrat că o singură HSC produce precursori mieloizi, care circulă spre țesutul muscular lezat și fuzionează cu miofibrelor, proces numit miogeneză derivată din măduva osoasă. Rata mionucleelor donator-origine din numărul total a constituit doar 0,03-0,076%, și aceștia erau central aliniați - specific regenerării miogene. Autorul susține că întreaga activitate miogenă a măduvei osoase derivă din HSC și precursorii lor hematopoetici. Utilizând o strategie de urmărire a descendenței, studiul demonstrează că miofibrelor derivă din celule mieloide mature circulante, care migrează în condițiile inflamației locale spre mușchiul scheletal aflat în regenerare, și se încorporează stochastic în miofibrelor mature [14].

Este raportat că pînă la 13% celule satelite își au originea din măduva osoasă [14], și că celulele satelite pot deriva anume din celulele CD45+ la expunerea acestora la factorii de creștere din familia *Wnt* [18]. Însă, dovezile istorice arată repetat că după iradierea locală cu doze înalte, mușchiul prezintă deficit sever și de lungă durată în creștere și regenerare, fapt ce riguros implică că celulele stem circulante nu pot restabili îndeajuns fondul de celule satelite, pînă și în nișele ablațiate [14].

Negroni et al. [49] au identificat o fracție de celule mononucleate prezente în sîngele periferic al adulților, precursori hematopoetici/endoteliali, ce exprimă markerul celulelor stem CD133 (AC133). Aceste celule prezintă un potențial regenerativ miogen *in vivo* mai mare decît cel al celulelor satelite, migrează extensiv în toată lungimea mușchiului injectat și repopulează nișa de celule satelite. Datorită rezultatelor promițătoare obținute pe cobai, a fost efectuat un studiu clinic pe 8 pacienți cu DMD spre a confirma inofensivitatea transplantării autologe, nefiind observate efecte adverse locale sau sistemice [75, 73].

Pacienții tratați aveau un raport crescut de capilare per fibre musculare, cu predominarea miofibrilor miozin-pozitive rapide versus lente [73].

Până și celulele CD45+ rezidente în mușchiul scheletic adult, în condiții de leziune musculară, prezintă potențial miogen [58].

1.7. Aplicații clinice ale miogenezei regenerative prin celule stem hematopoetice

Celulele stem mai ușor accesibile decât cele musculare (care necesită biopsie) și care nu au fost afectate de micromediul mușchiului distrofic, nici epuizate de cicluri continui de regenerare musculară, ar fi celule candidat-perfect pentru abordarea distrofiilor musculare [43]. Celulele stem ale măduvei osoase și sîngelui periferic sunt ușor accesibile și extins caracterizate, fapt ce a atașat un optimism precaut pentru aplicarea lor potențială în distrofiile musculare.

Scopul transplantării celulare este substituția țesutului sau unei populații de celule afectate de boală sau nefuncționale; stimularea celulelor predecesorii proprii pentru activarea regenerării reparative. Se cunoaște abilitatea celulelor stem de a se integra în structuri tridimensionale ale organismului, fapt ce asigură perspectivă utilizării lor în terapia de substituție [1].

Măduva osoasă contribuie într-o anumită măsură la regenerarea musculară. HSC administrate intramuscular migrează în zonele de distrofie și diferențiază în celule musculare. Administrarea intravenoasă a HSC, de asemenea, determină incorporarea nucleelor lor în mușchi și expresia distrofinei [78].

În mare măsură, mecanismul de acțiune a celulelor transplantate rămîne neelucidat pînă la sfîrșit și, deseori, folosirea practică a metodei anticipează argumentarea științifică. S-a observat că după transplantarea celulară se activează proliferarea celulelor lojei recipiente și restabilirea parțială a structurii și funcției organului [1].

Deși încorporarea celulelor donor în fibrele musculare lezate are loc, procentul celulelor greifate în mușchii recipienți pare a fi sub nivelul considerat clinic-eficient la pacienții cu distrofii musculare [59].

II. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Metodologia cercetării teoretice

Studiul de revizuire a literaturii de specialitate s-a orientat către aplicabilitatea terapiei celulare prin HSC în regenerarea musculară. Analiza contribuției celulelor stem hematopoetice a fost cercetată prin selectarea studiilor relevante preclinice și clinice, care au raportat atașarea sau absența incorporării HSC și precursorilor mieloizi în fibra musculară striată. Datorită comodității prelevării, izolării și administrării, fracțiile hematopoetică și mezenchimală de celule stem derivate din măduva osoasă sunt extensiv evaluate în diverse domenii ale terapiei celulare. Din revizuire au fost excluse studiile orientate pe contribuția celulelor stem mezenchimale în miogeneza secundară.

În revistă au fost incluse studii experimentale, observaționale și de tip review, căutate prin intermediul pubmed și sciencedirect, cu ajutorul accesului asigurat de proiectul Hinari al OMS.

Studiile selectate au fost comparate după protocolul de studiu și evaluate critic, pentru a interpreta rata fuzionării HSC cu mușchii gazdei, condițiile fuzionării, reproductibilitatea metodei prezentate; influența metodologiei prelevării, selectării și administrării HSC asupra rezultatului; aplicarea mediilor promiogene în cultivarea fracțiilor specifice de celule stem hematopoetice; aberațiile procesului de miogeneză reparatorie, etc.

Deși majoritatea studiilor prezente în domeniu sunt preclinice, iar modelele animale nu reflectă perfect situația clinică, fuziunea HSC cu fibrele musculare striate la oameni este, de asemenea, raportată. Un factor extraordinar este eficiența clinică, când în pofida unui număr minor de mionuclee derivate din HSC, există modificări clinice și paraclinice decelabile. Acest fapt ne comunică nu doar despre eficiența grefării, dar și despre funcționalitate, deci plasticitatea și diferențierea HSC în miofibre.

Au fost cercetate și unele studii restrânse la anumite subpopulații de HSC, orientate spre identificarea amprentelor genetice unice ale celulei stem hematopoetice promiogene, dintre care s-au distins celulele CD133+, evaluate deja și la nivel clinic.

Una dintre caracteristicile bolilor ereditare este neuniformitatea distribuției lor în diferite populații. Astfel, incidența și prevalența morbidității prin distrofii musculare în Republica Moldova au fost obținute din articolul Sacara V. et al. (2012), Centrul Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală [62], raportarea datelor cuprinzând analiza a 1101 familii și colectarea continuu a informației inițiată în 1991; fapt ce determină registrul acestui studiu a fi cel mai amplu la moment în estimarea datelor statistice privind bolile neuromusculare ereditare în RM.

Diagramele elaborate s-au efectuat prin intermediul Microsoft Office Excell 2013.

2.2. Materialul de laborator și metodologia de lucru

Pentru a cerceta grefarea HSC în mușchiul striat a fost efectuat un studiu preclinic experimental pe 6 șoricea de laborator albi (specia *Mus Musculus*), cu vârsta de 3 – 4 luni și greutatea de 20-30g, în calitate de recipienți, și 3 șoricea de aceeași specie cu vârsta 8 săptăm. în calitate de donatori. De la donatori s-a prelevat măduva osoasă, a fost izolată fracția hematopoetică prin decantare, și cultivare cu separare după criterii morfologice. HSC cultivate au fost administrate intravenos la șoriceii recipienți, la jumătate dintre aceștia fiind creat modelul de leziune prin administrarea CTX intramuscular; iar pentru a preveni răspunsul imun, toți recipienții au fost mieloablaționați prin iradiere. Ulterior, la analiza histologică a mușchiului tibialis anterior s-a cercetat comparativ rata mitozei.

2.2.1. Prelevarea celulelor stem hematopoetice murine

Celulele stem hematopoetice au fost prelevate din membrele superioare și inferioare a 3 șoricea de 8 săptămîni, care au servit în calitate de donatori. Șoriceilor li s-a aplicat anesteziei generală prin administrarea intraperitoneală a Calypsol® [Ketamină]

100mg/kg, Gedeon Richter și Seduxen® [Diazepam], 0,5mL/kg, Gedeon Richter. După anestezie, au fost sacrificați prin dislocație cervicală, sterilizați în 100mL alcool etilic 70% timp de 3 minute. Protocolul includea: disecarea țesuturilor moi de la os cu ajutorul foarfecelor, fracturarea femurului inferior de la capul femural, excizarea femurului și tibiei, rezecția humerusului la nivelul axilei. Oasele au fost colectate bilateral, plasate într-o cutie Petri, fiecare dintre ele au fost fin curățite cu câte o meșă de tifon steril (pentru a detașa țesuturile moi) și ulterior plasate într-o cutie Petri cu 5mL mediu α -MEM (*engl: Minimum Essential Medium Alpha*) suplimentat cu FBS 2%. S-au înlăturat epifizele humerusului, tibiei și femurului și s-a inserat acul (0,45mm) unei seringi de 1 mL în cavitatea medulară, iar măduva osoasă a fost spălată în exterior prin injectarea a 3mL mediu α -MEM. Cavitățile au fost spălate de 3 ori (a câte 1 mL α -MEM), pînă oasele au devenit pale. Cu o seringă de 5mL s-a colectat măduva expulzată și s-a plasat în camera de elutriere (viteza 1260G, t 25°C). Metodologia prelevării și izolării a fost adaptată după protocolul publicat de Zhu H. et al. (2010) [83] și Bunting K.D. et al. (2008) [31].

2.2.2. Izolarea celulelor stem hematopoetice murine

După adăugarea a toată măduva osoasă colectată în camera de decantare, s-a colectat 100mL de mediu cu fluxul de 15mL/min, fracție înlăturată. Menținînd viteza de rotație constantă s-a ajustat fluxul la 25mL/min și s-a colectat 100mL mediu. Această fracție conține celule HSC. Mediul de decantare ce conține fracția 25 de celule a fost transferat în eprubete de 50mL, iar ulterior centrifugate la 400G pentru 10 min la 4°C. Celulele au fost resuspendate în mediul α -MEM.

2.2.3. Cultivarea celulelor stem hematopoetice murine

Suspensia celulară a fost plantată pe suport organic în flacoane de cultură celulară monostrat, cu densitatea 1×10^6 celule/cm², cultivate pe mediu nutritiv α -MEM cu 10% ser bovin fetal (FBS) și 100U/mL penicilină, incubate la 37°C în 5% CO₂ pe durata de 3

zile. Numărarea celulelor a fost determinată prin calcul sub microscop optic utilizând camera Goryaev (hemocitometrul). În ziua 3-a a fost schimbat mediul cu înlăturarea celulelor aderente și debrisiului tisular, iar supernatantul - reimplantat în flacoane noi, fără schimbarea conținutului mediului. Ulterior, celulele au fost menținute încă 4 zile în acest mediu nutritiv, după care transplantate.

HSC au fost diferențiate morfologic de MSC prin faptul că HSC cresc non-aderent la plasic, comparativ cu MSC – care aderă la placa de plastic. Sigur această populație heterogenă separată după caractere morfologice nu constă din HSC pure, acestea constituind doar fracția majoritară.

Mediul α -MEM constă din aminoacizi neesențiali, piruvat de sodiu, acid lipoic, biotină, vit.B12 (tabel 2.1). Mediul FBS (*engl: Fetal bovine serum*) este fracția sanguină rămasă după coagularea naturală a sîngelui, urmată de centrifugare spre a înlătura eritrocitele.

Tabel 2.1

Componentele mediului α -MEM [44]

Componente	Concentrație (mg/L)
SĂRURI ANORGANICE	
Clorură de Calciu (CaCl ₂) (Anhidru)	200.00
Clorură de Potasiu (KCl)	400.00
Sulfat de Magneziu (Anhidru)	97.67
Clorură de Sodiu (NaCl)	6800.00
Bicarbonat de Sodiu (NaHCO ₃)	2200.00
Fosfat de Sodiu-H ₂ O (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	140.00
ALTE COMPONENTE	
D-Glucoză	1000.00
Acid lipoic	0.20
Fenol roșu	10.00
Piruvat de sodium	110.00
AMINO ACIZI	
L-Alanină	25.00
L-Arginină	105.00
L-Asparagină-H ₂ O	50.00

L-Aspartic Acid	30.00
L-Cystină	24.00
L-Cysteină-HCl-H ₂ O	100.00
L-Glutamic Acid	75.00
L-Glutamină	292.00
Glicină	50.00
L-Histidină	31.00
L-Isoleucină	52.50
L-Leucină	52.40
L-Lysină	58.00
L-Methionină	15.00
L-Fenilalanină	32.00
L-Prolină	40.00
L-Serină	25.00
L-Threonină	48.00
L-Triptophan	10.00
L-Tirozină	36.00
L-Valină	46.00
VITAMINE	
L-Ascorbic Acid	50.00
Biotină	0.10
D-Ca Pantotenat	1.00
Clorură de colină	1.00
Acid folic	1.00
i-Inositol	2.00
Niacinamiă	1.00
Piridoxal HCl	1.00
Riboflavină	0.10
Thiamină HCl	1.00
Vitamina B12	1.36

2.2.4. Inducerea leziunii musculare

Studiul experimental a fost efectuat pe 6 șoricei de laborator albi (specia *Mus Musculus*), cu vârsta de 3 – 4 luni și greutatea de 20-30g, în calitate de recipiente. La 3 dintre acești șoricei (lotul cazurilor) s-a injectat cardiotoxină (0,1 mL soluție de 10 μ M [10 μ g/mL] CTX în 0,9% sol. NaCl; volumul soluției injectabile – 1 mL) în venterul mușchiul tibial anterior stîng, sub protecția anesteziei generale administrate intraperitoneal (Calypsol® [Ketamină] 100mg/kg, Gedeon Richter; Seduxen® [Diazepam], 0,5mL/kg,

Gedeon Richter). Cardiotoxina este o toxină citolitică extrasă din venin de șarpe care selectiv determină degenerescența miofibrelor, însă lasă intacti nervii, vasele sanguine și celulele satelite. Din acest motiv s-a acordat preferință metodei CTX versus criodistrucție. În studiu, pentru a induce un singur ciclu de degenerare-regenerare a miofibrelor, a fost utilizată cardiotoxină (CTX-1) purificată din veninul șarpelui *Naja nigricollis* (Latoxan®, Rosans, Franța), cu $M=6827,4$. Pentru control, mușchiul contralateral era injectat la același animal cu sol.NaCl 0,9% (1mL).

La ceilalți 3 șoricei (lotul control), nu a fost efectuată vre-o oarecare intervenție.

2.2.5. Protocolul de iradiere

Ulterior, în ziua următoare (prima zi post-lezional), șoriceii au fost iradiați.

Pentru mieloablație, în ziua transplantării, recipientii au fost iradiați cu raze gamma, cu doza sumară de 900cGy, aplicată cu rata de 85cGy/minut iradiind tot corpul recipientului. Protocolul a fost adaptat după Abedi et al. (2004) [3].

Se consideră că grefarea eficientă a HSC transplantate depinde de abilitatea HSC donatorului de a ocupa nișa de celule stem, care este populată de HSC gazdei înainte de mieloablație [82].

2.2.6. Protocolul de transplantare a celulelor stem hematopoetice

Peste 4 ore de la ultima doză de iradiere, s-a administrat suspensie celulară, cu concentrația celulelor în suspensie de 10 mln celule/mL și inoculată intravenos în vena laterală a cozii la toți cei 6 șoricei recipienti. Injectarea s-a efectuat cu seringă de insulină, după prelucrarea cozii cu alcool etilic 70%. Înainte de injectare, șoriceii au fost încălziți sub lampă pentru a obține vasodilatație, iar coada a fost imobilizată prin situarea șoricelului sub borcan, cu compresia ușoară cu gura borcanului peste coada dispusă în afară.

2.2.7. Analiza histologică a fragmentelor de țesut muscular striat

Șoriceii au fost sacrificați prin dislocație cervicală, fiind sub anestezie generală, după 4 săptămâni de la transplantare. S-au prelevat mușchii tibialis anterior bilateral, efectuate secțiuni cu ajutorul microtomului (grosimea de 5 μ), efectuate frotiuri cu colorație hematoxilin-eozină (H&E).

III. REZULTATE OBȚINUTE ȘI DISCUȚII

3.1 Metode de colectare și cultivare a celulelor stem hematopoetice

3.1.1 Surse și metodele de prelevare a celule-stem hematopoetice

Se crede că HSC pot fi găsite doar în măduva osoasă, unde decurge hematopoeza adultului, însă au fost raportate fonduri de celule stem hematopoetice în țesuturi non-medulare, precum mușchiul striat, cord, creier, plămâni și rinichi [27].

Celulele stem hematopoetice pot fi prelevate din măduva osoasă hematogenă, sângele periferic sau cordonul ombilical. Fiecare dintre aceste surse asigură rezultate clinice similare, deși utilizarea variază în dependență de vârsta donatorului și recipientului, indicații și preferința donatorului/centrului. De obicei, la copii se preferă colectarea HSC din măduva osoasă, la adulți se pot preleva atât din măduva osoasă, cât și din sângele periferic; iar colectarea HSC din cordonul ombilical depinde de disponibilitatea unității compatibile în bancă și absența unui donator HLA identic [40].

Conținutul cel mai înalt de HSC îl deține măduva osoasă (1:10.000), urmat de sângele periferic (1:100.000), apoi de cordonul ombilical. Măduva osoasă poate fi aspirată din creasta iliacă posterioară, donatorul fiind anesteziat regional. HSC circulă în sângele periferic în concentrații mici, și pot fi identificate și cuantificate cu ajutorul citometriei de flux (celulele ce exprimă antigenul CD34). Administrarea factorilor de creștere hematopoetici recombinanți (cytokinele G-CSF sau GM-CSF) pacienților sau donatorilor, hiporeglează moleculele de adeziune a celulelor CD-34 și le eliberează în sângele periferic, de unde pot fi colectate prin afereză. Pentru un donator tipic, circa 24 L de sânge pot fi procesați timp de 2 zile, pentru a colecta aproximativ 500 mln CD34+ celule, o populație de celule progenitoare bogată în celule stem hematopoetice [77, 47].

Diferențele esențiale între sursele de HSC. Tradus după sursa: European Group for Blood and Marrow Transplantation [40].

Măduva osoasă	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Colectarea prin anestezie generală ▪ Număr limitat de celule stem hematopoetice ▪ Numărul mediu de celule nucleate: $2 \times 10^8/\text{kg}$ ▪ Numărul mediu de celule CD34+: $2,8 \times 10^6/\text{kg}$ ▪ Numărul mediu de limfocite T: $2,2 \times 10^7/\text{kg}$
HSC mobilizate în sângele periferic prin G-CSF	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Colectare ușoară ▪ Nu este necesară anestezia generală ▪ Efecte adverse ale G-CSF ▪ Număr mare de celule ▪ Numărul mediu de celule nucleate: $9 \times 10^8/\text{kg}$ ▪ Numărul mediu de celule CD34+: $7 \times 10^6/\text{kg}$ ▪ Numărul mediu de limfocite T: $27 \times 10^7/\text{kg}$
Sângele din cordonul ombelical	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Colectare ușoară și inofensivă ▪ Disponibilitate imediată a unităților crioconservate și risc minim pentru boli transmisibile ▪ Nonconcordanțele HLA parțiale sunt acceptabile ▪ Numărul de celule este factorul limitant ▪ Numărul mediu de celule nucleate: $0,3 \times 10^8/\text{kg}$ ▪ Numărul mediu de celule CD34+: $0,2 \times 10^6/\text{kg}$ ▪ Numărul mediu de limfocite T: $0,4 \times 10^7/\text{kg}$

În 1995, 3 studii esențiale au demonstrat siguranța și fezabilitatea utilizării alogrefelor mobilizate din sângele periferic prin G-CSF. Pacienții au prezentat acceptarea promptă a grefei, cu incidența bolii grefei-versus-gazdă similară recipientilor de măduvă osoasă [40].

Utilizarea sîngelui din cordonul ombilical este restrînsă la copii, deoarece cantitatea de HSC este mică și astfel este dificil de găsit un grefon cu număr suficient de celule [65, 77]. Celulele stem din cordonul ombilical se colectează la nașterea fătului, și se crioconservează timp îndelungat, iar la necesitate se utilizează pentru tratamentul donatorului [46]. Sîngele din cordonul ombilical are mai multe avantaje teoretice datorită imaturității celulelor non-născuților. HSC din cordonul ombilical sunt adesea celule stem hematopoetice primitive, care in-vivo sunt abile să producă celule stem repopulante de termen lung. Proprietățile celulelor din cordonul ombilical ar trebui să compenseze disavantajul numeric relativ mic conținut într-o unitate de sînge din cordon, prin expansiune clonală rapidă la pacienții mieloablaționați. În pofida capacității celulare expansive a HSC cordonului ombilical, rezultatele clinice demonstrează că recuperarea hematopoetică este întîrziată după acceptarea grefării transplantului de sîngele cordal, însă se ameliorează în cazul infuzării unui număr mai mare de celule nucleate CD34+. Alt avantaj al transplantării sîngelui din cordonul ombilical este imaturitatea sistemului imun la naștere, proprietate care diminuează potențialul aloreactiv al limfocitelor și consecvent reduce incidența și severitatea bolii grefă-versus-gazdă după un transplant HLA potrivit sau nepotrivit. Aceste proprietăți determină criterii mai puțin stringente în selectarea HLA potrivită a donatorului și recipientului. Studii recente au arătat că ”doza de celule” este cel mai important factor pentru selecția donatorilor: este necesar un minim de 3×10^7 celule nucleate/kg pentru o grefare cu succes [40].

3.1.2 Tehnici de cultivare și medii de cultură

Rezultatul clinic al transplantării HSC este înalt-corelat cu numărul de celule administrate. La oameni, HSC recoltate, de obicei, se administrează fără extindere sau cultivare în prealabil pe careva medii de cultură. În cazul experimentelor preclinice, pot fi utilizate variate medii de cultură pentru expansiune.

Aplicațiile mediilor de cultură pentru HSC sunt: (1) expansiunea HSC prelevate din măduva osoasă, sângele periferic sau din cordonul ombilical; (2) generarea unui număr mare de celule sanguine mature și progenitori specifici (ex. celule eritroide, megacariocite, etc.); (3) cultivarea de durată scurtă sau lungă a HSC umane sau murine; (4) identificarea noilor reglatori ai hematopoezei, etc. [67].

Odată ce sunt aplicate diverse protocoale de studiu preclinic pentru a demonstra contribuția și/sau originea hematopoetică a precursorilor miogeni, fiecare cercetare s-a axat pe anumite medii de culturi celulare pro-miogene. Mai multe studii preclinice susține că celulele hematopoetice injectate în mușchiul aflat în regenerare sau cocultivate cu mioblaști aflați în diferențiere, devin miogene [18, 63].

Studiile de cultivare celulară mai vechi au raporat că celulele stem derivate din măduva osoasă se pot diferenția în miotubi *in vitro*, arătând că astfel pot forma mușchi scheletic, fapt confirmat ulterior de Muguruma Y. et al. (2003). În cercetarea sa, Muguruma Y. et al. a utilizat o cultură de celule precursorii multipotente adulte (MAPC, *engl: multipotent adult progenitor cells*) izolate din măduva osoasă a 21 voluntari sănătoși (11-47 ani). Selectarea celulelor mononucleare derivate din măduva osoasă a fost obținută prin adăugarea polizaharidului Ficoll-Paque și centrifugare, ulterior plasate cu o densitate de $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ pe vase de cultură acoperite cu fibronectină umană (5ng/mL) în mediul MAPC. Celulele aderente emergente au fost extinse menținând densitatea celulară sub $5 \times 10^3 / \text{cm}^2$. După 2-3 săpt., celulele au fost tripsinizate, tratate cu particule imunomagnetice CD45 și GlyA și aplicate în coloane de depleție MACS (*engl: magnetic-activated cell sorting*) pentru separare. Celulele eluate, lipsite de particule înalt-aderente și de celule de dimensiuni mari, precum și de celule hematopoetice reminiscente, au fost plasate a câte 10 celule per diviziune în plăci de microtitrare cu 96-diviziuni, acoperite cu fibronectină, și extinse la o densitate de $0,5-3 \times 10^3 / \text{cm}^2$. Pentru studiul diferențierii musculare, $0,5-1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ MAPC la 25-30 dublări populaționale au fost plasate în mediu de cultură pentru

MAPC conținând 5% ser bovin fetal, 10ng/mL bFGF (engl: *basic fibroblast growth factor*), 10ng/mL VEGF (engl: *vascular endothelial growth factor*), și 10ng/mL IGF-1 (engl: *insulin-like growth factor 1*). Celulele au fost lăsate a conflua și au fost cultivate pentru 2 săpt. cu schimbarea mediului la fiecare 4 zile. În a 14-a zi, celulele au fost fixate cu 4% paraformaldehidă și colorate pentru markeri miogeni. Pentru a efectua imunocolorație, inițial a fost blocată atașarea nespecifică a anticorpilor prin incubarea celulelor cu 5% ser de la animalele la care anticorpii secundari erau crescuți. Pentru colorația proteinelor celulare și nucleare s-a adăugat 0,01% triton-X-100. Celulele au fost incubate peste noapte la 4°C cu următorii anticorpi primari în concentrațiile indicate: MyoD (5,8A, 1:20) și miogenin (F5D, 1:200); miozină scheletică (MY-32, 1:1600), α -actină (EA-53, 1:800) și desmină (DE-U-10, 1:40). Atașarea specifică a anticorpilor respectivi a fost vizualizată ca produs cu reacție maro a substratului peroxidazic 3, 3'-diaminobenzidin utilizând setul ABC sau ca semnale fluorescente. MAPC incubate în mediul anterior-descriș, ~ în ziua 10-a se observa transformarea lor *in vitro* în miotubi, care se colorau pozitiv pentru α -actină și miozină scheletică, și au demonstrat prezența miofibrelor striate în citoplasmă. A fost examinată expresia markerilor muscular-specifici în cursul temporal, astfel în ziua 4-a celulele mononucleare deja exprimau MyoD, frecvența fiind maximă în ziua 7-a (28-40%), ulterior exprimând declin. Ulterior a urmat creșterea numerică a celulelor mononucleare și tubilor multinucleați ce exprimau miogenină, α -actină și miozină scheletică. Proportia miotubilor multinucleați pozitivi pentru markerii menționați a variat în câmpurile examinate în diapazonul 10-42%. Proliferarea *in situ* a celulelor mononucleare pozitive pentru MyoD și fuziunea subsecventă a acestora a format miotubi multinucleați. Pentru investigarea grefării MAPC și diferențierii în mușchi matur *in vivo*, în studiu au fost injectate MAPC nediferențiate sau MAPC tratate în condiții miogene, în mușchii tibialis anterior aflați în regenerare a murinelor. Inițial, în MAPC a fost transdusă gena EGFP (engl: *enhanced green fluorescent protein*). Celulele transduse erau abile de a forma tubi multinucleați care se

colorau pozitiv pentru desmină, α -actină și miozină *in vitro*. La injectarea MAPC nediferențiate, pe secțiunile histologice au fost observate puține celule EGFP-transduse. Rezultatele analizei Southern blot erau consistente cu observația histologică. Totuși aceste celule EGFP-pozitive erau limitate în țesutul cicatricial și nu exprimau markeri miocitari. În contrast, 9 săpt. după injectarea intramusculară a MAPC tratate în condiții miogene, numeroase celule mononucleare EGFP-pozitive erau depistate la periferia mușchiului aflat în regenerare. Prezența genei EGFP a fost confirmată prin analiză Southern blot. Important era faptul că celulele ce exprimau EGFP s-au colorat pozitiv pentru α -actină și miozină. Mai mult ca atât, în animalele sacrificate peste 27 săpt., aceste celule mononucleare EGFP-expresante au fuzionat împreună și au format miotubi, în care alinierea proeminentă a α -actinei și miozinei era clar vizualizată prin colorație imunofluorescentă. Aceste rezultate indică că MAPC umană se poate grea și diferenția în miotubi maturi *in vivo*. În plus, eficiența grefării este mult crescută prin pretratarea MAPC în condiții miogene clinic aplicabile [45, 51].

3.1.3 Modalitățile de administrare a celulelor stem hematopoetice la om

Administrarea HSC la om a fost cercetată prin injectare intravenoasă și intramusculară. Totuși, rata incorporării acestora în fibre musculare rămîne mică. Administrarea intramusculară directă asigură grefare de pînă la 12%, sugerînd că limitarea în grefarea miofibrelor poate fi datorată pierderii celulelor urmînd livrarea sistemică sau inabilitatea celulelor de a trece bariera vasculară [51].

Pentru a depista efectul terapeutic al transplantării celulelor stem din sîngele cordonului ombilical asupra regenerării musculare și expresiei distrofinei în DMD, Zhang et al. au efectuat transplantarea acestor celule prin injectare intravenoasă la un băiețel de 12 ani cu DMD, confirmat prin analiză genetică. Profilul biochimic inclusiv creatinin-kinaza (CK), exonul deleționat al genei DMD, mușchii regenerați și expresia proteinei

distrofina, funcția locomotorie a copilului cu DMD au fost evaluate regulat. Rezultatele arătau că la diferite intervale post-transplantare, ADNul sîngelui periferic a arătat că genotipul său era complet același ca al donatorului. La 60 de zile, analiza genelor DMD prin PCR a arătat că gena defectă DMD (ce conținea o deleție în exonul 19) era corectată prin transplantarea celulelor stem din cordonul ombilical. La 75 zile, biopsia mușchiului gastrocnemian a arătat prezența mioblaștilor și creșterea tubilor musculari. Expresia distrofinei era slabă. Analiza ADN a arătat că gena donatorului reprezenta 1-13% din ADN. Nivelul seric al CK băiatului a diminuat de la 5735 U/L către 274 U/L. În final, peste 100 zile, examenul fizic a relevat ameliorare în mîinile și picioarele pacientului. Sumar a fost concluzionat că terapia DMD cu transplantarea HSC din sîngele cordonului ombilical alogen poate restabili funcția hematopoetică, diminuează nivelul seric al CK, refacă distrofina în mușchi și ameliorează funcția locomotorie [35].

În pofida dovezilor variate ce demonstrează potențialul terapeutic al celulelor stem derivate din măduva osoasă în tratarea afecțiunilor musculare genetice, unele studii arată inversul. Lapidos et al. (2004) a raportat că urmînd transplantarea celulelor stem derivate din măduva osoasă la șoriceii δ -sarcoglican $^{-/-}$, în pofida grefării semnificative în țesutul muscular al gazdei, s-a format un nivel insuficient de miofibre δ -sarcoglican $^{+}$ pentru a salva fenotipul patologic. Adițional, cînd fracția hematopoetică a măduvei spinării a fost utilizată în tratarea cîinilor distrofici, nu a fost observată reconstituirea expresiei distrofinei asupra nivelului precedent, deși celulele au fost mobilizate cu administrarea G-CSF anterior injectării [39, 51, 20].

3.2 Rezultatele studiului pe animale de laborator

După 4 săpt. de la transplantare HSC, la analiza histologică a frotiurilor preparate prin microsecționarea mușchilor tibialis anterior și colorația H&E s-a evidențiat o rată a

mitozei majoră în recipientii cu leziune musculară CTX-indusă, versus recipientii fără leziune.

Nu am putut aprecia originea celelelor implicate în miogeneza reparatorie, sau estima grefarea HSC în mușchiul striat; însă metoda a permis a determina creșterea ratei nucleelor situate central (mitozei) în miofibrele striate postlezional. Se presupune originea HSC, odată ce în urma iradierii nișa de celule satelite este ablaționată.

3.3 Morbiditatea prin distrofii musculare în Republica Moldova

Tabel 3.1

Spectrul distrofiilor musculare ereditare în Republica Moldova [62]

Forma nosologică	Modul de transmitere ereditară	Numărul de pacienți	Cota în structura bolilor ereditare ale sistemului nervos, %
Miodistrofie facioscapulohumerală (Landouzy-Dejerine)	AD, AR	21	1,5
Miodistrofia membru-centrură	AR	157	11
Miodistrofia Duchenne-Becker	XL	234	16,5
Distrofie miotonică	AD	24	1,7

Studiul epidemiologic descriptiv a Secara V. et al. [62], a raportat morbiditatea prin patologii neuromusculare ereditare, inclusiv distrofii musculare, în Republica Moldova, înregistrând 412 pacienți cu distrofie musculară progresivă, estimând astfel prevalența de 11,5 cazuri la 100.000 populație. În urma studiului clinic și electromiografic efectuat la 600 pacienți cu boli ereditare neuromusculare, ce locuiesc în R.Moldova, potrivit

registrului genetic, patologiilor ereditare neuromusculare revin 58%, cu o prevalență de 2,35:100.000 locuitori.

Distrofiile musculare X-linkate, anume Duchenne și Becker, au fost raportate 234 cazuri, cu frecvența de 6,11:100.000 populație. La toți acești pacienți s-a determinat creșterea concentrației de creatinkinază de 6-20 ori comparativ cu norma, iar studiul EMG a indicat nivelul primar de afectare musculară.

Formele autosomal-recesive a miodistrofiei membre-centrură sunt cel mai des întâlnite la adolescenți. Prevalența în RM a fost estimată a fi 4,4:100.000 persoane, fiind depistați 157 pacienți, cu vârsta cuprinsă între 6-35 ani. În majoritatea cazurilor cursul bolii a fost lent, iar 5 femei au născut copii sănătoși. Forma autosomal-recesivă Leiden-Mobius a fost stabilită la 3 pacienți, boala progresând rapid cu imobilizarea instalată la vârsta de 7-10 ani și dezvoltarea deformațiilor.

Forma facioscapulohumerală a fost determinată la 21 pacienți, ce corespunde prevalenței de 0,58:100.000 populație. A fost raportat un polimorfism genetic și clinic deosebit în cadrul acestui grup, cu depistarea mai multor tipuri de răspândire a atrofiei. La câteva persoane atrofia a debutat cu mușchii faciali, ulterior mușchii regiunii deltoide și brațului. În 2 cazuri boala a debutat în copilărie și avea curs progresiv antrenând în procesul de atrofie mușchii faciali, brațelor, ulterior cu extindere pe mușchii toracici, abdominali, până la membrele inferioare.

Deși în Republica Moldova distrofiile musculare par a avea o prevalență minoră, cu siguranță faptul se explică prin ”hipodiagnostic”, odată ce este o rată incomparabil de mică pentru prevalența internațională la naștere: Duchenne 1:3500 (2,9:10.000) băieți nou-născuți; Becker 1:18.518 (0,5:10.000) băieți nou-născuți [22, 15], chiar comparând cu prevalența în rândul sexului masculin în câteva state: Estonia (DMD 12,76 x 10⁻⁵ băieți

sub 20 ani) [72]; Japonia (DMD $29,2 \times 10^{-5}$ bărbați) [33]; Olanda (DMD $23,7 \times 10^{-5}$ băieți nou-născuți anual; prevalență $5,4 \times 10^{-5}$ bărbați) [76]. Un alt factor este latența între debutul bolii și stabilirea diagnosticului definitiv, care peste hotare a fost raportată a fi în mediu 4,9 ani [16].

IV. CONCLUZII

- 1) Aplicabilitatea celulelor stem hematopoetice în terapia celulară a distrofiilor musculare rămîne disputabilă; deși în pofida ratei variabile de grefare, funcționalitatea și eficiența clinico-paraclinică este semnificativă.
- 2) Deși rămîne evazivă identificarea celulei stem hematopoetice optime pentru regenerarea musculară, s-au făcut pași enormi în identificarea markerilor celulari specifici ce asigură grefare înaltă, chiar și la nivelul studiilor clinice.
- 3) Rata fuzionării celulelor stem hematopoetice transplantate cu miofibrele striate ale gazdei este înalt dependentă de fracția, cantitatea și modul de administrare a celulelor stem, prezența leziunii musculare, imunocompetența gazdei.

BIBLIOGRAFIE:

1. Ababii I., Ciobanu P., Eșanu N., Nacu V. Actualități și perspective în transplantarea celulară. *Curierul Medical*, 2005. 3(285):42-46.
2. Ababii I., Nacu V., Topor B., et al. Celule stem în procesul de regenerare a țesuturilor scheletice. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei*, 2008. 5(19):19-23.
3. Abedi M, Greer DA, Colvin GA, et al. Robust conversion of marrow cells to skeletal muscle with formation of marrow-derived muscle cell colonies: a multifactorial process. *Exp Hematol*. 2004 May;32(5):426-34.
4. Bassel-Duby R., Olson E.N. *Biochemistry of Development: Striated Muscle*, (179-186). *Metabolism Vitamins and Hormones*, 2013.
5. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Feb 1;4(2). pii: a008342.
6. Bhatia M. AC133 expression in human stem cells. *Leukemia*. 2001 Nov;15(11):1685-8.
7. Bissels U., Eckardt D., Bosio A. Chapter 6: Characterization and classification of stem cells (pp 155-176). In Steinhoff G. (Ed.) *Regenerative Medicine: From Protocol to Patient*, 2nd ed. London, Springer, 2013.
8. Bittner R.E., Schöfer C., Weipoltshammer K., et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)*. 1999 May;199(5):391-6.
9. Bossolasco P, Corti S, Strazzer S, et al. Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells. *Exp Cell Res*. 2004 Apr 15;295(1):66-78.
10. Bröhl D, Vasyutina E, Czajkowski MT, et al. Colonization of the satellite cell niche by skeletal muscle progenitor cells depends on Notch signals. *Dev Cell*. 2012 Sep 11;23(3):469-81.

- 11.Brzoska E., Ciemerych M.A., Przewozniak M, et al. Regulation of muscle stem cells activation: the role of growth factors and extracellular matrix. *Vitamins and Hormones*, 2011(87):239-276.
- 12.Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Oct;16(5):525-32.
- 13.Buckingham M., Mayeuf A. Chapter 52. Skeletal muscle development, (pp 749-762). In Hill J. (Ed.) *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, Vol.2. Elsevier, 2012.
- 14.Camargo FD, Green R, Capetanaki Y. et al. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med*. 2003 Dec;9(12):1520-7.
- 15.CDC. Prevalence of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Among Males Aged 5-24 Years --- Four States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009 Oct 16;58(40):1119-22.
- 16.Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, et al. Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr*. 2009 Sep;155(3):380-5.
- 17.Committee on the Biological and Biomedical Applications of Stem Cell Research. *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine*. National Academies Press, 112p, 2002.
- 18.Corbel SY, Lee A, Yi L, et al. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat Med*. 2003 Dec;9(12):1528-32.
- 19.Dawn B, Bolli R. Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic Res Cardiol*. 2005 Nov;100(6):494-503.
- 20.Dell'Agnola C, Wang Z, Storb R, et al. Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood*. 2004 Dec 15;104(13):4311-8.

21. Díez Villanueva P, Sanz-Ruiz R, Núñez García A, et al. Functional multipotency of stem cells: what do we need from them in the heart? *Stem Cells Int.* 2012;2012:817364.
22. Do T.T. Muscular Dystrophy. Accesat 02.2014 pe <http://emedicine.medscape.com/article/1259041>
23. Dzierzak E., de Bruijn M. Isolation and Analysis of Hematopoietic Stem Cells from Mouse Embryos. In Klug C.A. (Ed.) *Hematopoietic Stem Cell Protocols*. Humana Press, New Jersey, USA, 2002:1-14.
24. EuroStemCell. Stem cell glossary. Accesat 09.2013 pe <http://www.eurostemcell.org/stem-cell-glossary>
25. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998 Mar 6;279(5356):1528-30.
26. Ferrari G, Mavilio F. Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord*. 2002 Oct;12 Suppl 1:S7-10.
27. Frommer S.A. Investigating the use of multipotent adult progenitor cells for treatment of Duchenne muscular dystrophy: a translational approach. 2009
28. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999 Sep 23;401(6751):390-4.
29. Guttridge D.C. Chapter 65 - Skeletal Muscle Regeneration (pp 921-933). In Hill J. (Ed.) *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, Vol.2. Elsevier, 2012.
30. Hayakawa J, Migita M, Ueda T, et al. Generation of a chimeric mouse reconstituted with green fluorescent protein-positive bone marrow cells: a useful model for studying the behavior of bone marrow cells in regeneration in vivo. *Int J Hematol*. 2003 Jun;77(5):456-62.

31. Juopperi T.A., Sharkis S.J. Isolation of Quiescent Murine Hematopoietic Stem Cells by Homing Properties. In Bunting K.D. (Ed.) *Hematopoietic Stem Cell Protocols, 2nd edition*. Humana Press. Springer Science, NJ, USA. 2008: 21-31.
32. Kallestad KM, Hebert SL, McDonald AA, et al. Sparing of extraocular muscle in aging and muscular dystrophies: a myogenic precursor cell hypothesis. *Exp Cell Res*. 2011 Apr 1;317(6):873-85.
33. Kanamori M, Morton NE, Fujiki K, et al. Genetic epidemiology of Duchenne muscular dystrophy in Japan: classical segregation analysis. *Genet Epidemiol*. 1987;4(6):425-32.
34. Karpati G., Molnar M.J. Muscle fibre regeneration in human skeletal muscle diseases. In Schiaffino S., Partridge T.(Eds.) *Skeletal Muscle Repair and Regeneration. Volume 3: Advances in Muscle Research*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2008:199-216.
35. Kaushik D.D. Umbilical cord derived stem cells for tissue therapy: current and perspectives. In Kaushik D.D., Satish M.T.(Eds.) *Stem Cells Basics and Applications*. McGraw Hill, New Dehli, 2009: 608-613.
36. LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 2002 Nov 15;111(4):589-601.
37. Lagha M, Brunelli S, Messina G, et al. Pax3:Foxc2 reciprocal repression in the somite modulates muscular versus vascular cell fate choice in multipotent progenitors. *Dev Cell*. 2009 Dec;17(6):892-9.
38. Lakshmi pathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev*. 2005 Jan;19(1):29-38.
39. Lapidos KA, Chen YE, Earley JU, et al. Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(11):1577-85.

40. Larghero J., Garcia J., Gluckman E. Sources and procurement of stem cells. European Group for Blood and Marrow Transplantation. Accesat 02.2014 pe http://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/EBMTESHhandbook/Documents/EBMT2008_Cap5.pdf
41. McKinnell I.W. Parise G., Rudnicki M.A. Muscle Stem Cells and Regenerative Myogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 2005(71):113-130.
42. McKinnell IW, Parise G, Rudnicki MA. Muscle stem cells and regenerative myogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 2005;71:113-30.
43. Meng J, Muntoni F, Morgan JE. Stem cells to treat muscular dystrophies - where are we? *Neuromuscul Disord*. 2011 Jan;21(1):4-12.
44. Minimum Essential Medium Alpha (MEM-A) / Formulation. Accesat 03.14 pe http://www.bioind.com/page_219
45. Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, et al. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003 Dec;31(12):1323-30.
46. Nacu V. Metodele biologice stimulative a procesului reparator osos. *Curierul medical*, 2009, 3(309):37-45.
47. Nagy RD, Tsai BM, Wang M, et al. Stem cell transplantation as a therapeutic approach to organ failure. *J Surg Res*. 2005 Nov;129(1):152-60.
48. National Institute of Health. Stem Cell Information. Hematopoietic Stem Cells. Accesat 10.2013 pe <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter5.aspx>
49. Negroni E, Riederer I, Chaouch S, et al. In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol Ther*. 2009 Oct;17(10):1771-8.
50. Ogawa M, LaRue AC, Mehrotra M. Hematopoietic stem cells are pluripotent and not just "hematopoietic". *Blood Cells Mol Dis*. 2013 Jun;51(1):3-8.

51. Otto A, Collins-Hooper H, Patel K. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J Anat.* 2009 Nov;215(5):477-97.
52. Ousset M, Van Keymeulen A, Bouvencourt G, et al. Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. *Nat Cell Biol.* 2012 Nov;14(11):1131-8.
53. Partridge, TA. Cells that participate in regeneration of skeletal muscle. *Gene Ther.* 2002;9,752-753.
54. Pauwelyn K.A., Verfaillie C.M. Transplantation of Undifferentiated, Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Current Topics in Developmental Biology*, 2006(74):201-251.
55. Paylor B., Natarajan A., Zhang R.H., et al. Nonmyogenic cells in skeletal muscle regeneration. *Current Topics in Developmental Biology*, 2011(96):139-165.
56. Perumbeti A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Accesat 11.2013 pe <http://emedicine.medscape.com/article/208954>
57. Pestronk, Alan. "Myogenesis & Muscle Regeneration". WU Neuromuscular. Washington University. Accesat 11.2013 pe <http://neuromuscular.wustl.edu/mother/myogenesis.html>
58. Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell.* 2003 Jun 27;113(7):841-52.
59. Rivier F, Gussoni E. Muscular dystrophies and stem cells: a therapeutic challenge. *Cytherapy.* 2002;4(6):513-9.
60. Romero NB, Mezmezian M, Fidziańska A. Main steps of skeletal muscle development in the human: Morphological analysis and ultrastructural characteristics of developing human muscle. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1299-310.

61. Rudnicki M.A. Marrow to Muscle, Fission Versus Fusion. *Nat Med.* 2003;9(12).
62. Sacara V., Levițchi A., Groppa S. Spectrul nozologic al bolilor ereditare ale sistemului nervos și particularitățile răspîndirii patologiilor neuro-musculare în Republica Moldova. *Buletin de Perinatologie*, 2012. 3(55):36-43.
63. Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, et al. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell.* 2004 Nov 12;119(4):543-54.
64. Shimizu Y, Sugiyama H, Fujii Y, et al. Lineage- and differentiation stage-specific expression of LSM-1 (LPAP), a possible substrate for CD45, in human hematopoietic cells. *Am J Hematol.* 1997 Jan;54(1):1-11.
65. Sirinoglu Demiriz I, Tekgunduz E, Altuntas F. What is the most appropriate source for hematopoietic stem cell transplantation? Peripheral stem cell/bone marrow/cord blood. *Bone Marrow Res.* 2012;2012:834040.
66. Stem Cell School. Glossary. Accesat 09.2013 pe <http://www.stemcellschool.org/glossary.html>
67. Stemcell technologies. Expansion of hematopoietic stem cells and hematopoietic progenitors. Accesat 02.2014 pe <http://www.stemcell.com/en/Products/Popular-Product-Lines/StemSpan.aspx>
68. Stocum D.L. Chapter 15 Developmental mechanisms of regeneration (pp 155-178). *Handbook of Stem Cells.* 2013.
69. Strömberg A, Jansson M, Fischer H, et al. Bone marrow derived cells in adult skeletal muscle tissue in humans. *Skelet Muscle.* 2013 May 16;3(1):12.
70. Tajbakhsh S. Stem cell: what's in a name? *Nature Reports Stem Cells.* Published online: 25 June 2009. Accesat 09.2013 pe <http://www.nature.com/stemcells/2009/0906/090625/full/stemcells.2009.90.html>

71. Takagaki Y., Yamagishi H., Matsuoka R. Factors involved in signal transduction during vertebrate myogenesis. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2012(96):187-272.
72. Talkop UA, Kahre T, Napa A, et al. A descriptive epidemiological study of Duchenne muscular dystrophy in childhood in Estonia. *Eur J Paediatr Neurol*. 2003;7(5):221-6.
73. Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant*. 2007;16(6):563-77.
74. Universal Protein Resource (UniProt). Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C. Accesat 10.2013 pe <http://www.uniprot.org/uniprot/P08575>
75. Vallese D., Yada E., Butler-Browne G., et al. Chapter 77 - Cell-Based Therapies in Skeletal Muscle Disease, (pp 1053-1063). In Hill J. (Ed.) *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, Vol.2. Elsevier, 2012.
76. van Essen AJ1, Busch HF, te Meerman GJ, et al. Birth and population prevalence of Duchenne muscular dystrophy in The Netherlands. *Hum Genet*. 1992 Jan;88(3):258-66.
77. Vlăduțeanu A.M. Actualități în transplantul cu celulele stem din sângele de cordon ombilical – perspective, avantaje, opțiuni. *Practica Medicala* 2008 (3):8-16.
78. Voisin V, de la Porte S. Therapeutic Strategies for Duchenne and Becker Dystrophies. *Int Rev Cytol*. 2004;240:1-30.
79. Wei S., Huard J. Chapter 72 Tissue Therapy: Implications of Regenerative Medicine for Skeletal Muscle (pp 1232-1247). In Atala A., Lanza R. (Eds.) *Principles of Regenerative Medicine*, Elsevier, 2011.
80. Weiner LP. Definitions and criteria for stem cells. *Methods Mol Biol*. 2008;438:3-8.

81. Yokota T., Oritani K., Butz S., et al. Markers for hematopoietic stem cells: histories and recent achievements. *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*. Pelayo R (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-hematopoietic-stem-cell-research/endothelial-cell-selectiveadhesion-molecule-esam-a-novel-hsc-marker>
82. Zhong JF, Zhan Y, Anderson WF, et al. Murine hematopoietic stem cell distribution and proliferation in ablated and nonablated bone marrow transplantation. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3521-6.
83. Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc*. 2010 Mar;5(3):550-60.

Declarație

Prin prezenta declar că Lucrarea de diplomă cu titlul ”Rolul celulelor stem hematopoetice în stimularea regenerării țesuturilor musculare” este scrisă de mine și nu a mai fost prezentată niciodată la o altă facultate sau instituție de învățământ superior din țară sau străinătate.

De asemenea, că toate sursele utilizate, inclusive cele de pe Internet, sunt indicate în lucrare, cu respectarea regulilor de evitare a plagiatului:

- toate fragmentele de text reproduse exact, chiar și în traducere proprie din altă limbă, sunt scrise între ghilimele și dețin referința precisă a sursei;
- reformularea în cuvinte proprii a textelor scrise de către alți autori deține referința precisă;
- rezumarea ideilor altor autori deține referința precisă la textul original.

Data

Absolvent,
Repede Ana