

TRANSLACIJSKA ISTRAŽIVANJA U DIJAGNOSTICI I TERAPIJI NASLJEDNIH MIŠIĆNIH BOLESTI I NACIONALNI REGISTAR NEUROMUSKULARNIH BOLESTI

NINA BARIŠIĆ¹, IVAN LEHMAN¹, PETRA GRĐAN²

Translacijska istraživanja omogućavaju prijenos (translaciju) laboratorijskih pretkliničkih istraživanja u njihovu kliničku primjenu, pri čemu utjecaj rezultata kliničke primjene omogućuje i usmjerava daljnja bazična istraživanja. U liječenju nasljednih mišićnih bolesti primjenjuju se farmakološka sredstva, dok su genska i terapija matičnim stanicama još u tijeku kliničkih, odnosno pretkliničkih ispitivanja. Standardizacija modela za ispitivanje pojedinih terapijskih pristupa, definiranje bolesti te određivanje kriterija za procjenu terapijskih protokola i uspjeha liječenja racionalna su osnova za kliničku primjenu terapije. Realizacija europskih projekata: Translational Research in Europe – Assessment and Treatment of Neuromuscular Disorders (NMD-TREAT) i CARE-NMD ima vrlo bitnu ulogu u stvaranju ujednačenih pristupa dijagnostičkim i terapijskim postupcima u oboljelih od neuromuskularnih bolesti. Pri tome nacionalni registri imaju značajnu ulogu u procjeni učestalosti, zatim u probiru bolesnika i planiranju kliničkih ispitivanja različitih terapijskih pristupa, uključujući i gensku terapiju, čime pridonose i povećanju kakvoće života te zbrinjavanju i praćenju bolesnika s neuromuskularnim bolestima.

Deskriptori: MIŠIĆNA DISTROFIJA, DUCHENNEOVA I BECKEROVA MIŠIĆNA DISTROFIJA (DMD/BMD); MIŠIĆNE BOLESTI; TRANSLACIJSKA ISTRAŽIVANJA; OLIGONUKLEOTIDI; GENSKA TERAPIJA

Translacijska medicina ili translacijska istraživanja omogućavaju prijenos (translaciju) bazičnih znanstvenih otkrića iz laboratorija u kliničke metode liječenja bolesnika. Takav je pristup u razumijevanju i liječenju bolesti dvosmjernan, pri čemu znanstvenici svojim bazičnim otkrićima stvaraju nove mogućnosti u liječenju, koje dovode do boljeg razumijevanja prirode i progresije bolesti te potiču nova bazična istraživanja (1). Translacijska medicina je integracija inovativnih terapijskih pristupa, identifikacija, testiranje i procjena bioloških biljega, zatim metodologija i planiranje istraživanja

radi pronalaženja terapijskih ciljeva i povećanja uspješnosti II. i III. faze kliničkih ispitivanja. Translacijska medicina omogućava suradnju i multidisciplinski timski rad između različitih ustanova. Ciljevi translacijskih istraživanja omogućavaju utvrđivanje preporuka za razvoj lijekova, eksperimentalna i klinička istraživanja. Korelacija genotipa i fenotipa omogućava istraživanje njihove povezanosti na temelju kojih se, uz pomoć različite tehnologije (mikropostroj) mogu razvijati dijagnostičke i terapijske strategije (2).

Genetika i molekularno-genetička istraživanja omogućavaju razumijevanje patogeneze, postavljanje točne dijagnoze i provođenje etiološke terapije. Životinjski eksperimentalni modeli omogućavaju pretklinička istraživanja na molekularnoj i staničnoj razini i naknadnu primjenu u praksi (3). Velika je većina terapijskih pristupa testirana na životinjskim modelima pojedinih mišićnih distrofija, a neki i u kliničkim ispitivanjima, odnosno u fazi registracije. Polazište istraživanja terapijskih pristupa prvenstveno je Projekt humanog genoma radi otkrivanja genskih

mutacija, no još i sad postoji određeni broj mišićnih bolesti za koje nije poznat uzrok, odnosno genski defekt.

Mutacije gena, strukturnih proteina ili enzima (poput glikoziltransferaze) najčešći su uzrok mišićnih distrofija. Danas je poznato oko 30 gena čije mutacije uzrokuju mišićnu distrofiju (4). Mutacije gena patohistološki uzrokuju degeneraciju i nekrozu mišićnog vlakna, koja vodi klinički do ograničene mogućnosti kretanja i nerijetko do preuranjenog smrtnog ishoda.

Najčešća je mutacija gena za distrofin (*gen DMD*) (učestalost 1:3500 muške novorođenčadi), čiji je produkt disfunkcionalni protein. Do 70% mutacija su pojedinačne ili multiegzonske s najvećom učestalošću u rasponu od egzona 45-55 (*rod deletion*). Velike delecije unutar okvira najčešće su povezane s blagim oblikom bolesti ili mogu biti asimptomatske do 70 godina života. Distrofin je subsarkolemski protein. Bez distrofina mišićno je vlakno vrlo osjetljivo na utjecaj iz okoline, a zbog oštećene funkcije satelitskih stanica onemogućena je njegova regene-

¹ Klinika za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinički bolnički centar Zagreb, Referentni centar Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH za pedijatrijske neuromuskularne bolesti

² KBC Zagreb

³ Katedra za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Nina Barišić, Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, e-mail: barisic.nina@gmail.com

rativna sposobnost. Distrofin je u interakciji s velikim brojem proteina preko C-terminalne domene i stvara distrofinski udruženi kompleks koji (uz distrofin) obuhvaća distroglikane, sarkoglikane, distrobrevin, sintrofine, neuronska sintetaza dušičnog oksida, receptor čimbenika rasta (GRb2), kaveolin 3 i sarkospan. Složeni distrofinski kompleks omogućava mehaničku sponu između intracelularnog citoskeleta i ekstracelularnog matriksa, osiguravajući pritom strukturni i funkcionalni integritet skeletnih mišića nakon kontrakcije. Odsutnost distrofina kompromitira integritet kompleksa, uzrokujući vulnerabilnost mišićnih vlakana i njihovu degeneraciju poslije kontrakcije, pri čemu dolazi do ulaska kalcija, nekroze i apoptoze. Postupci koji bi onemogućili razaranje mišićnog vlakna su racionalna terapijska intervencija.

Terapija obuhvaća farmakološku (kortikosteroide, inhibitore proteaza, regulaciju kalcija, inhibitore miostatina, supresiju stop kodona-PTC 124 (ataluren) i aminoglikozide (gentamicin), zatim protuupalne lijekove i beta blokatore, gensku (genski transfer, mikro ili mini distrofin, antisense oligonukleotidi, gensku modifikaciju urotrofinom) i terapiju matičnim (satelitskim) stanicama.

FARMAKOLOŠKA I GENSKA TERAPIJA

Protuupalni lijekovi su značajni u liječenju DMD-a, sprječavajući upalnu infiltraciju. Manipulacija protuupalnim steroidima ima povoljan učinak (prednison i deflazakort), ali imaju i značajne nuspojave. Upalni putovi mogu biti selektivno ciljani radi terapijske intervencije, npr. pomoću NF kapa B. TNF alfa, odnosno proinflamatorni gen TNF alfa inducira NF kapa B te je posebno zanimljiv terapijski cilj. Blokada se može obavljati s anti TNF alfa antitijelima, pri čemu se zapravo blokira nastajanje nekroze. Cilj djelovanja steroida je vjerojatno NF kapa B i dovodi do supresije citokina i adhezijskih molekula. NF kapa B aktivira transkripciju stvaranjem kompleksa dimera i aktivacijom IKK NEMO regulatornih podjedinica. Kombinacija djelovanja protuupalnih lijekova (npr. derivat fluribufena HCT 1026) i aktivacije NO sudjeluje u aktivaciji folistatina i dovodi do regeneracije mišićnih vlakana. NO signalizacija je izrazito oštećena u distrofičnom mišiću. NO s nesteroidnim protuupalnim učinkom poboljšava morfološki, biokemijski i funk-

cionalno stanje u progresivnim i pojasnim mišićnim distrofijama.

Steroidi su se pokazali djelotvornim u produljenju razdoblja pokretljivosti i usporjenja razvoja skolioze. Prednison u dozi 0,75 mg/kg na dan pokazao se najdjelotvornijim. Nije bilo dovoljno studija za usporedbu deflazakorta i prednisona. Poboljšanje se očituje u bržem ustajanju iz čučnja, vremenu u hod u 9 m, vremenu potrebnom za uspon uz 4 stuba te sposobnosti podizanja tereta i forsiranom vitalnom kapacitetu. Steroidi stabiliziraju mišićnu snagu i funkciju od 6 mjeseci do najdulje 2 godine od početka primjene (5). Treba kontrolirati razine kalcija, fosfora, alkalnu fosfatazu, razinu 25-OH vitamina D, magnezija, parathormona, a u urinu kalcij, natrij i kreatinin. Potrebne su redovite kontrole denzitometrijom te RTG kralježnice u slučaju bolova. Primjena vitamina D treba se provoditi i.v. bifosfonatom u slučaju frakture kralješaka, a primjena oralnog oblika je kontroverzna. Spirometriju valja kontrolirati svakih 6 mjeseci. Bolesnike starije od 2 godine treba cijepiti pneumokoknim cjepivom, a starije od 6 mjeseci protiv gripe. Oba cjepiva nisu živa i mogu se primijeniti i tijekom liječenja steroidima. Antibiotike treba uvijek primijeniti u slučaju infekcija respiratornih putova. Manualne ili mehanički potpomognute metode za iskašljavanje primjenjuju se u tijeku infekcija. Noćna i dnevna ventilacija primjenjuju se prema odgovarajućim kriterijima kao i traheotomija. Gastroenterolozi i dijetetičari su značajni u rješavanju problema opstipacije, intestinalne dilatacije, ileusa i usporjenog pražnjenja želuca te debljine ili neishranjenosti. U tijeku pripreme za opću narkozu potrebno je uvijek imati na umu mogućnost razvoja maligne hipertermije pa valja izbjegavati depolarizirajuće anestetike (suksametonij), a prije anestezije potreban je pregled UZV srca.

Terapija mišićnih distrofija ovisna je o specifičnim mutacijama, temelji se na činjenici da protusmjerni (*antisense*) oligonukleotidi mijenjaju RNA procesiranje ubacivanjem u okvire za transkripciju. Na tom načelu primjenjuje se *exon skipping* (preskakanje egzona) 51 u najviše 13% DMD bolesnika (6, 7). Isti model primijenjen je radi liječenja miotonije i spinalne mišićne atrofije. Točkaste mutacije pojavljuju se i uzrokuju DMD u 15% bolesnika. Besmislene (*nonsense*) mutacije čine 5-13% mutacija koje uzrokuju DMD, rezultirajući u preuranjenom stop kodonu, čija je posljedica nefunkcionalni protein.

PTC (*premature terminated codon*) 124 (Ataluren-ahiral, oksadiazol vezan za fluorobenzenski i benzoički prsten) prolazi kroz preuranjeni stop kodon (i za cističnu fibrozu i za DMD). PTC 124 suprimira besmisleni terminaciju kodona kao i gentamicin. Ispituje se i u kliničkim ispitivanjima II.b. Primjena PTC 124 inducira do 60% funkcionalnog distrofina. Gentamicin, koji ima sličan učinak, također se primjenjivao i u bolesnika s DMD-om (PTC za egzon 23), ali se zbog toksičnosti više ne primjenjuje. Nakon egzona 51, po učestalosti slijede egzoni 53 i egzon 45 (u oko 15%), zatim bolesnici s duplikacijom ili multiplim delecijama više egzona.

Morfolino oligomer (fosforidamidat morfolino oligomer-PMO) AVI 4658 preskače egzon 51, podnose ga dobro eksperimentalne životinje u svim dozama, kao i ljudi u dozi od 2 mg/kg prema rezultatima kliničkih ispitivanja u V. Britaniji (AVI Biopharma) u fazi I.b/II. (7, 8). U eksperimentalnim modelima osposobljava se 98% skeletne muskulature, a u manjoj mjeri srčanih vlakana. Nanopolimeri i nanosfere rabe se za primjenu AON-a (-2-O-metil) oligonukleotida. Morfolino AON (*antisense* oligonukleotid) za egzon 51 primijenjen je i.m. u 7-ero djece u dobi od 10-17 godina. Biopsija mišića nakon 3 tjedna pokazuje dovoljnu ekspresiju distrofina. PMO morfolino primijenjen i.v. u djece, u dobi od 5-15 godina do maksimalno 900 mg. Nije bilo teških nuspojava, osim u jednog bolesnika s kardiomiopatijom koji je imao pogoršanje kardijalne funkcije i kontraktilnosti, ali se smatra da je riječ o osnovnoj bolesti. Na nisku dozu AVI PMO ne dolazi do preskakanja egzona, registrirana je tolerancija do i.v. 20 mg/kg. U Nizozemskoj u istraživanjima se primjenjuje antisense oligo PRO 051 (prosensa) u fazi I./II.a i.m. ili s.c. u dozi od 0,8 mg. Biopsija mišića učinjena nakon 28 dana pokazala je obnovljen distrofin u 64-97% mišićnih vlakna u svakog bolesnika (6). Ekspresija distrofina je ovisna o dozi, a učinak se postiže nakon 12 tjedana.

Problemi s genskom terapijom proizlaze iz činjenice da je gen za distrofin najveći gen za manipulacije, ima 4 domene. Mini distrofin (plazmid) primjenjuje se pomoću virusnog vektora AAV (adeno-associated virus, DNA virus iz obitelji parvovirusa), čime se omogućuje dobra ekspresija distrofina. Rekombinantni adeno-associated virus (rAAV) ima nekoliko serotipova koji pokazuju tropi-

zam prema mišićnom tkivu. rAAV 1 i 2 primjenjuju se lokalno, odnosno izravno u mišić, dok se rAAV 6, 8 i 9 koristi za sustavnu primjenu (7). Genski transfer prvi put je pokušao 2006. godine. Neželjen je učinak aktivacija imunološkog sustava u bolesnika. Tendencija istraživanja je smanjenje količine virusa koji se primjenjuje kao prenositelj gena. Problem stvaraju reverzna vlakna, pri čemu se (*Eli spot*) identificira T stanična imunogenost. Imunogeni epitop secernira INF-gama. Što se tiče samog virusa nikad se u stanicu domaćina nije uklopila jednostruka DNA AAV virusa.

Istraživanja se provode i s matičnim stanicama, odnosno mezangioblastima, CD 133+ stanicama iz krvi i mišića (primjerice i kao vektori za gensku terapiju) i satelitskim stanicama, no njihova sposobnost repopulacije mišićnih stanica vrlo je ograničena (9). Mioblasti nisu doveli do željenog učinka pomoću i.m. injekcija, brzo umiru i ne migriraju više od 0,5 mm od mjesta injekcije (10). Embriionalne stanice imaju različitu sposobnost diferencijacije. Miogeneza je regulirana složenim signalnim putovima podrijetlom iz mezoderma. Stanice u mišiću i srcu posjeduju određenu rezervu regeneracije tijekom cijelog života. Mezenhimne matične stanice sposobne su za diferencijaciju. Podrijetlo može biti i koštana srž. Nije jasno jesu li satelitske stanice samo stupnjevi razvoja zajedničke progenitorne stanice do određene populacije stanica. Miogene stanice mogu se dobiti iz populacije stanica krvnih žila, odnosno iz mezangioblasta i pericita, koje mogu nadoknaditi oboljele mišićne nakon transplantacije i koje mogu biti optimalna platforma za gensku terapiju. Najviše uspjeha u terapiji neuromuskularnih bolesti ima kombinacija više pristupa, pri čemu se najviše upotrebljava metoda tzv. „autolognog transfera“, u kojoj se stanice bolesnika genetički „ispravljaju“ *in vitro*, primjenjujući lentiviralni vektor, te se potom reimplantiraju i dopuštaju reproizvodnju funkcionalnog proteina distrofina (9).

Faktor rasta, sličan inzulinu, glavni je regulator razvoja mišića i postnatalnog rasta IGF-a koji može modulirati populaciju upalnih stanica i citokina u tijeku regeneracije, što je spona imunomodulatornih učinaka i regeneracije te smanjenja fibroze. Vjerojatno može djelovati sinergistički s miostatinom. Najveći nedostatak pojedinih modulatora za različite signalne putove je nedostatak selektivnosti. Na eks-

perimentalnom modelu DMD (mdx) dokazan je povoljan učinak IGF-a u smislu povećanja snage i smanjenja fibroze i nekroze. Povećana razina IGF-a i miostatin imaju isti učinak. Nedostatak svih tih terapijskih pristupa nedostatak je selektivnosti djelovanja. Naime, blokada putova intracelularne signalizacije djelovat će na mnogobrojne putove i uzrokovat će mnoga neželjena djelovanja. Možda će se uspjeti djelovanjem na razini kromatina. Regeneracija mišića rezultira iz proliferacije mišićnih vlakana koji se diferenciraju u zrele miofibrile. Reprogramiranje diferencijacije povezano je sa sekvencijalnom aktivacijom gena koji sudjeluju u proliferaciji, migraciji i diferencijaciji. Stimulacija regeneracije značajna je radi genske terapije. Regeneracija nastupa zahvaljujući progenitornim stanicama. Satelitske stanice su prototip progenitornih stanica. Njihov je broj konstantan u ciklusima reparacije i regeneracije i mogu se obnovljati.

Miostatin ili GDF 8 član je TGF beta transformirajuće superobitelji. Aktivira se pomoću propeptida BMP (*bone morphogenetic protein*). Geni koji moduliraju djelovanje miostatina nisu poznati. Djeluje kao negativni regulator rasta. Blok miostatina povećava veličinu mišićnog vlakna i smanjuje simptome bolesti. Inhibicija signalnog puta miostatina, koji uzrokuje hipertrofiju i rast mišića, obavlja se u multicentričnim studijama monoklonskim antitijelima u modelima za DMD i sarkoglikanopatije. Učinak miostatina je povoljan u ranoj fazi bolesti, osim u delta sarkoglikanskom modelu. Blokada miostatina dovodi do blokade proliferacije i diferencijacije mišićnih stanica te smanjenja sklonosti degeneracije velikih vlakana. TGF beta i mreža regulatornih čimbenika (bmp 4, gremlin i aktivin) utječu na proliferaciju i diferencijaciju stanica. Stimulacija alternativnih proteina, poput urotrofina, također može rezultirati u regresiji distrofičnog procesa u pretranskripcijskoj i postranskripcijskoj fazi. Istraživanja regulacije proteina pomoću urotrofina su u prekliničkoj fazi. Urotrofin je izražen na membrani mišićnog vlakna u bolesnika koji nemaju distrofin. Strukturno i funkcionalno je sličan distrofinu. Na eksperimentalnom modelu u 80% se poboljša snaga i otpornost na istezanje.

Stabilizaciju membrane može stimulirati i integrin alfa 7 koji se veže za laminin, stabilizirajući povezanost sarkoleme i

ekstracelularnog matriksa. Alternativni protein nije imunogen, što je prednost u odnosu na unošenje proteina koji je imunogen.

Modulacija patogenetskih putova koji vode distrofiji jedna je od terapijskih mogućnosti. Utok kalcija uz defekte sarkoleme uzrokom je distrofičnog procesa. Inhibicija ciklofilina eksperimentalno djeluje na protekciju mitohondrija i blokadu apoptoze mišićnog vlakna u deficijenciji kolagena VI. Modulirajuća terapija obuhvaća inhibiciju apoptoze mitohondrija pomoću ciklofilina te inhibiciju miostatina monoklonskim antitijelima.

POJASNE MIŠIĆNE DISTROFIJE

Eksperimentalna istraživanja obuhvaćaju terapiju pojasnih mišićnih distrofija koje se nasljeđuju autosomno-recesivno (LGMD 2). U liječenju su ispitivani mezangioblasti za alfa sarkoglikanopatiju, inhibicija miostatina protutijelima MYO029, dok su mogućnosti primjene protusmjernih oligonukleotida ograničene. Mutacije su najčešće besmislene te stoga nije moguće primjenjivati isti pristup kao u liječenju DMD-a. Mioglobulinurija i zahvaćanje srčanog mišića degenerativnim procesom te razvoj kardiomiopatije obilježja su osim metaboličkih miopatija, progresivnih mišićnih distrofija (DMD/BMD) i nekih recesivno nasljednih oblika LGMD (gama-sarkoglikanopatija) (11). Poremećaji disanja u svezi sa skoliozom mogu se otkriti pulsnom oksimetrijom i polisomnografijom te procijeniti potrebe neinvazivne noćne ventilacije. Kardiološki poremećaji mogu se liječiti beta blokatorima i inhibitorima konvertaze angiotenzina (ACE). Kalpainopatija (LGMD 2A) uzrokovana je mutacijom gena za kalpain 3, očituje se ranim početkom (od 2. godine) dojenačke dobi ili kasnije hodom na prstima te otežanim hodom uz stube i kontrakturama kao i *skapulae alatae* (12). Nemogućnost samostalnog hoda nastupa oko 11.-28. godine, no životni vijek nije skraćen i najčešće nema kardioloških komplikacija. Modeli za ispitivanje terapije obuhvaćaju nadomještanje kalpaina 3 s AAV-om. Sarkoglikanopatije su slične distrofinopatijama, jer su dio istog kompleksa kao i distrofin. Najčešće se očituju u djetinjstvu. Srce je zahvaćeno degenerativnim procesom, najčešće u beta i delta, ali isto i u gama i alfa sarkoglikanopatijama. No iako je za posljednjih 40 godina proizvedeno mno-

go modela eksperimentalnih životinja s dilatativnom kardiomiopatijom za istraživanje terapije sarkoglikanopatija, niti jedna od tih terapija nije dosad primijenjena u bolesnika. Primijenjena je inhibicija s proteazom ili manozidazom, čime je na modelu smanjena degradacija sarkoglikanskog kompleksa.

Najčešća pojasna mišićna distrofija iz skupine autosomno-recesivno nasljednih oblika LGMD 2I uzrokom je sekundarne redukcije alfa distroglikana, što je zajednička pojava s kongenitalnim mišićnim distrofijama. LGMD 2I ima vrlo varijabilnu kliničku sliku, od slične DMD-a do vrlo blagih oblika, iako može i u blagom obliku biti komplicirana kardiomiopatijom uz mijalgiju i mioglobinuriju. Rbdomioliza je također zabilježena uz anesteziološke zahvate. Respiratorna insuficijencija očituje se smanjenjem vitalnog kapaciteta, noćnom hipoventilacijom zbog slabosti dijafragme. Respiratorna slabost može se razviti dok je bolesnik još pokretan, što je različito od DMD-a/BMD-a. U LGMD 2I terapijski se pokazala uspješna primjena steroida kao i umjerena vježba (3).

KONGENITALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE

Distroglikanopatije obuhvaćaju kongenitalne mišićne distrofije i bolesti su uzrokovane poremećajem glikozilacije alfa distroglikana. Mutacije 6 gena (protein-O-manozil transferaza 1 i 2: POMT 1 i POMT 2, protein-O-manozid beta 1,2 N-acetilglukozaminil transferaza 1: *POM-GnT1*, fukutin, fukutinu srodni protein: *FKRP* i N-acetilglukozaminil transferaza-like protein: *LARGE*) uzrokom su distroglikanopatija. *FKRP* vezan je za Golgijev aparat i endoplazmatski retikulum, dok je *LARGE* vezan za Golgijev aparat i nalazi se u srcu, mišićima, mozgu. Alelne mutacije tih gena rezultiraju u složenim poremećajima udruženim s malformacijama središnjeg živčanog sustava (Walker-Warburgov sindrom, mišić-okomozak sindrom, Fukuyamina mišićna distrofija, kongenitalna mišićna distrofija 1D (8). Distroglikan, produkt gena *DAG1*, komponenta je distrofin-glikoproteinskog kompleksa koji se nalazi na sarkolemi skeletnih mišića i u mozgu, ali vjerojatno i šire. Funkcija nije u potpunosti poznata. Važan je za organizaciju citoskeleta. Veže se s lamininom, perlekanom i neureksinom i stvara vezu ekstracelularnog matriksa i aktina. Pokazalo se da je povećana ekspresija *LARGE*-a dovela do smanjenja

distrofičnog procesa i povećala sintezu glikanom obogaćenog alfa distroglikana, odnosno hiperglikozilaciju ADG-u (alfa-distroglikan). Modeli s primjenom transfekcije *LARGE*-a pomoću adenovirusnog vektora AAV pokazuju hiperglikozilaciju ADG-u s prepoznavanjem mjesta vezivanja laminina (IIIH6 epitop). Hiperglikozilacija jača sarkolemu u eksperimentalnih životinja prema rezultatima navedenog istraživanja. Značajno je da stimulacija produkcije (*upregulation*) autolognog proteina nije imunogena, ali je teško izvediva u ljudskom organizmu. Pitanje je u kojoj mjeri učinak hiperglikozilacije može zahvatiti i mozak. U eksperimentalnim modelima hiperglikozilacija ne utječe na lizencefaliju, ali ipak neki su rezultati uočljivi i na eksperimentalnim modelima u smislu poboljšanja sposobnosti učenja i funkciji hipokampusa (8). Problem genske terapije je odsutnost valjanih biomarkera koji upućuju na terapijski cilj u mišićnim distrofijama kao i nedostatak nadzora nad terapijskim odgovorom.

Bethlemova i Ulrichova miopatija obuhvaćaju nekoliko kliničkih oblika. Bethlemova miopatija (obično blaži oblik) obilježena je kontrakturama prstiju te proksimalnom slabošću, dok je u Ulrichovoj miopatiji moguć razvoj teške respiratorne insuficijencije u prvom ili drugom desetljeću (13). Dijagnoza se postavlja na temelju analize proteina *COL6* u fibroblastima te DNA-analizom gena *COL6* (A1-A3). Terapija ciklosporinom A-blokira disfunkciju mitohondrija i apoptozu u Ulrichovoj distrofiji (14). Patobiokemijski proces se temelji na propusnim tranzicijskim porama koje se otvaraju uz utok kalcija i na oksidativnom stresu, što dovodi do edema i rupture njihove membrane. Nakon biopsije terapija u trajanju od 1 mj. ciklosporinom A (CyA), u dvije doze od 5 mg/kg, inhibira otvaranje pora. U bioptu mišića nakon provedene terapije nije bilo više znakova apoptoze.

KONGENITALNE MIOPATIJE

Poznavanje kongenitalnih miopatija i njihove etiologije je ograničeno. Često su različite kongenitalne miopatije udružene s istim genom, što otežava i klasifikaciju i terapiju. Gen *ACTA1* udružen je s fenotipom nemalinske miopatije sa štipićima, miopatije s agregacijom aktina i kongenitalne disproporcije vlakana. Njegov je produkt skeletalni alfa aktin, čija mutacija može uzrokovati i različitu težinu bolesti.

Poznavanje gena omogućava i razvoj animalnih modela i kasnije terapije. Nedavne studije na eksperimentalnom modelu (zebrafish) korisne su za proučavanje mutacije gena *RYR1* koja uzrokuje bolest centralnih srži, radi primjene oligonukleotidne terapije (15).

MIOTONE DISTROFIJE

Miotona distrofija je primjer RNA posredovane bolesti. Miotona distrofija DM1 uzrokovana mutacijom *DMPK* gena na kromosomu 19q, rezultat je trinukleotidne ekspanzije CTG-a. DM 2 uzrokovan je nestabilnom ekspanzijom CCTG-a u genu *ZNF9*. Mutirana RNA nalazi se u jezgri, stvarajući ribonuklearne inkluzije. Posljedica RNA toksičnosti je disfunkcija veznih proteina koji dovode do abnormalne regulacije, odnosno poremećaji vezivanja (*spliceopathy*). Navedene promjene uzrokom su miotonije, odnosno odgođene relaksacije zbog repetitivnih akcijskih potencijala i rezistencije na inzulin. Promjene u bijeloj tvari mozga nastaju u tijeku razvoja distrofičnog procesa, ali su vjerojatno u korelaciji s duljinom ekspanzije. Na eksperimentalnom modelu adenovirusom ubacuje se *MBL1* protein i smanjuje se miotonija supresijom proteina *CUGBP* (*downregulation*) koji uzrokuje DM2. Jedan od načina je neutralizacija ili eliminacija mutirane RNA. Smanjenje mutirane RNA u mišiću, pomoću *antisense* RNA smanjuje se mutirana *DMPK* razina RNA, dovodi do smanjenja miotonije i mišićne slabosti (16). U simptomskom liječenju primjenjuje se meksiletin koji djeluje na Na kanale. Snažni anabolni učinak može spriječiti atrofiju (DHEA) te IGF (s.c.) i tako može dovesti do poboljšanja mišićne snage. *Antisense* oligonukleotidi (nasuprotni oligonukleotidi) formirani su da preskoče abnormalnost, uključujući egzon 7 kloridnih kanala gena *CLC1*, što se potvrdilo na mišjem modelu kongenitalne miotonije. U liječenju miotonija se, osim meksiletina, primjenjuju difetoin, karbamazepin, propranolol, acetazolamid i dantrolen. Miotonija se pogoršava tijekom anestezije depolarizirajućim agensima (suksametnij), zatim primjenom adrenalina i beta-adrenergičnih agonista te kolhicina, tako da njihovu upotrebu treba izbjegavati.

METABOLIČKE MIOPATIJE

Metaboličke miopatije su skupina bolesti koju karakterizira oštećenje pro-

dukcije energije u skeletnoj miškolaturi. Uključuju poremećaje metabolizma lipida, glikogena te oksidativni metabolizam. Očituju se multisistemskim zahvaćanjem kao brzo progresivne, odnosno fatalne bolesti, ili sporo progredirajuće miopatije ili epizodne disfunkcije mišića s mioglobinurijom (McArdle ili CPT2). Nedostatak karnitin palmitoil transferaze 2 (CPT2), primjer za terapiju hipolipemikom bezafibratom, mogućnost i perspektiva su za liječenje drugih poremećaja oksidacije masnih kiselina u okviru npr. mitohondrijskih bolesti. Supstitucijska terapija primjenjuje se u liječenju glikogenoze tip II. (Pompeove bolesti) te tip V. ili McArdleove bolesti (17). Glikogenoza tip II. uzrokovana je nedostatkom alfa glukozidaze ili kisele maltaze, koji dovodi do nagomilavanja glikogena u lizosomima i očituje se kao infantilni, juvenilni i adultni oblik. Gen za kiselu maltazu nalazi se na kromosomu 17q25, poznato je 197 patogenih i 67 nepatogenih mutacija. Infantilni oblik očituje se kardiomiopatijom i hipotonijom, koja može uzrokovati smrtni ishod do dobi od 12 mjeseci, dok se juvenilni i adultni oblici očituju kao sporo progresivna pojasna mišićna distrofija (GSDII) ili polimiozitis s ranim zahvaćanjem ošita i razvojem respiratorne insuficijencije. Fenotip je teško predvidjeti na temelju genotipa. Liječenje se provodi rekombinantnom alfa glukozidazom dobivenom iz zečijeg mlijeka ili ovarijskih stanica kineskog hrčka (Myozyme, Genzyme). Egzogeni enzim vezuje se za mazoza 6 fosfatni receptor. U dozi od 20–40 mg/kg dolazi do značajne redukcije veličine srca i oporavka njegove funkcije u dojenčadi u dobi od 2,5-8 mj. te do sprječavanja razvoja respiratorne insuficijencije, koja se obično razvija u dobi od 24–36 mjeseci. Ispitivanja u odraslih također su bila uspješna u dobi od 21-69 godina uz pad CK i poboljšanje testa hoda od 6 minuta. CRIM status (unakrsno reaktivni imuno-materijal) značajan je za uspjeh terapija. CRIM negativni bolesnici imaju lošu prognozu zbog visokog titra antitijela na humanu alfa glukozidazu. Rana primjena terapije i novorođenački skrining smanjuju razinu i sposobnost stvaranja antitijela. Nuspojave su blage i uključuju osip i smanjenje saturacije kisikom. Terapija smanjuje smrtnost za 79-92% kao i ovisnost o mehaničkoj ventilaciji, poboljšava srčanu i respiratornu funkciju. Biopsija mišića pokazuje smanjenje akumulacije glikogena u mišiću. Problemi terapije povezani su sa činjenici-

com da su mišićna vlakna udaljena od krvnog tijeka, za razliku od ostalih lizosomnih bolesti poput Gaucherove ili Fabryjeve, gdje se enzimi vežu za stanice endotela, mišići imaju manje M6P receptora, zato su potrebne velike količine enzima. Konjugacija enzima s oligosaharidom koji sadrži M6P povećava afinitet enzima za receptor i smanjuje količinu glikogena u mišiću. Male molekule (šaperon) mogu se kombinirati s enzimom (18, 19).

McArdleova bolest ili glikogenoza tipa V. očituje se mioglobinurijom i rekurentnom rabdomiolizom te mijalgijama. Rijetko dolazi do razvoja slabosti mišića uzrokovane smanjenjem proizvodnje acetil koenzima A i pogoršanjem u ciklusu trikarboksilnih kiselina. Nakon odmora bolesnici ponovo mogu vježbati (*second wind*) zbog pomaka u oksidaciji masnih kiselina. Infuzija sukroze i.v. može poboljšati toleranciju napora, ketogena dijeta može povećati desetorostruko toleranciju napora kao i hrana bogata ugljikohidratima u odnosu na hranu bogatu proteinima te oralni kreatin. Umjerena aerobna vježba po 30 minuta svaki dan 4 puta na tjedan povećava radni kapacitet, udarni volumen srca, preuzimanje kisika te razinu mitohondrijske aktivnosti. Utjecaj ACE gena povećava težinu bolesti i netoleranciju napora, ali primjena ACE inhibitora nije djelotvorna kao niti vitamin B6. Ispitivanje s gentamicinom u smislu pročitavanja (*readthrough*) u *PYGM* genu nije bilo uspješno. Nedostatak CPT 2 je poremećaj oksidacije masnih kiselina u mitohondriju. Povezan je s mioglobinurijom, ukočenošću mišića, osobito nakon produžene vježbe. Primjena većih količina ugljikohidrata može povećati toleranciju napora.

PROJEKT TREAT - NMD I REGISTRI BOLESNIKA S NEUROMUSKULARNIM BOLESTIMA

Standardizacija modela ponajprije mdx (mišji model Duchenneove progresivne mišićne distrofije) omogućena temeljem međunarodne suradnje u projektu TREAT-NMD (*Translational Research in Europe – Assessment and Treatment of Neuromuscular Disorders*) značajna je radi mogućnosti usporedbe i interpretacije rezultata.

Program TREAT - NMD bazira se na činjenici da su terapija i zbrinjavanje osoba s rijetkim bolestima vrlo različiti po dostupnosti i kakvoći (19, 20). Istraživanje

terapijskih mogućnosti osniva se na procjeni mogućnosti primjene DNA, RNA i proteina te stanica u liječenju teških potencijalno smrtonosnih mišićnih distrofija (20). Produljenje života u prosjeku iznosi 10-ak godina, a u nekim zemljama Europe bolesnici s DMD-om mogu doživjeti 40 godina, npr. u Skandinaviji, dok u istočnoj Europi prosječno žive do 20 godina.

Program obuhvaća definiciju bolesnika, evaluaciju primjene protokola i evaluaciju uspješnosti programa, ukidanje neravnopravnosti u zbrinjavanju bolesnika, osvješćavanje nejednakosti u zbrinjavanju i naposljetku produljenje života bolesnika s neuromuskularnim bolestima. Program se provodi kroz radionice (nacionalne i internacionalne) za zdravstvene radnike i za roditelje, kao i pristup *on-line* literaturi omogućavajući dostupnost izvrsnosti i utjecaj na kakvoću života bolesnika s neuromuskularnim bolestima (21). Program će se provoditi u referentnim centrima za neuromuskularne bolesti na razini nacionalnih centara sa suradnicima u cijeloj Europi kroz 19 suradnih centara.

CARE NMD – projekt diseminacije i implementacije standarda zbrinjavanja bolesnika s DMD-om obuhvaća partnerske institucije (u Bugarskoj, Engleskoj, Njemačkoj, Poljskoj, Mađarskoj, Češkoj te Danskoj) kao i suradne ustanove u Hrvatskoj, Francuskoj, Srbiji, Makedoniji, Nizozemskoj, Bjelorusiji, Rumunjskoj, Rusiji, Slovačkoj, Švedskoj, Irskoj i Ukrajini. Standardi liječenja bit će evaluirani i poboljšani edukacijskim tečajevima i drugim mjerama, čime će se omogućiti produljenje i bolja kakvoća života (www.care-nmd.eu). Postupci praćenja bolesnika obuhvaćaju produljenje pokretljivosti uključujući ortopedske zahvate te kontrole i praćenje kardiologa, pulmologa, fizijatra te nutricionističke i anesteziološke intervencije.

Prilikom planiranja kliničkih istraživanja vrlo je značajno da se mogu brzo pronaći i kontaktirati bolesnici koji su prikladni prema kriterijima istraživanja. Najbolji i najbrži način su jedinstveni registri bolesnika, koji sadrže sve potrebne podatke o bolesnicima, posebno nalaz molekularno genetičke analize i ključne podatke o kliničkoj slici.

Pojedini nacionalni registri dio su globalnog Europskog registra čime se, uz omogućavanje da svaki bolesnik unutar nacionalnog registra bude uključen u najprikladniju vrstu kliničkog istraživanja,

dobivaju podatci o učestalosti pojedinih neuromuskularnih bolesti na nacionalnoj razini i širom svijeta, podržavaju aktivnosti bitne za unapređenje zbrinjavanja i njege, nadzora i liječenja bolesnika, te se postavljaju standardi njege u različitim zemljama.

Liječnici zaduženi za kakvoću podataka u registru (nacionalni kurator) provode identifikaciju, zatim lokalizaciju te registraciju bolesnika s DMD-om/Spinalnom mišićnom atrofijom (SMA). Za rijetke neuromuskularne bolesti određeni su paneuropski kuratori (pojasne mišićne distrofije, kongenitalne miopatije). Podatci ulaze u globalni registar nakon provedene procjene podataka od strane nacionalnih kuratora. U okviru NMD-TREAT projekta formirani su registri primarno za DMD i SMA (22).

Registarski obrazac uključuje osobne podatke o bolesniku ili zakonskom skrbniku, zatim dijagnozu, nalaz molekularne genetičke analize te bolesnikove motoričke sposobnosti, zatim podatke iz obiteljske anamneze, podatke o plućnoj (spirometrija, invazivna ventilacija) i srčanoj funkciji (21). Svi nominalni podatci (ime i prezime, adresa) pohranjuju se pod određenom šifrom.

Skupljanje podataka za registre provodi se pomoću "bolesnikova izvješća", koje ispunjava sam bolesnik ili njegov zakonski predstavnik i „liječničkog (profesionalnog) izvješća", koje ispunjava liječnik. Jednom pohranjeni podatci, pošto je provjerena njihova točnost, automatski se obnavljaju jedan put na godinu te su strogo zaštićeni putem sigurnosnih internetskih protokola. Farmaceutske kompanije sa zakonski provjerenim interesom u području neuromuskularnih bolesti mogu brzo doći do traženih podataka putem nacionalnih registara. Nacionalne komisije za informatiku daju suglasnost za ulazak podataka u globalni registar. Pri formiranju registara za DMD i SMA može se rabiti gotov software ili model Universal Mutation Database. U slučaju da je riječ o drugim genima značajan podatak za stvaranje baze podataka je slijed komplementarne DNA (cDNA) i pozicija svakog egzona u odnosu na cDNA. Svaki bolesnik može biti uklonjen iz registra u tijeku postupka obnavljanja podataka, na vlastiti zahtjev, odnosno na zahtjev roditelja ili skrbnika. Prije davanja osobnih podataka bitno je da bolesnik dobije sve informacije o registru i o tome kako, gdje i u koju svrhu će se pohranjivati navedeni podatci. Bolesnikovi roditelji ili punoljetni bole-

nik također moraju potpisati informirani pristanak (koji se odnosi na pohranu podataka, sudjelovanje u kliničkom istraživanju, dobivanje novih informacija o bolesti od koje bolesnik boluje, obnavljanju podataka te o javljanju bitnih promjena u kliničkoj slici koje se dogode između razdoblja obnavljanja podataka (22).

ZAKLJUČAK

Translacijska istraživanja omogućavaju prijenos (translaciju) laboratorijskih pretkliničkih istraživanja u njihovu kliničku primjenu, pri čemu utjecaj rezultata kliničke primjene omogućuje i usmjerava daljnja bazična istraživanja. Terapija neuromuskularnih bolesti pokazuje napredak, zahvaljujući poznavanju ljudskog genoma i patogeneze nasljednih bolesti. U liječenju Duchenneove progresivne mišićne distrofije te nekih pojasnih mišićnih distrofija primjenjuju se farmakološka sredstva, dok su genska i terapija matičnim stanicama još i sad u tijeku kliničkih, odnosno pretkliničkih ispitivanja. Genska terapija, posebno terapija oligonukleotidima, ovisna je o tipu mutacija i zasad je ograničena na mali postotak patogenih mutacija. Problem je u nedovoljnom poznavanju selektivnosti pojedinih oblika genske terapije te nedostatku biomarkera koji upućuju na terapijski cilj te služe za praćenje učinaka te terapije, odnosno nadzor nad terapijskim odgovorom. Standardizacija modela za ispitivanje pojedinih terapijskih pristupa, zatim definicije bolesti i kriterija za procjenu terapijskih protokola i uspjeha liječenja, racionalna je osnova za kliničku primjenu terapije. Najznačajniji (i aktualno najrealniji) pomak je ipak realizacija projekata (NMD-TREAT i NMD-CARE) cilj kojih je ujednačen pristup dijagnostičkim i terapijskim postupcima i pomagalima, ponajprije nadzoru nad kardiorespiratornom funkcijom svih bolesnika koji boluju od neuromuskularnih bolesti. Nacionalni registri bolesnika s neuromuskularnim bolestima značajni su za određivanje učestalosti pojedinih neuromuskularnih bolesti, probir bolesnika i planiranje kliničkih ispitivanja različitih terapijskih pristupa, uključujući i gensku terapiju za liječenje mišićnih bolesti, zatim za povećanje kakvoće života te oblikovanje standarda liječenja, zbrinjavanja i praćenja bolesnika.

LITERATURA

1. Lötsch J, Geisslinger G. Bedside-to-bench pharmacology: a complementary concept to translational

- pharmacology. *Clin Pharmacol Ther* 2010;87:647-9.
2. Kotlan B, Stroncek DF, Marincola FM. Turning laboratory findings into therapy: a marathon goal that has to be reached. *Pol Arch Med Wewn* 2009;119:586-94.
3. Straub V, Bushby K. Therapeutic possibilities in the autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies. *Neurotherapeutics* 2008;5:619-26.
4. Costanza L, Moggio M. Muscular dystrophies: histology, immunohistochemistry, molecular genetics and management. *Curr Pharm Des* 2010;16:978-87.
5. Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for DMD. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;1:CD003725
6. Sugita H, Takeda S. Progress in muscular dystrophy research with special emphasis on gene therapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010;86:748-56.
7. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res* 2010;316:3087-92.
8. Muntoni F, Torelli S, Brockington. Muscular dystrophies due to glycosylation defects. *Neurotherapeutics* 2008;5:627-32.
9. Merregalli M, Farini A, Parolini D, Maciotta S, Torrente Y. Stem cell therapies to treat muscular dystrophy: progress to date. *BioDrugs* 2010;24:237-47.
10. Markert C, Atala A, Cann J, Christ G, Furth M, Ambrosio F, Childers MK. Mesenchymal stem cells: emerging therapy for Duchene muscular dystrophy. *PM&R* 2009;1:547-59.
11. Pena L, Kim K, Charrow J. Episodic myoglobinuria in a primary gamma-sarcoglycanopathy. *Neuromuscul Disord* 2010;20:337-9.
12. Lanzillo R, Aurino S, Fanin M, Aguenoz M, Vitale F, Fiorillo C et al. Early onset calpainopathy with normal non-functional calpain 3 level. *Dev Med Child Neurol* 2006;48:304-6.
13. Nadeau A, Linali M, Main M, Jimenez-Mallebrera C, Aloysius A, Clement E, North B, Manzur AY, Robb SA, Mercuri E, Muntoni F. Natural history of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Neurology* 2009;73:25-31.
14. Merlini L, Bernardi P. Therapy of collagen VI related myopathies (Bethlem, Ullrich). *Neurotherapeutics* 2008;5:613-8.
15. Sewry CA, Malegrera-Jimenez C, Muntoni F. Congenital myopathies. *Curr Opin Neurol* 2008;21:569-75.
16. Wheeler TM. Myotonic dystrophy: therapeutic strategies for the future. *Neurotherapeutics* 2008;5:592-600.
17. Angelini C, Semplicini C. Metabolic myopathies: the challenge of new treatments. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:1-8.
18. Beck M. Alglucosidase alfa: long term use in treatment of patients with Pompe disease. *Ther Clin Risk Manag* 2009;5:767-72.
19. Bushby K, Lochmuller H, Lyn S, Straub V. Interventions for muscular dystrophy: molecular medicines entering clinic. *Lancet* 2009;374:1849-56.
20. Bushby K, Lynn S, Straub T. Collaborating to bring new therapies to the patient – the TREAT-NMD model. *Acta Myol* 2009;28:12-5.
21. Thompson R, Schoser B, Monckton DG, Blonsky K, Lochmüller H. Patient registries and trial readiness in myotonic dystrophy – TREAT NMD/Marigold International Workshop Report. *Neuromuscul Disord* 2009;19:860-6.
22. TREAT-NMD. The TREAT-NMD global patient registries. Newcastle upon Tyne, United Kingdom: TREAT-NMD [cited 2010 Oct 11]. Available from: <http://www.treat-nmd.eu/patients/patient-registries/global-registries/>.

S u m m a r y

TRANSLATIONAL RESEARCH IN THE DIAGNOSIS AND THERAPY OF HEREDITARY MUSCULAR DISEASES AND NATIONAL REGISTRY OF NEUROMUSCULAR DISEASES

N. Barišić, I. Lehman, P. Grđan

Translational research enables transfer (translation) of basic laboratory, preclinical research to clinical practice, whereas results of clinical practice induce and direct further basic research. In the treatment of hereditary muscle diseases, pharmacological agents are used, while gene and stem cell therapies are still in the phase of clinical or preclinical trials. Standardization of models for testing therapeutic approaches, definition of certain diseases and definition of criteria for assessing therapeutic protocols and treatment efficiency represent a rational basis for clinical application of different therapeutic strategies. Completion of the European projects Translational Research in Europe – Assessment and Treatment of Neuromuscular Disorders (NMD-TREAT) and CARE-NMD has a very important role in the creation of uniform access to diagnostic and therapeutic procedures for patients with neuromuscular diseases. National registries have an important role in assessing the frequency, screening of patients, and planning of clinical trials of different therapeutic approaches including gene therapy, thereby contributing to improved quality of life and care of patients with neuromuscular diseases.

Descriptors: MUSCULAR DYSTROPHY, DUCHENNE; MUSCULAR DISEASES; TRANSLATIONAL RESEARCH; OLIGONUCLEOTIDES; GENE THERAPY

Primljeno/Received: 28. 10. 2010.

Prihvaćeno/Accepted: 4. 2. 2011.