

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Ана П. Косаћ

**ПРОЦЕНА УТИЦАЈА ГЕНЕТИЧКИХ
МОДИФИКАТОРА НА КЛИНИЧКИ ТОК
ДИШЕНОВЕ МИШИЋНЕ ДИСТРОФИЈЕ**

докторска дисертација

Београд, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Ana P. Kosać

**EVALUATION OF THE EFFECTS OF GENETIC
MODIFIERS ON THE CLINICAL COURSE OF
DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

ментор: проф. др Ведрана Милић Рашић

Медицински факултет, Универзитет у Београду

коментори: 1. проф. др Душанка Савић Павићевић

Биолошки факултет, Универзитет у Београду

2. доц. др Ружица Крављанац

Медицински факултет, Универзитет у Београду

чланови комисије за одбрану докторске дисертације:

1. проф. др Видосава Ракочевић Стојановић

Медицински факултет, Универзитет у Београду

2. проф. др Јасна Јанчић

Медицински факултет, Универзитет у Београду

3. проф. др Весна Мартић Поповић

Медицински факултет Војномедицинске академије у Београду

датум одбране: _____

Мојим родитељима

Захваљујем се својој менторки, Професорки Ведрани Милић Рашић, на визији коју поседује, на знању које несебично даје, на подрици коју пружа, на пракси кроз коју упознах читав један свет односа, емпатије, љубави према послу који обавља. Била ми је велика част и задовољство имати таквог учитеља поред себе и дарован пут испред себе којим се радујем поћи.

Захваљујем се својој коменторки, Професорки Душанки Савић Павићевић, на идеји и истрајности, њеној експертизи и свој помоћи великодушно датој. Захвална сам на прилици да упознам, сарађујем и учим управо од ње.

Велику захвалност дугујем и својој коменторки, Доценткињи Ружици Крављанац, за стручну и практичну помоћ, за прецизност и веома одговоран однос према кандидату.

Захваљујем се Доценту Јовану Пешовићу, свом другу у науци, који је млада нада молекуларне генетике света, и који је веома заслужан за резултате које смо добили. Хвала ти Јоване.

Захваљујем се колегама молекуларним биолозима Лани Раденковић, Милошу Бркушанину, Данијели Радивојевић и Марини Ђуришић на паметним саветима, подстицајној енергији и добрим идејама.

Захваљујем се докторкама Дини Војиновић, Јелени Младеновић, Славици Остојић и Гордани Ковачевић на колегијалном односу, на помоћи и подрици.

Драгој Јелени Мартиновић, физиотерапеуту, дугујем захвалност за сву помоћ у тестирању и праћењу наших испитаника.

Дечацима и младим људима, који носе терет овог обољења, као и њиховим породицама, остајем заувек захвална.

Искрено се захваљујем члановима комисије на помоћи у реализацији дисертације.

Свом узору и наставнику, Професорки Слободанки Тодоровић, захвална сам што сам дечји неуролог.

Вечно хвала Професору Небојини Јовићу.

Хвала Петру и Сави, мом свету.

Ауторски допринос:

1. Креирање концепта тезе: проф. др Ведрана Милић Рашић, проф. др Душанка Савић Павићевић;
2. Прикупљање података: кл. ас Славица Остојић, кл. ас Гордана Ковачевић, др Јелена Младеновић, др Марина Ђуришић, др Данијела Радивојевић, Лана Раденковић, др Милош Бркушанин
3. Формална анализа: доц др Јован Пешовић, Лана Раденковић, Немања Радовановић;
4. Истраживање: доц др Јован Пешовић, кл. асс Славица Остојић, кл. асс Гордана Ковачевић, др Јелена Младеновић; др Марина Ђуришић, др Данијела Радивојевић;
5. Методологија: проф. др Ведрана Милић Рашић, проф. др Душанка Савић Павићевић, доц. др Јован Пешовић, Лана Раденковић;
6. Супервизија: проф. др Ведрана Милић Рашић, проф. др Душанка Савић Павићевић, доц. др Ружица Крављанац;
7. Писање – оригинални нацрт: проф. др Душанка Савић Павићевић, доц. др Јован Пешовић, Лана Раденковић;
8. Писање- рецензија и уређивање: проф. др Ведрана Милић Рашић, проф. др Душанка Савић Павићевић, доц. др Ружица Крављанац.

ПРОЦЕНА УТИЦАЈА ГЕНЕТИЧКИХ МОДИФИКАТОРА НА КЛИНИЧКИ ТОК ДИШЕНОВЕ МИШИЋНЕ ДИСТРОФИЈЕ

САЖЕТАК

Увод: Дишенова мишићна дистрофија (ДМД) је најчешћа наследна болест мишића са почетком у децем добу. Варијабилност клиничког тока ДМД делимично је објашњена варијантама у модификујућим генима.

Циљеви: Одређивање учесталости алела варијанти гена *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* и испитивање њихове појединачне и удружене повезаности са клиничком прогресијом ДМД у групи покретних и непокретних болесника.

Материјал и методе: Генотипизоване су варијанте у *SPP1* - rs28357094 и *CD40* - rs1883832, као и хаплотип у *LTBP4* гену - rs2303729, rs1131620, rs1051303, rs10880, тестом алелне дискриминације, код 95 болесника. Мера исхода била је време губитка хода, односно постигнућа на моторним скалама током једногодишњег периода праћења. Појединачни ефекат варијанти процењен је анализама преживљавања, а удружени хијерархијском кластер анализом.

Резултати: Обојели који су користили кортикостероидну (КС) терапију изгубили су кретање годину дана касније ($p=0,021$). Учесталост ређих алела за анализирани варијанте била је у складу са учесталошћу за европску популацију. Модификујући ефекат варијанти *SPP1* и *CD40* и хаплотипова *LTBP4* није описан коришћењем log-rank теста и мултиваријантне Соx регресионе анализе. Кластер анализа је открила две подгрупе са статистичким трендом у разлици у годинама у време губитка хода. У групи покретних болесника мањи пад вредности на моторним скалама имали су носиоци заштитне варијанте у испитиваним генима.

Закључци: Модификујући ефекат *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* на клинички ток ДМД није описан иако је кохорта била упоредива по типовима мутација у *DMD* гену, фреквенцији варијанти одабраних гена и позитивном ефекту КС терапије са другим европским кохортама. Кластер анализа може да идентификује подгрупе које носе комбинацију генетских варијанти које модификују узраст у време губитка хода.

КЉУЧНЕ РЕЧИ

Дишенова мишићна дистрофија (ДМД), варијанте у генима, гени модификатори, *LTBP4*, *SPP1*, *CD40* варијанте

научна област: медицина; **ужа научна област:** неурологија

УДК број: _____

EVALUATION OF THE EFFECTS OF GENETIC MODIFIERS ON THE CLINICAL COURSE OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

ABSTRACT

Introduction: Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common inherited muscle disease with onset in childhood. Clinical course variability in DMD is partially explained by variants in modifier genes.

Objectives: Determining the allele frequency of *SPP1*, *LTBP4* and *CD40* gene variants and assessing their individual and combined association with clinical progression of DMD in a group of ambulant and nonambulant patients.

Material and methods: The variants in *SPP1* - rs28357094 and *CD40* - rs1883832, as well as the haplotype in the *LTBP4* gene - rs2303729, rs1131620, rs1051303, rs10880, were genotyped by allelic discrimination test in 95 patients. The outcome measure was age at loss of ambulation (LoA), or achievement on the motor scales during the one year follow up period. The individual effect of the variants was assessed by survival analysis, and the combined effect by hierarchical cluster analysis.

Results: Patients who used corticosteroids (CS) have LoA one year later ($p=0.021$). The frequency of rarer alleles of the analyzed variants was consistent with the frequency for the European population. The modifying effect of *SPP1* and *CD40* variants and *LTBP4* haplotypes was not observed using log-rank test and multivariate cox regression analysis. Cluster analysis revealed two subgroups with a statistical trend in difference in age at LoA. In the group of ambulant patients, a smaller decrease in values on the motor scales had patients with protective variants in the studied genes.

Conclusions: Modifying effect of *SPP1*, *LTBP4* and *CD40* on the clinical course of DMD was not replicated although the cohort was comparable in *DMD* mutation type distribution, allele frequencies of selected gene modifiers and positive effect of CS therapy, with other European cohorts. Cluster analysis may identify patient subgroups carrying a combination of the genetic variants that modify LoA.

KEY WORDS

Duchenne muscular dystrophy (DMD), single nucleotide polymorphisms, genetic modifiers, *LTBP4*, *SPP1*, *CD40* variants

scientific area: medicine; **narrow area of expertise:** neurology

UDK number: _____

САДРЖАЈ:

1. УВОД	1
1.1 Први описи Дишенове мишићне дистрофије.....	1
1.2 Етиопатогенеза Дишенове мишићне дистрофије.....	3
1.2.1 Ген <i>DMD</i> и типови мутација.....	5
1.2.2 Протеин дистрофин и изоформе дистрофина.....	7
1.3 Дијагностика Дишенове мишићне дистрофије.....	8
1.3.1 Генетичко тестирање.....	9
1.3.2 Биопсија мишића.....	9
1.4 Клиничка слика и ток Дишенове мишићне дистрофије.....	10
1.5 Хетерогеност неочиглед униформног фенотипа Дишенове мишићне дистрофије.....	12
1.6 Терапија Дишенове мишићне дистрофије.....	13
1.6.1 Симптоматска терапија.....	13
1.6.2 Каузална терапија.....	14
1.6.3 Генска терапија.....	17
1.6.4 Неонатални скрининг за Дишенову мишићну дистрофију.....	18
1.7 Гени модификатори Дишенове мишићне дистрофије.....	19
1.7.1 <i>TGFβ</i> сигнални пут у мишићима оболелих од ДМД.....	21
1.7.2 <i>SPP1</i> ген.....	21
1.7.3 <i>LTBP4</i> ген.....	22
1.7.4 <i>CD40</i> ген.....	23
1.7.5 Значај гена модификатора Дишенове мишићне дистрофије.....	24
2. ЦИЉЕВИ	25
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	26
3.1 Анализа клиничких карактеристика болесника.....	27
3.2 Процена функционалности моторним скалама.....	27
3.3 Молекуларно генетичка дијагностика.....	29
3.3.1 Одређивање мутација у <i>DMD</i> гену, одређивање изоформи дистрофина.....	29
3.4 Генотипизација одабраних варијанти гена модификатора.....	30
3.5 Анализа утицаја гена модификатора на време губитка хода оболелих од ДМД и статистичка обрада података.....	31
3.6 Процена утицаја гена модификатора на моторна постигнућа у групи покретних болесника.....	33
4. РЕЗУЛТАТИ	34
4.1 Клиничке карактеристике оболелих од ДМД.....	34
4.2 Мутације у <i>DMD</i> гену, изоформе дистрофина и утицај на прогресију болести..	34
4.3 Учесталости алела одабраних варијанти гена <i>SPP1</i> , <i>LTBP4</i> и <i>CD40</i>	37
4.4 Повезаност варијанти гена <i>SPP1</i> , <i>LTBP4</i> и <i>CD40</i> са клиничком прогресијом болести (време губитка хода) и употребом КС терапије.....	37

4.4.1 Варијанта гена <i>SPP1</i>	37
4.4.2 Варијанта гена <i>CD40</i>	39
4.4.3 Хаплотип гена <i>LTBP4</i>	41
4.4.4 Мултиваријантни Соx регресиони модел.....	45
4.5 Удружена повезаност варијанти гена <i>SPP1</i> , <i>LTBP4</i> и <i>CD40</i> са клиничком прогресијом болести (време губитка хода) – кластер анализа.....	47
4.6 Утицај гена модификатора на клинички ток код покретних болесника током једногодишњег праћења.....	49
5. ДИСКУСИЈА.....	52
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	72
7. ЛИТЕРАТУРА.....	74

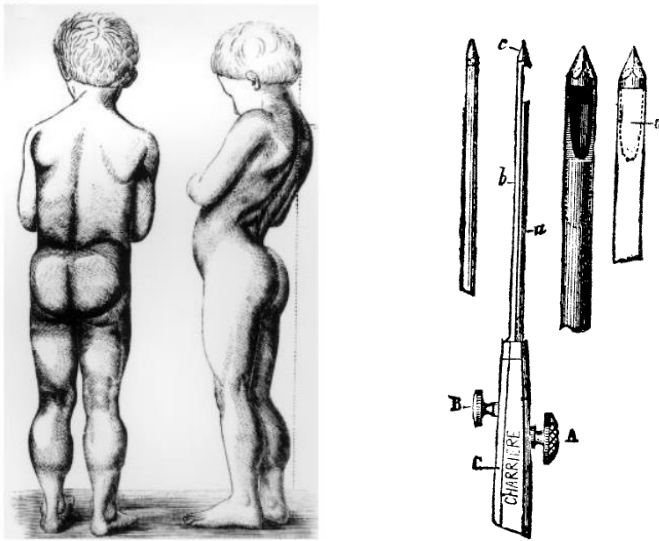
1. УВОД

1.1 Први описи Дишенове мишићне дистрофије

Дишенова мишићна дистрофија (ДМД) је најчешћа наследна болест мишића у дечјем узрасту која има прогресиван клинички ток са смртним исходом у узрасту од друге до четврте деценије живота услед срчане и респираторне недовољности. Преваленција обољења је око 10 оболелих на 100000 особа мушког пола и сматра се да је слична у свим регијама (Duan et al. 2021). Инциденца обољења је један на 3500 до 9000 живорођене мушке деце (Mah et al. 2014).

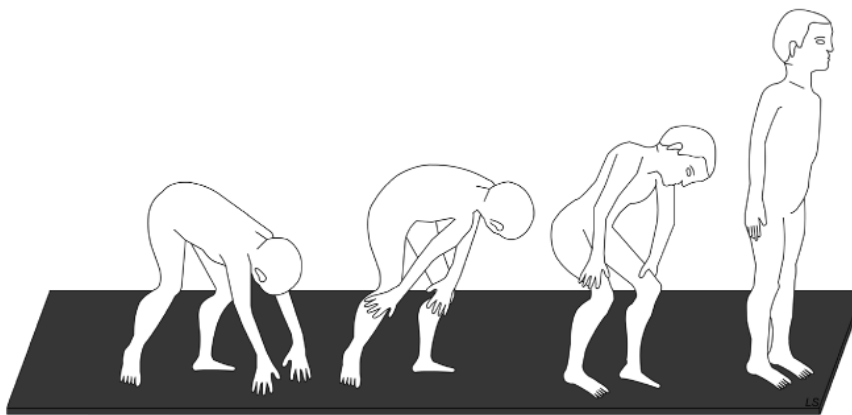
Иако заслуге за откриће обољења носи француски лекар Дишен, болест је први пут описана раније, у првој половини 19. века (Tyler et al. 2003). У литератури се наводе прикази оболелих Чарлса Бела (Charles Bell), Контеа и Ђоје (Conte, Gioja), Ричарда Партрича (Richard Partridge). Енглески лекар Едвард Мерион (Edward Meryon) описао је карактеристичан фенотип обољења 10 година пре Дишена. Мерион је 1851. године објавио рад са детаљним описима оболелих мушких чланова три породице. Окарактерисао је ентитет као примарну болест мишића („granular degeneration of the voluntary muscle“) и начинио микроскопски преглед мишића описавши прекид сарколеме, уз масну дегенерацију мишића. Начинио је и преглед кичмене мождине и нерава и ту није уочио патохистолошки знакове обољења (Emery et al. 2001).

Француски лекар Дишен (Guillaume-Benjamin-Amand *Duchenne* de Boulogne) 1861. године описује први случај обољења које ће накнадно понети његово име. У питању је дечак оболело од, како је то тада Дишен назвао, конгениталне хипертрофичне параплегије детињства, обољења карактеристичног по хипертрофијама мишића, посебно листова (Parent et al. 2005). Дишен је лично фотографисао оболелог дечака Joseph Sarrazin, и на основу фотографија начинио цртеже који су били саставни део неколико рукописа (Слика 1) (Tyler et al. 2003). У наредном периоду следи опис још 13 оболелих. Иако свестан рада свог колеге Мериона, Дишен претходне описе наводи као примере другог обољења – прогресивне мишићне атрофије. Дишен наставља истраживање и презентује клиничке карактеристике болести дајући ново име обољењу – псеудохипертрофична мишићна парализа, како би јасно показао да мишићне слабости нису ограничене само на ноге, већ са прогресијом укључују и руке и леђну мускулатуру, а да патолошке студије нису подржале церебралну етиологију обољења. Тада успоставља шест дијагностичких критеријума: 1. смањење снаге, на почетку болести, обично мишића ногу, 2. лордоза и шири ослонац ногу у стојећем ставу и ходу, 3. претерани волумен појединих мишића, 4. прогресивни ток болести, са погоршањем парализе и генерализацијом, 5. снижена/одсутна електромишићна контракција у узапредовалом стадијуму болести, 6. одсуство грознице, сензорних поремећаја и сметњи у функционисању бешике и црева током целог тока болести. Дишен користи и такозвани хистолошки харпун, као претечу иглене биопсије, за добијање узорака ткива мишића, перкутаном узорковањем, без примене анестезије и са сниженим ризиком од развоја инфекције (Слика 1). У хистолошкој анализи микроскопски описује поља фиброзе и масне дегенерације мишића.



Слика 1. лево - Дишенова репродукција фотографије дечака оболелог од Дишенове мишићне дистрофије; десно - Дишенов хистолошки харпун; шупљина за прикупљање узорка се јасно види на десној страни илустрације. Преузето из Tyler et al. 2003.

Сер Вилијам Ричард Говерс (William Richard Gowers), јадан од највећих неуролога свог доба, дао је велики допринос у даљем разумевању болести. Након описаног 21. болесника, уочио је наследни карактер болести, као и да се иста „унилатерално“ наслеђује „са мајчине стране“. Описује ДМД као „једну од најинтересантнијих, али у исто време и најтужнијих“ болести. Иако није први описао маневар који користе деца са Дишеновом дистрофијом за подизање са земље у стојећи положај, пружио је јасне илустрације овог феномена, који се до данас често назива „Говерсовим знаком“ (Слика 2) (Кауа et al. 2015). Из лежећег положаја, болесник се котрља у пронаторни, клечећи положај, ослања се о тло испруженим рукама како би подигао кукове и исправља ноге, формирајући тако троугао са куковима на врху са рукама и стопалима на поду који чине основу замишљеног троугла, затим се рукама гура о колена и тако подиже труп („пење се уз своје тело“) (Larner et al. 2011).



Слика 2. Говерсов знак, преузето из Larner et al. 2011.

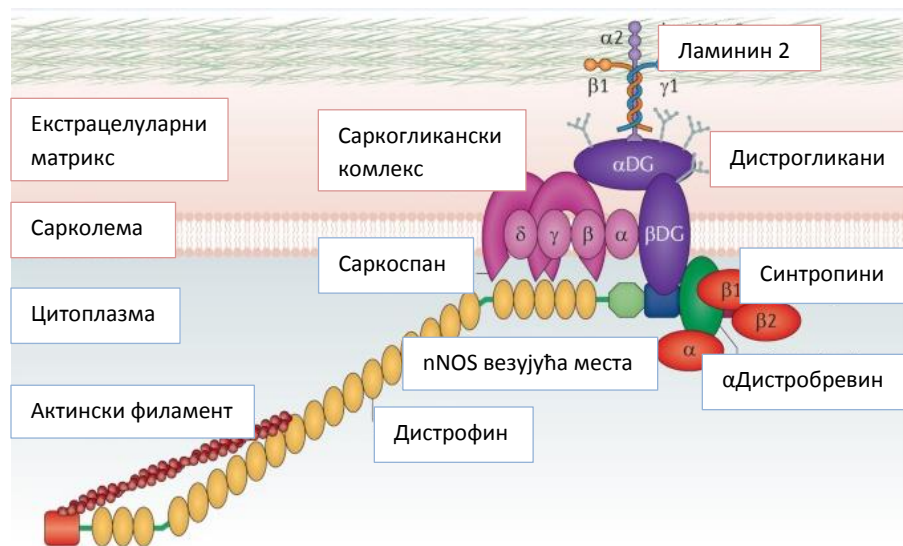
Први фрагменти *DMD* гена локализовани на X хромозому (Xp21) откривени су 1986. године, а наредне године откривен је протеински продукт гена у лабораторији Кункела (Lou Kunkel) и сарадника у Бостонској дечјој болници (Koenig et al. 1987). Назив протеину дистрофин даје Хофман (Eric Hoffman) у раду из 1987. године (Hoffman et al. 1987, Hoffman et al. 2020). У наредном периоду биће откривен протеински комплекс повезан са дистрофином и тиме сагледани други типови наследних обољења мишића (Bonilla et al. 1988, Ibraghimov et al. 1992, Duggan et al. 1997).

1.2 Етиопатогенеза Дишенове мишићне дистрофије

Као моногенска болест ДМД је узрокована мутацијом у *DMD* гену. Овај ген поседује информацију на основу које се синтетише протеин дистрофин. С обзиром да мутације у *DMD* гену доводе до поремећаја оквира читања транскрипта, не синтетише се протеин дистрофин, што за последицу има пропадање мишићних ћелија, које почиње деструкцијом сарколеме и клинички се презентује најтежим обликом дистрофинопатије – Дишеновом мишићном дистрофијом (Duan et al. 2021). Болест се наслеђује X везано, рецесивно и у две трећине оболелих преноси се преко мајке, док је у преосталој трећини болесника у питању *de novo* мутација.

Контракција мишића производи механички стрес, који, уколико није на прави начин каналисан, доводи до оштећења мишића. У основи ДМД је немогућност да се превазиђе механички стрес генерисан мишићном активношћу услед недостатка протеина дистрофина. Наведено је поткрепљено чињеницом да први симптоми болести постају евидентни након проходавања.

Дистрофин и протеински комплекс повезан са дистрофином имају веома важну улогу у повезивању екстрецелуларног матрикса и актинских филамената цитоскелета, пружајући стабилност мембрани мишићне ћелије (Слика 3). Када исти недостаје функција наведеног протеинског комплекса бива нарушена, као и интегритет сарколеме, стварајући услове за акумулацију различитих протеина у цитосолу који иначе нису присутни у мишићним влакнима, као што су имуноглобулини и албумини. Фрагилност и мале лезије сарколеме омогућавају масивни улазак калцијума у ћелију, губитак хомеостазе калцијума и активацију калцијум зависних протеаза финално водећи у ћелијску смрт (Deconinck et al. 2007).



Слика 3. Дистрофин и компоненте протеинског комплекса повезаног са дистрофином, преузето из Fairclough RJ et al. 2013.

У налазу биопсије мишића оболелих од ДМД описује се некроза и дегенерација мишићних влакана, често опсервирана у кластерима. Некротична влакна окружена су макрофагима и CD4 лимфоцитима. Такође се описују и мала влакна са централно положеним једрима, која означавају регенерацију мишића из миобласта, која убрзо бива недовољна да надомести процес дегенерације (Schmalbruch et al. 1990).

Дегенерисане и оштећене мишићне ћелије се уклањају инфилтрацијом инфламаторних ћелија. Код млађих оболелих од ДМД, ови инфилтрати се углавном састоје од макрофага и Т ћелија (Evans et al. 2009). У раној фази упале, проинфламаторни М1 макрофаги промовишу лизу мишићних ћелија кроз производњу ензима азот-оскид синтазе. У каснијим фазама, М1 макрофаги се замењују антиинфламаторним М2 макрофагима, који индукују регенерацију и фиброзу (Tidball et al. 2018). CD4⁺ помоћне Т ћелије производе инфламаторне цитокине, а CD8⁺ цитотоксичне Т ћелије покрећу смрт мишићних ћелија путем механизма посредованог перфорином (Tidball et al. 2018). Неутрофили, мастоцити и еозинофили доприносе упали и имунолошкој посредованој патологији у дистрофичним мишићима (Evans et al. 2009, Tidball et al. 2018). Током ране фазе болести, мишић се поправља регенерацијом, међутим, у каснијим фазама, некротичне мишићне ћелије бивају замењене масним и фиброзним ткивом због ослабљеног регенеративног капацитета и активације TGFβ у хроничном инфламаторном миљеу ДМД мишића (Rosenberg et al. 2015).

На питање када најраније и где наведени процеси почињу, одговор досеже у пренатални период, у време пре диференцијације мишићних ћелија. У линијама плурипотентних матичних ћелија од којих ће настати скелетни мишићи оболелих од ДМД показана је изражена дисрегулација транскриптома која се може идентификовати и пре

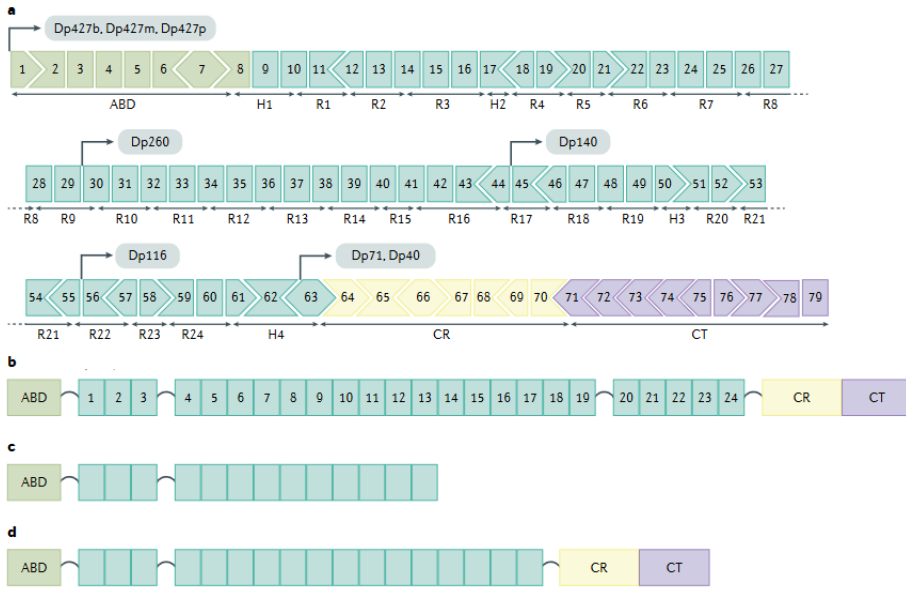
диференцијације мишићних ћелија (Mournetas et al. 2021). Ови подаци, у комбинацији са постојањем специфичног ембрионалног дистрофина Dp412e (дистрофин протеин 412e), поткрепљују ране промене у ћелијама прекурсора мишића, много пре појаве клиничких симптома (Massouridès et al. 2015).

У истраживању Gosselin и сарадници, користећи анализу транскриптома и функционалне ћелијске анализе, демонстрирају, по први пут, абнормалности у људским и анималним дистрофичним миобластима. До овог налаза истраживања и етиопатогенетски механизми ДМД били су усредсређени на процесе у миофибрилима и мишићним матичним ћелијама. Откривена је повећана пролиферација миобласта, смањена хемотакса и убрзање диференцијације, процеса неопходних за миорегенерацију. Одговарајуће абнормалности су идентификоване у миобластима оболелих од ДМД, као и у анималним ћелијским линијама, потврђујући ћелијску аутономну природу ових дефеката одрживу међу различитим врстама. Анализа метаболичких путева у транскриптомским путевима у миобластима показала је промене у брзини гликолизе/глюконеогенезе, метаболизму леукотриена, и митохондријалној бета-оксидацији. Ови резултати откривају континуитет болести: дефекти у сателитским матичним ћелијама, дисфункција миобласта која утиче на регенерацију мишића и која је недовољна да се супротстави губитку мишића због нестабилности миофибрила. Дакле, наведени резултати показују да се абнормалности код ДМД јављају и у миобластима, што ове ћелије чини новом метом за потенцијални третман болести (Gosselin et al. 2022).

1.2.1 Ген *DMD* и типови мутација

DMD ген је највећи познати ген у геному човека, налази се на р-краку X хромозома и заузима преко 2,22Мб. Више од 99% секвенце чине интрони, док је кодирајућа секвенца највеће изоформе дистрофина заступљена са укупно 11.058 база распоређених на 79 егзона (Слика 4) (Keegan et al. 2020). Стопа мутација у *DMD* гену је релативно висока у односу на просечну стопу мутације у геному; у једном од три случаја, ДМД је узрокована *de novo* мутацијом. Ова висока стопа мутација лежи у основи велике варијабилности мутација које су идентификоване код оболелих од ДМД. Лајденска база података ДМД мутација је база отвореног приступа у којој се чувају све мутације забележене у литератури. Поред тога, база података омогућава истраживачима широм света да пријаве своје мутације које су идентификовали у *DMD* гену (Aartsma-Rus et al. 2006).

Најчешћи тип мутација у *DMD* гену су делеције једног или неколико егзона, које су присутне код око 60-70% болесника, дупликације једног или неколико егзона код 5-15%, док преосталих око 20% чине мале мутације (тачкасте мутације, мале делеције и инсерције) (Aartsma-Rus et al. 2016). Иако делеције и дупликације егзона могу настати на било ком месту у *DMD* гену, постоје региони у којима се мутације чешће дешавају, и то између егзона 45 и 55 за делеције (код око 47% оболелих), а између егзона 3 и 9 за дупликације (код око 7% оболелих) (Duan et al. 2021). Најчешћа појединачна делеција егзона је везана за егзон 45, а дупликација за егзон 2 (Aartsma-Rus et al. 2006).



Слика 4. (а) схематски приказ *DMD* гена и (б) протеина дистрофина код здравих особа који остварује везу са екстрацелуларним матриксом преко домена богатим цистеином, (с) оболелих од Дишенове мишићне дистрофије код којих протеин дистрофин услед недостатка цистеином богатог домена не остварује везу са екстрацелуларним матриксом и (д) оболелих од Бекерове мишићне дистрофије код којих је дистрофин парцијално функционалан, али поседује све важне домене. Преузето из *Duan D et al. 2021.*

По правилу уколико мутације доводе до поремећаја оквира читања транскрипта не синтетише се дистрофин. Ипак постоје изузеци од правила.

Око 10% мутација не поштује правило оквира читања, болесници са мутацијом у оквиру читања клинички се могу презентовати као ДМД, као што и оболели са мутацијама које ремете оквир читања могу имати блажу клиничку форму болести, Бекерову мишићну дистрофију (БМД). Може се десити да исту мутацију имају болесници са ДМД и БМД, најчешће је у питању делеција егзона 3 до 7 у *DMD* гену. Једно од објашњења за овај феномен би могла бити употреба алтернативног кодона иницијације транслације. Ову хипотезу поткрепљује чињеница да постоје алтернативни старт кодони у оквиру читања *DMD* гена. Дистрофину откривеном код ових оболелих, са клиничком презентацијом БМД, недостаје егзон 1 и 2 кодирајућа секвенца, али садржи егзон 8 кодирајућу секвенцу. Нивои на којима се овај феномен одиграва вероватно зависе од величине и места делеције (Aartsma-Rus et al. 2006).

Такође се може десити да и у оквиру породице у којој постоји исти генотип, фенотип буде различит, што би се делом могло објаснити улогом гена модификатора на презентацију болести.

Тип мутације у *DMD* гену може на неколико начина довести до изостанка синтезе функционалног протеина дистрофина. Први је поремећај оквира читања који могу

узроковати делеције, дупликације, мале делеције и инсерције. Уколико је број недостајућих-прекобројних нуклеотида у егзонима који се налази у делецији/дупликацији дељив са три, оквир читања ће бити очуван што ће омогућити синтезу делимично функционалног дистрофина и клинички дати БМД. Уколико то није случај – фенотип ће ићи у правцу ДМД. Овакво померање оквира читања доводи до промене значења кодона и генерисања великог броја стоп кодона узрокујући превремену терминацију транслације и продукцију нефункционалног протеина. Дистрофину у овим ситуацијама недостаје круцијални домен који га повезује са екстрацелуларним матриksom. Други начин нарушавања синтезе дистрофина јесте присуство превременог стоп кодона услед тачкасте мутације. На послетку постоје и специфични поремећаји сплајсовања, искрајања интрона, где због мутације долази до погрешног препознавања егзона, који бива непотребно искројен. У ретким ситуацијама, испод 1% болесника, присутне су и дубоке интронске мутације у *DMD* гену, које доводе до погрешног препознавања дела интрона као егзона који накнадно у процесу продукције протеина може померити оквир читања и онемогућити производњу дистрофина (Aartsma-Rus et al. 2016).

1.2.2 Протеин дистрофин и изоформе дистрофина

Градивне јединице скелетног мишића – миофибрили показују висок степен адаптације неопходне у одговору на захтеве упућене мишићу од стране тела. Дистрофин стоји у основи миофибриларног ремоделовања, које захтева јаку везу са базалном ламином, потребну за успешно одржавање функције током покрета тела, али и замену и поновну изградњу веза у одговору на физиолошке захтеве (Hoffman et al. 2020).

Протеин дистрофин има четири главна домена: N-терминални F-актин-везујући домен (кодиран егзонима 1–8 *DMD* гена), штапичасти домен (кодиран егзонима 8–64), домен богат цистеином (кодиран егзонима 64–70) и C-терминални домен (кодиран егзонима 71–79). Код болесника са ДМД, услед недостатка дистрофина, долази до губитка веза између цитоскелета и екстрацелуларног матрикса. Насупрот томе, код болесника са БМД, производи се делимично функционални дистрофин који садржи кључне домене потребне за повезивање F-актина са екстрацелуларним матриksom (Duan et al. 2021).

Три узводна промотора у *DMD* гену (Dp427c, Dp427m и Dp427p) производе протеин дистрофин пуне дужине од 427 kDa. Са четири унутрашња промотора синтетишу се транскрипти који кодирају скраћене немишићне изоформе дистрофина које се разликују у N-терминусима (Dp260, Dp140, Dp116 и Dp71). Алтернативно сплајсовање и алтернативна полиаденилација (додавање поли(A) репа на иРНК) дају додатне изоформе дистрофина као што је Dp40 (Duan et al. 2021).

Dp427m, као изоформа пуне дужине, главна је компонента дистрофин-гликопротеин комплекса који обезбеђује структурну стабилност мишићне ћелије и јасно је окарактерисана, како у хуманим, тако и анималним моделима. Церебрална форма Dp427c испитана је доминантно у анималним моделима и културама ћелија, верује се да се експримира у неуронима церебралног кортекса и зонама хипокампуса, док је изоформа Dp427p експримирана у Пуркињеовим ћелијама.

Краћа изоформа Dp260 експримирана је у ретини, а Dp116 у периферном нерву, док је Dp140 доминантно присутна у феталном периоду. Изоформа Dp71 убиквитарно је

присутна, али ипак са највећом експресијом у централном нервном систему. Когнитивно постигнуће оболелих од ДМД зависи од места мутације у *DMD* гену које се рефлектује на одсуство специфичних изоформи. С тим у вези, мутације које доводе до губитка експресије великог броја изоформи дистрофина (а налазе се дисталније у самом *DMD* гену) одговорне су за скромнија когнитивна постигнућа, за разлику од проксимано локализованих мутација и губитка експресије само најдужих изоформи дистрофина. У истраживањима је показано да недостатак експресије Dp140 изоформе чешће доводи до појаве неуроразвојних поремећаја, дијагностикованих већ у узрасној групи оболелих млађих од четири године; док се методама неуросликања верификује мањи волумен сиве масе код ових болесника (Doorenweerd et al. 2017).

1.3 Дијагностика Дишенове мишићне дистрофије

Болест се може открити на неколико начина у зависности од првих уочених симптома и знакова. У најранијем узрасту успорени психомоторни развој код дечака, без анамнестичких података о перинаталној трауми и јасног неуролошког дефицита у смислу лезије централног моторног неурона, може побудити сумњу да се ради и о ДМД. Такође могуће је у раном узрасту, рутинским лабораторијским анализама крви, регистровати повишене вредности трансaminaза и накнадно кретин киназе (КК), ензима који је у ДМД увек вишеструко повишен. Трећи и најчешћи начин откривања болести подразумева прве јасне симптоме болести: хипертрофије мишића листа и мишићне слабости у узрасту од треће до пете године живота. Најчешћа запажања родитеља су неспретност детета, чести падови, отежано устајање из чучња и пењање уз степенице, ход на прстима. Постоје и ситуације у оквиру којих постављамо дијагнозу ДМД старијем дечаку, а породица већ има млађе мушко дете које је наизглед здраво, али може, уколико је мајка носилац мутације у *DMD* гену, у 50% случајева наследити исто обољење.

Дијагностички критеријуми за ДМД подразумевају типичну клиничку слику код дечака у узрасту око пете године, са мишићним хипертрофијама и слабостима, позитивним Говерсовим знаком, хиперлордозом, ходом на прстима уз вишеструко повишене вредности КК у серуму (Bushby et al. 2010, Birnkrant et al. 2018). Данас се у циљу потврде ДМД спроводи генетичко тестирање; инвазивне дијагностичке методе, као што су електромиографија и/или биопсија мишића, се не саветују као иницијална дијагностичка процедура.

1.3.1 Генетичко тестирање

Метода која се користи у циљу детекције највећег броја мутација (око 80%), а то су делеције и дупликације једног или више егзона у *DMD* гену, јесте умножавање већег броја лигираних проба – MLPA (енг. multiplex ligation-dependent probe amplification). Ова метода представља мултиплекс PCR (енг. polymerase chain reaction) тест који користи до 40 проба, од којих је свака специфична за различиту ДНК секвенцу (углавном егзоне специфичног гена од интереса), за процену релативног броја копија сваке ДНК секвенце. MLPA је једноставна, брза и поуздана метода, која се користи као метода првог избора и за процену статуса носиоца код женских сродника оболелих чланова мушког пола са

дијагностикованом делецијом/дупликацијом једног или више егзона у *DMD* гену (Stuppia et al. 2012).

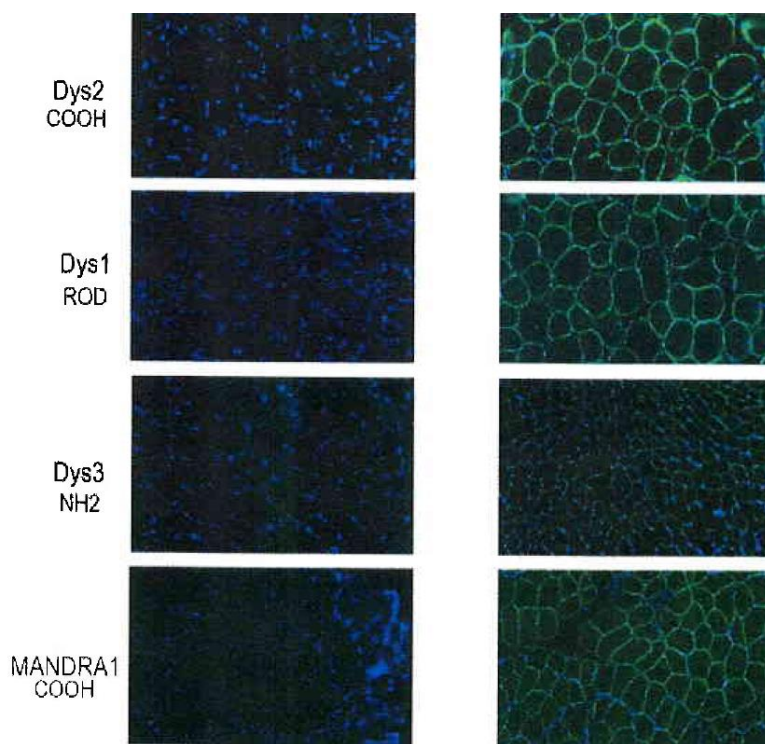
Алтернативно, компаративна геномска хибридизација на чипу користи пробе које покривају егзоне *DMD* гена, али и интроне. ДНК контрола и оболелих је фрагментисана и обележена различитим флуорофорима и хибридује са пробама. Као и MLPA, овај метод ће открити мутацију у захваћеном једном или више егзона, али, с обзиром да користи и пробе унутар интрона, омогућава прецизно одређивање локације интронске тачке прекида.

Мултиплекс PCR, варијанта PCR-а која симултано умножава већи број циљних фрагмената, се данас не препоручује за генетичку дијагнозу ДМД. Међутим, он пружа алтернативу, јефтинији приступ откривању мутација и као такав се и даље користи у бројним лабораторијама, а пре појаве методе MLPA био је главна дијагностичка алатка. Овај приступ користи два сета прајмера и открива присуство или одсуство егзона 1, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52 и 60. Као такав, он је у стању да открије већину делеција код оболелих од ДМД и БМД. Међутим, број захваћених егзона ће често остати непознат, те самим тим и одговор на питање да ли мутација нарушава оквир читања и да ли је подобна за специфичну терапију. На пример, када је егзон 45 одсутан, ово може бити или због делеције егзона 45, која нарушава оквир читања или због делеције егзона 45–46 која не нарушава оквир читања (јер присуство егзона 46 се не процењује овим приступом). У пракси, оболеле од ДМД идентификоване мултиплекс PCR-ом, за које се не зна који су егзони захваћени, треба додатно анализирати помоћу MLPA (Aartsma et al. 2016).

Уколико се након спроведене MLPA анализе не добије позитиван резултат, саветује се секвенцирање појединачних егзона *DMD* гена којим ће бити откривено преосталих око 20% „малих“ мутација. Све више се са Сангеровог секвенцирања прелази на нове генерације секвенцирања, које у зависности од дизајна и биоинформатичке обраде података могу да детектују мале мутације али и варијације у броју копија, што у случају *DMD* гена омогућава идентификацију делеција и дупликација како код болесника тако и носилаца мутације.

1.3.2 Биопсија мишића

Уколико је клиничка слика типична за ДМД, а наведене генетичке анализе остану негативне или неинформативне (у случају идентификације варијанте непознатог значаја) индикована је биопсија мишића којом се може потврдити потпуни недостатак протеина дистрофина имунохистохемијском или Western blot анализом (Слика 5). Ово су често ситуације такозваних „дубоких“ интронских мутација које су ретке (мање од 0,5% пријављених мутација), и код којих генетичка анализа може остати негативна конвенционалним тестирањем (MLPA и Сангер секвенцирање). Ове мутације се могу открити методама секвенцирања комплетног гена *DMD*, било циљаног или секвенцирањем комплетног генома (енг. whole genome sequencing), као и анализом РНК. Биопсија мишића оправдана је и у ситуацијама када добијени генотип не корелира са постојећим фенотипом. Такође биопсија мишића има важно место у клиничким испитивањима потенцијалних терапија ДМД које имају за циљ обнављање синтезе дистрофина. У већини случајева током биопсије мишића потребна је примена опште анестезије коју је неопходно пажљиво планирати у овој популацији болесника (Verhaart et al. 2019).



Слика 5. лево - налаз имунохистохемијске анализе код оболелог од Дишенове мишићне дистрофије, одсуство дистрофина - NCL-Dys2 и MANDRA1 за C крај; NCL-Dys1 за Род/италичести домен, NCL-Dys3 за N крај; десно - налаз имунохистохемијске анализе код здраве контроле

1.4 Клиничка слика и ток Дишенове мишићне дистрофије

Прве симптоме болести могуће је приметити најчешће у узрасту од 3. до 5. године. Они подразумевају прве мишићне слабости пелви-феморалног региона, узрокујући следствено измењен ход, појаву лумбалне хиперлордозе, позитиван Говерсов знак. Присуство хипертрофија, најчешће мишића листа, један је од препознатљивих знакова болести и традиционално се приписује таложењу масти и везивног ткива, па отуда и термин псеудохипертрофија. Ипак могуће је уочити и истинско повећање мишићне масе новим техникама снимања. Хиперплазија и хипертрофија миофибрила могу се хистолошки верификовати у природном току ДМД (Walters et al. 2017).

Како болест напредује постају видљиви ехокардиографски знаци поремећене систолне и дијастолне функције. Пад ејекционе фракције (ЕФ) испод 50% дијагностикује се већ у узрасту 9-10 година, док током болести ЕФ може пасти на 25-30% (Tandon et al. 2015). Срчане аритмије региструју се у великом броју оболелих од ДМД, најчешће по типу синусне тахикардије, и могу бити узроковане фиброзом спроводног система срца (Kamdar et al. 2016). Поред ехокардиографског прегледа веома важну улогу у раном откривању поља фиброзе срчаног мишића има магнетна резонанца срца. Фиброза је најчешће

локализована субепикардијално и то инферобазално, детектује се код појединих већ на узрасту 10 година, а у већине болесника са 15 година (Hog et al. 2018).

Когнитивни аспекти болести присутни су и непрогресивни, око 30% дечака са ДМД има интелектуалну недовољност различитог нивоа, што потврђује улогу дистрофина у централном нервном систему. Неурокогнитивно функционисање које се односи на краткотрајну меморију, егзекутивне функције, визуоспацијалну оријентацију, као и дефицит пажње, потешкоће у савладавању вештина читања и писања може бити измењено код оболелих од ДМД. Забележена је и чешћа појава аутистичног спектра поремећаја, хиперкинетичког поремећаја са дефицитом пажње, као и опсесивно компулзивног поремећаја. Све ово био је повод за истраживање колико су варијанте у *DMD* гену важне за когнитивно функционисање у општој популацији (Vojinovic et al. 2015).

Како болест напредује мишићне слабости постају израженије водећи оболелог од ДМД у губитак самосталног хода, појаву сколиозе и изражених контрактура. Дилатативна кардиомиопатија са израженом срчаном фиброзом бива присутна код свих болесника старијих од 18 година. Респираторна функција временом бива нарушена, примарно због афекције респираторне мускулатуре, али такође и негативних механичких ефеката деформитета грудног коша (Roberto et al. 2011). Хиповентилација и хиперкапнија се прво јављају током спавања. У време појаве истих витални капацитет (ВК) најчешће износи између 20 и 50% од нормалних вредности. Појава дневне хиперкапније прати овај период и без респираторне помоћи, просечно преживљавање у овој фази болести је мање од једне године (Parker et al. 2005). Почетак асистираних вентилација се везује за пад ВК испод 20%, $P_a CO_2$ изнад 45 mmHg или након две епизоде акутне респираторне инсуфицијенције (Raphael et al. 1994); или ВК испод 680 mL и максимални инспираторни притисак испод 3,5 kPa (што је предиктивно за дневну хиперкапнију).

Упркос примени адекватних мера неге и лечења, смрт настаје најчешће између друге и четврте деценије живота услед кардио-респираторне слабости. Неки болесници данас доживе и пету деценију (Eagle et al. 2007). Преживљавање оболелих од ДМД се продужило захваљујући развоју и примени водича за негу, адекватног збрињавања као и бољег третмана кардиопулмоналне дисфункције. У француској студији средње очекивано време преживљавања било је 25,77 година за оболеле рођене пре 1970. године, а 40,95 година за оне рођене након 1970. године, највише захваљујући асистираној вентилаторној подршци (Kieny et al. 2013).

Веома ретко ДМД се може дијагностиковати и код особа женског пола и органичена је на особе са Тарнеровим синдромом (Ferrier et al. 1965, Chelly et al. 1986, Satre et al. 2004), са транслокацијом која укључује *DMD* ген или биалелном мутацијом у *DMD* гену (Takeshita et al. 2017). Женски носиоци мутације у *DMD* гену су најчешће асимптоматски, веома ретко могу имати клинички слику сличну БМД. Око 2,5-19% носиоца има мишићне слабости, а око 7,3 до 16,7% развије дилатативну кардиомиопатију (Ishizaki et al. 2018). Није начињена систематска анализа дужине животног века носиоца мутација у *DMD* гену, али на основу резултата појединачне шкотске студије, животни век носиоца мутације са кардиомиопатијом није скраћен (Holloway et al. 2008).

1.5 Хетерогеност наочиглед униформног тока Дишенове мишићне дистрофије

ДМД се сматра стереотипном у клиничкој презентацији, природном току и тежини обољења. Међутим, међуиндивидуалне разлике, у смислу тежине моторних, респираторних и кардиолошких манифестација, описане су и пре идентификације дистрофина (Brooke et al. 1989). Касније, су документоване идентичне мутације у *DMD* гену повезане са фенотиповима ДМД различите тежине. На речено треба додати и когнитивне аспекте обољења присутне код неких оболелих.

Све је више напора у покушају да се одговори на питање шта узрокује хетерогеност фенотипа код ДМД, не узимајући у обзир примену стандардних мера неге и лечења.

У студији Desguerre и сарадника начињена је клиничка анализа 75 оболела од ДМД, који су дијагностиковани молекуларно генетичком и анализом биопсије мишића, уз потврду о нерегистровању резидуалног дистрофина методом Western blot. Болесници су праћени од стране истог лекарског тима у просечном временском периоду од 10 година. Ова анализа поткрепљује клиничку хетерогеност ДМД и идентификује четири фенотипа са различитим исходима (Desguerre et al. 2009). Најтежи фенотип подразумевао је постојање успореног психомоторног развоја, ране појаве клинички манифестних симптома болести и снижена когнитивна постигнућа, док је најблажи фенотип подразумевао губитак хода након 11. године. Варијабилност фенотипа није била условљена различитим генотипом оболелих од ДМД, али је описана са узрастом и типом симптома на почетку болести, као и мишићном снагом са 8 година и коефицијентом интелигенције.

У француској студији, која је укључила 278 оболела од ДМД, издвојила су се два клинички екстремна фенотипа. Тежак фенотип подразумевао је губитак способности самосталног хода у просеку на узрасту од 7,10 година и престанак плућног „раста“ на узрасту 10,26 година, док је у групи оболелих са благим ДМД фенотипом мобилност изгубљена у просеку са 12,01 година, а застој у плућном развоју забележен са 14,58 година (Humbertclaude et al. 2012). Ова варијабилност фенотипа није била условљена специфичним спектром/типом мутација у *DMD* гену.

Са друге стране, ретки оболели са одређеним мутацијама у оквиру самог *DMD* гена могу имати нешто повољнију прогнозу. То су оболели са делецијом егзона 3-7 у *DMD* гену, као и оболели подобни за прескакање егзона 44, у оквиру којих већина има делецију егзона 45 у *DMD* гену (van den Bergen et al. 2014, Winnard et al. 1995). Болесници погодни за прескакање егзона 44 у *DMD* гену способност самосталног хода губе просечно у узрасту 14,8 година. Ово је показано у кохорти болесника кооперативне интернационалне неуромишићне групе – студија природног тока Дишенове болести. Сматра се да код ових оболелих долази до спонтаног прескакања егзона у *DMD* гену, чиме се поново успоставља оквир читања и последично ствара одређена количина протеина дистрофина. Исто није показано за болеснике, по својој мутацији, погодне за искрајање других егзона у *DMD* гену, као што су 45, 53 и 51.

1.6 Терапија Дишенове мишићне дистрофије

Најважније смернице у лечењу и праћењу болесника са дијагнозом ДМД сажете су у новим препорукама групе аутора и обухватају све аспекте овог обољења, приказане кроз дефинисане фазе болести (Birnbrant et al. 2018). Мултидисциплинарни приступ у лечењу је круцијалан и подразумева болесника у центру интересовања лекара различитих специјалности.

1.6.1 Симптоматска терапија

Како каузална терапија не постоји за све оболеле од ДМД, симптоматско лечење представља окосницу терапије и бриге о овим болесницима. Оно подразумева фармаколошко и нефармаколошко лечење и збрињавање. Једина симптоматска терапија регистрована за лечење свих оболелих од ДМД је кортикостероидна (КС) терапија. У клиничкој пракси и спроведеним клиничким студијама потврђен је позитиван утицај КС терапије на ток ДМД, како пре тако и после губитка могућности самосталног хода. Поред утицаја на моторно функционисање КС утичу позитивно и на плућну функцију, смањују потребу за операцијом сколиозе и одлажу почетак појаве кардиомиопатије (Duan et al. 2021). Саветују се преднизон у дневној дози 0,75 mg/kg или дефлазакорт у дневној дози од 0,9 mg/kg. Неопходно је информисати болесника и родитеље/старатеље о потреби за континуираном применом терапије, предузимању превентивних мера у циљу избегавања нежељених дејстава, као и који су то потенцијални нежељени ефекти КС терапије, а који знаци и симптоми адреналне кризе.

Питање које и даље остаје отворено јесте „У ком узрасту је најбоље започети КС терапију?“ Наводи се да је то време пре значајног пада физичких способности, али мере процене овог параметра су веома варијабилне, тако да се у новијим студијама позитивни резултати ране терапијске интервенције откривају и у узрасној доби дечака млађих од 30 месеци (Connolly et al. 2019). Ипак најчешће се почетак терапије везује за четврту-пету годину живота, а примена КС пре друге године се не саветује (Duan et al. 2021). Болесници који нису користи КС терапију у просеку су губили могућност кретања са 10 година, док су они који су употребљавали КС терапију били покретни до просечног узраста од 13 година (Koecks et al. 2017). Дужа употреба КС терапије (дуже од годину дана) има кумулативни ефекат који одлаже појаву миљоказа прогресије болести за 2,1 до 4,4 године у поређењу са краћим трајањем лечења (краће од једног месеца) (McDonald et al. 2018). Кортикостероиди постижу овај ефекат везивањем за регулатор запаљења, NF-κB (енг. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), у активираним Б ћелијама, и смањењем пролиферације имуних ћелија путем заустављања ћелијског циклуса, вероватно преко NFAT5 (енг. nuclear factor of activated T-cells 5) (Herbelet et al. 2020).

Одмах по постављању дијагнозе ДМД неопходно је начинити кардиолошки преглед. У пресимптоматској фази болести срца, кардиолошко праћење је једном годишње. Препоручује се и магнетна резонанца срца за оболеле старије од шест односно седам година, која има посебну сензитивност ка раном откривању фиброзе срца. Препорука о започињању терапије до узраста 10 година, налази се у водичима добре клиничке праксе и најчешће се односи на лекове из групе инхибитора ангиотензин

конвертујућег ензима и блокаторе рецептора ангиотензина. По престанку хода и у кардиолошкој симптоматској фази болести неопходно је чешће кардиолошко праћење, које обухвата мониторинг поремећаја срчаног ритма и лечење дилатативне кардиомиопатије.

Пулмолошки прегледи обављају се једном годишње док су болесници покретни, а по престанку способности самосталног хода на сваких шест месеци. Прегледи укључују спирометрију, тестирање снаге респираторне мускулатуре, као и студију спавања, са циљем детекције ноћне хиповентилације и правовременог започињања неинвазивне вентилације. Савети о годишњој вакцинацији против вируса инфлуенце, као и вакцинација против преумокока су неопходни (Birnkranz et al. 2018).

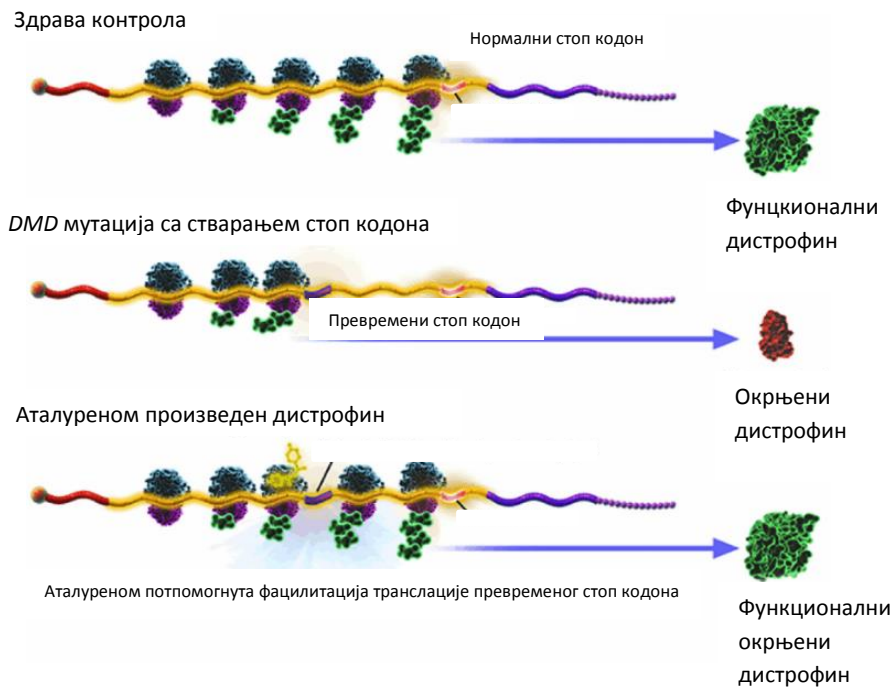
Физијатријски прегледи обављају се на сваких шест месеци. Имајући у виду континуирану примену КС терапије неопходно је саветовати адекватан дијететски режим, чинити мониторинг телесне висине и масе, одређивати ниво витамина Д и вршити процену постојања дисфагије, опстипације, гастро-езофагеалног рефлука, гастропаразе на шестомесечном нивоу, који би били аларм за укључивање гастроентеролога у процес лечења. Неопходно је саветовати обавезну годишњу остеодензитометрију. Процену раста и полне зрелости неопходно је начинити на шест месеци. Ортопедски прегледи имају за циљ рано откривање коштаних деформитета, у првом реду мислећи на контактуре и сколиозу. Радиографско праћење, посебно важно у раном откривању фрактура пршљенова, индикује ортопед као и време оперативног збрињавања сколиозе, прегледи се обављају на сваких једну до две године (Birnkranz et al. 2018). Овим болесницима се не препоручује употреба спиналних ортоза. Ризици од опште анестезије постоје код оболелих од ДМД, и односе се на потенцијални развој рабдомиолизе и претеће акутне бубрежне инсуфицијенције (Birnkranz et al. 2018).

1.6.2 Каузална терапија

Каузална терапија има задатак да „направи“ функционални протеин дистрофин, те је ово поље у првим реду дефинисано бројним клиничким студијама у покушају да се задатак реши. За сада су регистроване само ретке терапије које су погодне за лечење мањег броја оболелих од ДМД. Ове терапије стварају одређену количину протеина дистрофина, захтевају дуготрајну примену, не могу излечити болест, али могу успорити даљу прогресију исте.

Аталурен је први регистровани лек у земљама Европске уније од 2014. године. Ауторизацију лека омогућила је Европска агенција за лекове и означила као условну, уз обавезу о прикупљању додатних доказа о делотворности. Аталурен је погодан за лечење око 10-15% болесника са тачкастом мутацијом у *DMD* гену која ствара стоп кодон (енг. nonsense mutation) доводећи до превремене терминације транслације, што финално резултира одсуством протеина (Bladen et al. 2015, Bello et al. 2016, Laing et al. 2011, Richavant et al. 2011). Дејство лека заснива се на механизму читања превременог стоп кодона на рибозомима, што резултира формирањем функционалног протеина дистрофина, чије је присуство верификовано у популацији болесника у 2а фази клиничког испитивања (Слика 6) (Finkel et al. 2013). Аталурен је први лек орално биорасположив са оваквим механизмом дејства, дозира се три пута дневно у складу са телесном масом болесника.

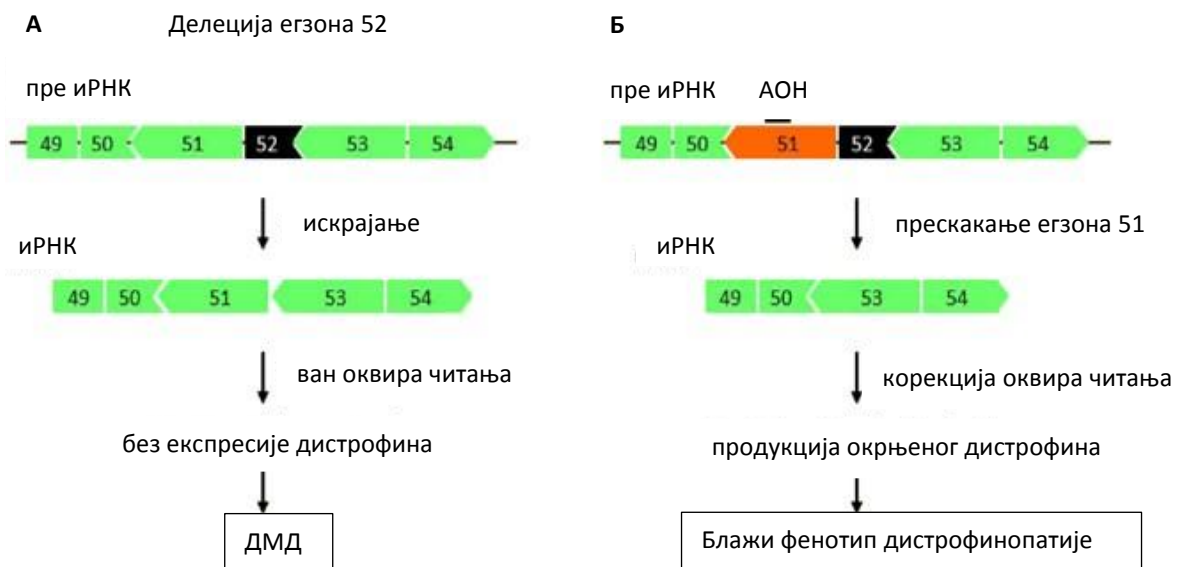
Током клиничког истраживања по први пут је уврштен 6 минутни тест хода као примарна мера исхода у популацији оболелих од ДМД изложених студијском леку.



Слика 6. Приказ стварања протеина дистрофина код здраве контроле; код оболелог са мутацијом у *DMD* гену која доводи до стварања стоп кодона и механизма дејства аталурена – потпомогнута фацилитација транслације превременог стоп кодона, те синтеза окрњеног, али функционалног протеина дистрофина, преузето из Haas et al. 2015.

На територији Сједињених Америчких држава (САД), од стране Агенције за храну и лекове, одобрена су три лека, из групе антисенс терапија у оквиру којих се антисенс олигонуклеотидима (АОН), синтетичким аналозима нуклеинске киселине, врши „прескакање“ одређеног егзона (енг. exon skipping) и поновно успостављање оквира читања које ће омогућити синтезу делимично функционалног протеина дистрофина. Ова терапија није типична генска терапија јер се „интервенција“ врши на нивоу иРНК. До сада су одобрени лекови који врше „прескакање“ егзона 51, 45 и 53, и погодни су за употребу само код одређеног броја болесника са специфичним делецијама у оквиру *DMD* гена. Терапија је парентерална, у виду интравенских инфузија и, за сада, се примењује једном недељно. Наведеним терапијама је у клиничким студијама достигнута статистичка значајност у количини произведеног протеина дистрофина, квантификованог применом Western blot теста из биопсија мишића оболелих, на основу чега се у комерцијалној примени очекује и клинички бенефит, који досадашњим клиничким испитивањима није досегао статистичку значајност.

Етеплирсен је први регистровани АОН терапеутик за ДМД, на територији САД (Слика 7). Примењује се код болесника погодних за прескакање егзона 51 у *DMD* гену, што чини око 14% свих оболелих (Bladen et al. 2015). Етеплирсен се примењује у дози 30 mg/kg једном недељно у интравенској инфузији током 35-60 минута. Најчешћа нежељена дејства су повраћање, екскоријација, артралгија, осип, бол на месту убода инфузионог система, инфекција горњих респираторних путева. Начињеним биопсијама мишића запажен је пораст средње вредности нивоа дистрофина за 4%, мерено методом Western blot, након 12 недеља третмана (Cirak et al. 2011). Основни недостаци овог вида лечења јесу ограничено ћелијско преузимање, висок клиренс из системске циркулације и кратко трајање ефекта терапије, због чега је неопходна примена високих и понављаних доза лека (Moulton et al. 2010).



Слика 7. А - немогућност синтезе протеина дистрофина услед делеције егзона 52 у *DMD* гену, те последични фенотип Дишенове мишићне дистрофије; Б - механизам дејства терапије прескакања егзона 51 у *DMD* гену, антисенс олигонуклеотидом (АОН), код оболелог са делецијом егзона 52, те синтеза окрњеног али функционалног протеина дистрофина. Преузето из Nakamura A. et al. 2017.

Голодирсен је још један лек из групе АОН, који своје дејство остварује механизмом прескакања егзона, у конкретном случају егзона 53 у *DMD* гену. За ову терапију подобно је око 7,7% оболелих од ДМД (Aartsma-Rus et al. 2009). Вилтоларсен је терапија која такође припада механизму прескакања егзона 53 у *DMD* гену. Вилтоларсен је 21-мерни, док је голодирсен 25-мерни олигонуклеотид, те ће за исту дозу оба лека, количина АОН у вилтоларсену бити 20% већа него у голодирсену (Roshmi et al. 2019). Лек је иницијално одобрен за интравенску употребу у Јапану, а накнадно и од стране Америчке агенције за храну и лекове (Dhillon et al. 2020). Начињеним биопсијама мишића запажен је пораст средње вредности нивоа дистрофина за 2,8%, мерено методом Western blot, након 24 недеље третмана (Komaki et al. 2020).

Казимерсен, последњи у низу молекула из групе АОН, механизмом прескакања егзона 45 *DMD* гена код болесника са специфичним типом мутације, доводи до продукције протеина дистрофина. Казимерсен је одобрен за употребу од стране Америчке агенције за храну и лекове 2021. године у индикацији лечења оболелих од ДМД са специфичним типом мутације погодним за терапију прескакања егзона 45, који чине око 8% свих ДМД болесника.

Европска агенција за лекове није одобрила примену АОН у лечењу ДМД и захтева прикупљање додатних доказа о делотворности лекова, те су клиничке студије у току.

У стратегији моделовања нових каузалних терапија веома важно питање јесте колико је протеина дистрофина потребно „произвести“ како би оболели од ДМД, испољили блажи облик болести – БМД. Овим питањем бавили су се de Feraudy и сарадници у ретроспективној студији исхода болесника са генетички доказаним дистрофинопатијама, са закључком да је и веома мала количина резидуалног дистрофина довољна за помак из ДМД фенотипа ка БМД (de Feraudy et al. 2021). Претходни истраживачи објавили су резултате по којима је и са 17% резидуалног дистрофина могуће развити БМД, док је најмање 29% окарактерисано као количина која може заштити од развоја симптома од стране скелетних мишића (Anthony et al. 2014, Neri et al. 2007).

У наведеној студији de Feraudy и сарадници су поделили болеснике у три групе у зависности од количине дистрофина детектованог најпоузданијом методом мерења Western blot. Прва група болесника имала је 0% дистрофина и 74% је развило ДМД, 10% интермедијарни фенотип са губитком способности самосталног хода између 13. и 16. године, док је један оболели испољио БМД. Друга група болесника имала је концентрацију дистрофина већу од нуле, а мању од 5%, од којих је 61% развило БМД, 18% ДМД, а један болесник из ове групе имао је интермедијарни облик болести. У трећој групи оболелих мерена је концентрација дистрофина изнад 5% и 57% је развило БМД, ни један испитаник ДМД, нити интермедијарни тип дистрофинопатије, али је 43% болесника из ове групе још увек ходало или су подаци о времену губитка хода остали недоступни. Сумарно гледано резултати студије су показали да је количина дистрофина преко 0,5% често довољна да направи „померање“ ДМД фенотипа ка блажим облицима болести (de Feraudy et al. 2021). Ови резултати веома охрабрују и у другом светлу приказују претходно описане „мале“ помаке каузалне терапије у продукцији дистрофина.

1.6.3 Генска терапија ДМД

У време припреме овог рукописа генска терапија ДМД није била одобрена од стране регулаторних тела САД и Европске Уније. Ипак један препарат, под називом SRP-9001 (delandistrogene тохерагровес - rAAVrh74.МНСК7.микро дистрофин), је добио приоритетни преглед апликације од стране Америчке агенције за храну и лекове у циљу убрзаног одобрења генске терапије за оболеле од ДМД који су самостално покретни. Одлука се очекује најкасније до 29. маја 2023. године.

Генска терапија у клиничким експерименталним студијама, користи векторе из породице неинтегришућих аденовируса, који остају као екстрахромозомски епизоми и имају висок тропизам за мишићне ћелије, и успева да допреми функционални део *DMD*

гена. Сам *DMD* ген, као што је описано, је веома велик и као такав превазилази капацитет за „паковање“ у партикулу вируса који износи око 4,7 кВ. Истраживачи креирају функционалне делове *DMD* гена – називајући их микро или мини дистрофином и апликују их једнократно. У току клиничких испитивања различитих потенцијалних терапеутика регистрована су и нежељена дејства попут активације комплемента и тромбцитопеније, анемије, акутног бубрежног оштећења, продубљивања мишићних слабости и смрт болесника 2021. године у првој фази клиничког испитивања (Markati et al. 2022, The Pfizer *DMD* gene therapy team 2022).

Апликација SRP-9001 је подржана подацима из клиничког испитивања, иницијално фазе 1/2, које је тестирало једну дозу SRP-9001 код четири оболела од ДМД. Резултати су показали бољу моторну функцију и издржљивост у ходу три године након третмана (Mendell et al. 2020). Више од 80 болесника са ДМД је укупно лечено SRP-9001 током клиничких студија, а терапија је показала позитивне резултате у више временских тачака, поред тога што је показала конзистентан безбедносни профил (Mendell et al. 2021). Испитивање фазе 3 тестира SRP-9001 у односу на плацебо, са главним циљем упоређивања једногодишњих промена моторне функције са третманом. Студија је укључила 125 оболела од ДМД, узраста од 4 до 7 година, резултати се очекују крајем 2024. године.

1.6.4 Неонатални скрининг за ДМД

Скрининг новорођенчади је суштински, превентивни јавноздравствени програм за рану идентификацију поремећаја чији рани третман може довести до значајног смањења морбидитета и морталитета.

Напредак у терапијама ДМД осветлио је питање важности правовременог постављања дијагнозе и истакао значај неонаталног скрининга. Иако са етичког становишта замерке за веома рано постављање дијагнозе стоје, најпре у чињеници да не постоји каузална терапија за све оболеле од ДМД, као и да се иста не уводи одмах по рођењу. Са друге стране планирање породице, у ситуацији раног откривања оболелог од ДМД, бива сврсисходније, знајући да су мајке оболелих у две трећине носиоци мутације у *DMD* гену.

Резултати неонаталног скрининга објављени 2012. године засновани су на употреби суве капи крви за детекцију вредности креатин киназе, а потом и за генетичку анализу ДМД у великој популацији новорођене мушке деце у Охају (Mendell et al. 2012). Након идентификоване повишене вредности КК ≥ 600 U/L, анализа би се понављала из узорка венске крви, а уколико би прве вредности КК биле ≥ 750 U/L, радио би се генетички тест. По резултатима је закључено да иницијално повишене вредности КК нису биле потврђене другим КК тестом, највероватније због трауме мишића током порођаја. Повишене вредности КК >750 U/L имало је 308 од 37649 новорођене мушке деце, али

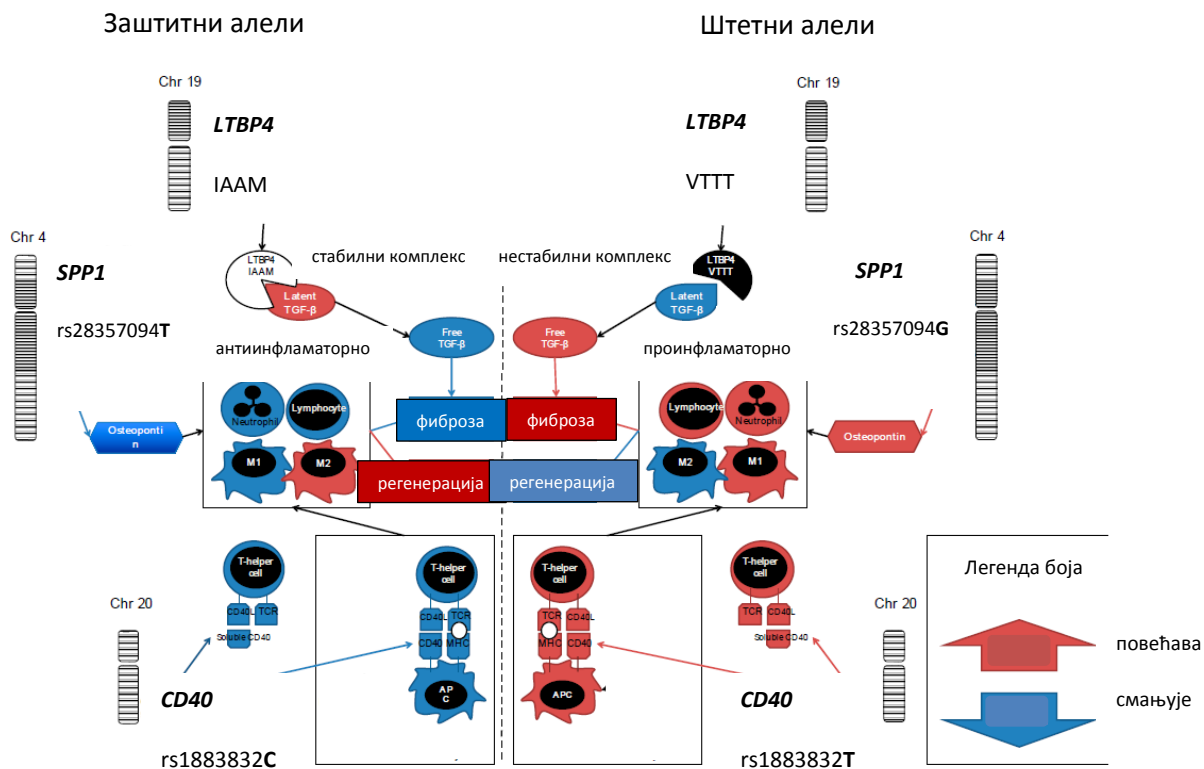
само 10 је имао $KK \geq 2000$ U/L, од којих је шест имало мутацију у *DMD* гену (пет ван оквира и један у оквиру читања) (Mendell et al. 2012).

У новој пилот студији, на популацији од 15754 новорођенчади, 16 је имало значајно повишене вредности *KK*, од којих је седам било мушког пола, и они су упућени на молекуларно тестирање и клиничко праћење. Код три је дијагностикована ДМД, али мутације нису биле подобне за примену до сада регистрованих каузалних терапија (Hartnett et al. 2022). Ово су резултати након једногодишњег скрининга који се у овој великој пилот студији наставља.

1.7 Гени модификатори Дишенове мишићне дистрофије

Варијанте у специфичним генима, независним од *DMD* гена, остварују утицај на клинички ток ДМД, успоравају прогресију болести, што је најчешће показано кроз одлагање губитка самосталног хода за, у просеку, једну до две године (Bello et al. 2019). До сада је укупно описано шест гена модификатора ДМД. Варијанте у прва три откривена гена *SPP1*, *LTBP4* и *CD40*, биће предмет интересовања ове дисертације те ће о њима бити више речи у тексту који следи (Слика 8). Преостала три гена модификатора ДМД су: ген *ACTN3*, и описана варијанта rs1815739, који кодира актин 3, важну компоненту саркомере и експримира се у брзим гликолитичким влакнима (Hogarth et al. 2017); ген *THBS1* за тробмоспондин који је важан активатор TGF β (енг. transforming growth factor beta), и његова варијанта rs2725797 чији ређи алел смањује експресију *THBS1* узрокујући просечно каснији губитак хода (Weiss et al. 2018) и последњи описани ген модификатор је *TCTEX1D1*.

Иако је најчешћи начин откривања специфичних гена – модификатора испитивање одабраних гена са већ познатом улогом у патогенези ДМД, *TCTEX1D1* ген је једини, за сада, откривен применом методе секвенцирања целог егзома оболелих од ДМД са клинички екстремним презентацијама болести у смислу значајне разлике у узрасту губитка хода и појаве кардиомиопатије. *TCTEX1D1* је први ген модификатор болести откривен на овај начин у групи болесника са неуромишићним обољењима, што је било могуће захваљујући доброј фенотипизацији оболелих и снажној интернационалној сарадњи. Анализа је спроведена у популацији две групе оболелих од ДМД, оних који су изгубили способност самосталног хода пре 8,5 година и оних након 12. године живота, као и код оболелих код којих је кардиомиопатија дијагностикована већ у 13. години живота и оних који и после 28. године немају знаке значајног нарушења срчане функције. Овим приступом анализирано је 242 потенцијалних варијанти које су валидиране у мултицентричној европској кохорти коју чине 301 оболела са ДМД, као и у другој независној америчкој кохорти оболелих европског порекла. Спроведеним истраживањем издвојиле су се две варијанте у *TCTEX1D1* гену – rs1060575 и rs3816989, чији су мање учестали алели, узрокујући смањену експресију *TCTEX1D1*, били повезани са бржом прогресијом болести (Spitali et al. 2020).



Слика 8. Дијаграм молекуларних механизма предложен за објашњење асоцијација варијанти гена модификатора са фенотипом Дишенове мишићне дистрофије. Плава боја означава молекуле, путеве или биолошке процесе који су смањени заједно са одређеним генотипом; док црвена боја означава оне који су повећани. На левој страни су представљени заштитни алели варијанти модификатора и њихове последице; док десна страна представља штетне алеле. Модификовано према Bello et al 2019.

Највећи број истраживања фокусиран је на утицај гена модификатора ДМД на моторни исход обољења као маркер прогресије, а то је слабост скелетне мускулатуре и време губитка хода. Гени модификатори ДМД утичу и на време појаве респираторне слабости и инсуфицијенције, као и на контрактилност и волумен леве срчане коморе које воде у дилатативну кардиомиопатију. Појава озбиљних кардиолошких манифестација болести не мора увек корелисати са тежином захваћености скелетне мускулатуре, у неким ситуацијама код мутација у почетном делу *DMD* гена, чак напротив. У недавној објављеној студији Bello и сарадници анализирали су утицај *SPP1* и закључили да постоји негативан ефекат доминантног GG генотипа rs28357094 на форсирани витални капацитет (ФВЦ) и на плућне функционалне тестове (ПФТ) у средњем периоду праћења од 4,5 године (Bello et al. 2020). За разлику од ефекта на скелетне мишиће, доминантни ГГ генотип rs28357094 био је повезан са пет година каснијом појавом ДК (Varp et al. 2015). У истој студији је анализиран ефекат генотипа *CD40* на плућну функцију. Показало се, са значајним негативним ефектом, да је Т алел rs1883832 по адитивном моделу био повезан са нижим ФВЦ и ранијим губитком хода, као и ранијом употребом неинвазивне

вентилације код оболелих од ДМД (Bello et al. 2020). За разлику од *SPP1* и *CD40*, варијанте у *LTBP4* гену нису показале повезаност са ПФТ код одабраних оболелих од ДМД (Bello et al. 2020).

1.7.1 TGF β сигнални пут у мишићима оболелих од ДМД

Суперфамилија TGF β укључује више од 50 чланова који посредују у ћелијском расту, пролиферацији, апоптози, диференцијацији и контроли синтезе и деградације екстрацелуларног матрикса. TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3 чине примарну потпородицу TGF β ; TGF β чланови породице се луче као латентни прекурсори који се активирају пре интеракције са TGF β рецепторима на површини ћелије (Shi et al 2011, Schiller et al 2004). У мишићима, TGF β делује на миофибриле и сателитске ћелије које регулишу одговор на повреду, раст, диференцијацију и фиброзу. TGF β такође директно утиче на експресију компоненти екстрацелуларног матрикса. Миостатин, мишић-специфичан члан суперфамилије TGF β , делује као негативан регулатор раста мишића и његова инхибиција блокира фиброзу, што је имало своје место у клиничком испитивању лека фолистатино (инхибитора миостатина) у потенцијалном третману ДМД (Vo et al. 2015).

У мишићима оболелих од ДМД постоји повећана активност TGF β 1, а код недистрофичних мишића TGF β 1 је повишен као одговор на физичку активност и трауму. Резултати студија РНК на микрочипу су наговорили интеракцију 56 гена са TGF β у већем броју дегенеративних мишићних обољења. Код дистрофије где регенеративни процес не успе, поремећен је специфичан временски образац експресије ових гена. Губитак нормалне синхронизације унутар ове мреже гена, због понављајућих повреда, може допринети неуспеху регенерације која карактерише ДМД. Гени модификатори ДМД *SPP1* и *LTBP4* укључени су у TGF β сигнализацију.

1.7.2 *SPP1* ген

Прва описана варијанта која модификује ток ДМД налази се у промотору гена *SPP1* (eng. secreted phosphoprotein 1), који кодира остеопонтин (Pegoraro et al. 2011). Остеопонтин је цитокин који припада породици малих интегрин везујућих лиганд Н везаних гликопротеина, описан први пут у костима, накнадно откривен и у другим органима, секретован као одговор на деструкцију ткива, са улогом репарације и регенерације, регулације инфламаторног одговора и туморске прогресије (Castello et al. 2017, Нao et al. 2017, Rittling et al. 2015). У фибробластима мишића који не експримирају дистрофин, остеопонтин повећава експресију колагена подстицањем TGF β сигналног пута индукцијом MMP9 протеиназе (Piva et al. 2012).

G алел варијанте rs28357094 промотора *SPP1* гена је по доминантном моделу удружен са ранијим губитком хода код оболелих од ДМД. У *in vitro* тесту луциферазе, G алел је смањео активност промотора (Giacopelli et al. 2004). Иако је смањена транскрипција *SPP1* откривена код оболелих од ДМД који носе један или два G алела, није откривена значајна разлика у нивоу остеопонтина. С друге стране, болесници са G алелом показали су смањен број ћелија које инфилтрирају CD68+ макрофаге, што сугерише да постоји сложенији механизам који лежи у основи модификујућег ефекта rs28357094 (Bello et al. 2019, Piva et al. 2012).

Истраживање наведене варијанте *SPP1* гена је спроведено у популацији италијанске ДМД мреже која је укључила 80 оболелих (Pegoraro et al. 2011). Варијанте гена које су испитиване одабране су из три различита извора: иРНК профил оболелих са веома тешким и блажим ДМД фенотипом; варијанте које утичу на мишићни фенотип здравих волонтера и из студија повезаности варијанти целокупног генома са метаболизмом код људи. Одабрано је 29 генских локуса за тестирање као потенцијалних гена модификатора ДМД, највећи број из наведене треће групе, студија повезаности целокупног генома са метаболизмом (метаболички синдром, гојазност, циркулишући липиди). Након анализе одабраних генских локуса у кохорти кооперативне интернационалне неуромишићне истраживачке групе издвојила су се два гена кандидата *ACTN3* (rs1815739; p=0,008) и *CELSR2* (rs646776; p=0,006), док је из кохорте болесника из Падове статистичку значајност достигао *SPP1* (rs28357094; p=0,001). Ова три генска локуса тестирана су и у другој кохорти (из које примарно нису издвојени). Након корекције за вишеструка тестирања једино је за *SPP1* потврђен утицај на тежину клиничке слике ДМД са достизањем статистичке значајности у обе кохорте. Валидационим студијама које су укључиле већи број испитаника, 283 оболела од ДМД, и дужи временски период праћења потврђена је улога наведене варијанте на клинички ток ДМД (Pegoraro et al. 2011). У студијама које су уследиле, анализирани су стратификоване субпопулације оболелих од ДМД према податку о употреби КС терапије у једногодишњем периоду пре губитка могућности самосталног хода. На основу добијених резултата варијанта rs28357094 дефинисана је више као фармакодинамски маркер одговора на КС терапију него као директни модификатор тока ДМД (Bello et al. 2015). Наиме, у групи оболелих који су користили КС терапију G алел rs28357094 је према доминантном моделу био асоциран са неповољнијим клиничким током и ови оболели губили су способност хода у просеку две године раније, док је код оболелих без КС терапије клиничка прогресија у оба генотипа била слична.

1.7.3 *LTBP4* ген

Хаплотип, сачињен од четири варијанте у гену *LTBP4* (eng. latent transforming growth factor- β binding protein 4) на хромозому седам је описан као модификатор ДМД 2013. године (Flanigan et al. 2013). У студији су испитане варијанте *LTBP4* гена код 254 непокретна болесника, који су могућност хода изгубили пре 20. године, из кохорте пројекта Уједињене дистрофинопатије. Ова кохорта прати 900 оболелих од ДМД, од којих је већина још увек покретна, а кохорта обједињује оболеле из седам региона и представља, до сада, најуниформнију и највећу ДМД популацију. У истраживању је процењен ефекат *LTBP4* генотипа на узраст у време губитка хода, с обзиром да овај миљоказ одражава прогресију болести и није под утицајем пристрасности утврђивања, а оболели се овог податка тачно сећају. Идентификован је заштитни хаплотип у *LTBP4* и то IAAM (изолеуцин, аланин, аланин и метионин) хаплотип варијанти rs2303729–rs1131620–rs1051303–rs10880. Хомозиготни IAAM хаплотип био је повезан са одложеном губитком хода и то за две године у групи оболелих од ДМД који су користили КС терапију и за око једну и по годину у групи оних код којих КС терапија није примењивана (Flanigan et al. 2013). Најзначајнија појединачна варијанта била је rs10880 која се налази близу домена богатог цистином, одговорног за везивање TGF- β (Bello et al. 2019). Претходно је, у наведеној студији Flanigan-а и сарадника, процењен утицај мутације у *DMD* гену са

закључком да тип мутације нема јасног утицаја на ДМД фенотип, процењен кроз узраст губитка хода. Такође су детерминисане фреквенце полиморфизама у наведеном гену и опсервирана два најчешћа хаплотипа: VTTT (валин, треонин, треонин, треонин) и IAAM који су присутни у око 80% алела у већини популација. Независна валидација гена *LTBP4* као модификатора ДМД начињена је у кохорти од 265 оболела од ДМД и протективни ефекат IAAM хаплотипа описан је у обе групе болесника, са и без КС терапије (van den Bergen et al. 2015).

Ген *LTBP4* је идентификован на сличан начин као и *SPP1* помоћу студија асоцијације које обухватају читав геном и подразумевају трагање за малим варијацијама у геному велике групе људи окарактерисаним као појединачне нуклеотидне варијанте. У случају *LTBP4* гена анализа није спроведена на хуманим већ на анималним моделима и то на гама саркогликан дефицијентним мишевима који су имали фенотип различите тежине (Heydemann et al. 2009).

LTBP4 протеин је део TGF- β сигналног пута и учествује у процесу фиброзе (Heydemann et al. 2009). Протективни ефекат IAAM хаплотипа повезан је са резистенцијом латентног TGF- β комплекса на протеолизу, што доводи до смањења TGF- β сигнализације, смањења пермеабилности сарколеме и фиброзе (Bello et al. 2019). Mdx мишеви са заштитним алелом *LTBP4* (са уметањем од 36 базних парова - bp) и mdx мишеви који експримирају људски *LTBP4* ген карактеришу повећано задржавање TGF- β унутар латентног комплекса и бољи исход у погледу фиброзе и фенотипа у поређењу са mdx контролама (Lamar et al. 2016, Сесо et al. 2014).

1.7.4 *CD40* ген

Трећи описани ген модификатор клиничког тока ДМД је *CD40* који кодира протеин TNFRSF5 (енг. tumor necrosis factor receptor superfamily member 5). TNFRSF5 је важан костимулаторни протеин, експримиран на антиген презентујућим ћелијама и има улогу у активацији Т ћелија које даље активирају пут NF- κ B у широком спектру биолошких процеса (Bello et al. 2019). Улога *CD40* у мишићима са недостатком дистрофина није довољно јасна, али је познато да деплеција Т-ћелија модулира фиброзу и одговор на КС терапију. Оболели од ДМД, носиоци Т алела rs1883832 у гену *CD40* губили су могућност хода годину дана раније (Bello, Flanigan et al. 2016). Иако Т алел смањује транскрипциону активност *CD40 in vitro*, повећан ниво *CD40* транскрипта и смањен ниво *CD40* протеина откривени су у биопсији мишића оболелих од ДМД са Т алелом (Bello et al. 2019).

У студији коју су спровели Bello и сарадници коришћен је Exome Chip, за генотипизацију који је усредсређен на варијанте унутар кодирајућих секвенци као и њихову непосредну околину. Анализирано је око 27 хиљада варијанти. Студија асоцијације са узрастом губитка хода тестирана је код 109 оболелих од ДМД Сох пропорционалним хазард моделом. Зависна варијабла је био фенотип презентован кроз узраст губитка хода. Независне варијабле су били генотип (27025 варијанти у склопу Exome Chip) и КС терапија. Ниједна варијанта није успела да задовољи постављене критеријуме и досегне статистичку значајност. Накнадно је начињена селекција варијанти које су у околини гена који су укључени у инфламаторне и про-фиброзне сигналне путеве (NF- κ B и TGF- β). Најизраженија позитивност добијена је за две суседне варијанте *CD40* гена, на хромозому 20 (rs6074022 и rs4810485). Средњи узраст у време губитка хода био је

2,8 година раније код носилаца најмање једне копије (адитивни и доминантни модел) T алела. Тако је ген *CD40* одабран за валидацију и то варијанта rs1883832, која се налази између две претходно описане варијанте *CD40* (rs4810485 и rs6074022) (Bello, Flanigan et al. 2016). Варијанта rs1883832 се налази у 5' нетранслатирајућем региону *CD40* гена унутар Козакове секвенце која је релевантна за везивање рибозома и адекватну иницијацију транслације уз последичну адекватну синтезу протеина (Bello et al. 2019).

Валидација варијанте начињена је у групи од 108 оболелих од ДМД и носиоци T алела rs1883832 по доминантном моделу су једну и по годину раније изгубили могућност хода, достижући статистичку значајност. Валидација је, кроз интернационалну сарадњу, проширена на још три независне кохорте од укупно 660 оболелих од ДМД. Носиоци T алела rs1883832 *CD40* гена су у просеку изгубили могућност хода годину дана раније ($p=0.02$ за адитивни и $p=0.002$ за доминантни модел). Овим је потврђен модификујући ефекат одабране варијанте *CD40* гена на ток ДМД. Сматра се да снижена CD40-посредована ћелијска сигнализација код носилаца T алела у rs1883832 може водити у немогућност регенерације и у фиброзу скелетног мишића код оболелих од ДМД.

1.7.5 Значај гена модификатора ДМД

Откриће гена модификатора ДМД је важно из више разлога. На првом месту као додатан генетички чинилац који има утицај на клинички ток и прогресију ДМД. До сада нису спроведене студије удруженог утицаја свих описаних гена модификатора. Могуће је да би овај заједнички утицај на клинички ток био већи од појединачног, имајући у виду да већина гена модификатора остварује ефекат преко истих сигналних путева или путева чије се деловање укршта. На другом месту, важну улогу гени модификатори ДМД имају у планирању истраживања на пољу проналазка нових терапијских приступа. Медикаментним потенцирањем ефекта одређене варијанте гена модификатора могло би се утицати на појаву нешто лакшег фенотипа ДМД. Такође, важну улогу гени модификатори могу имати у планирању клиничких студија и то у стратификацији оболелих према генотипу, што би омогућило формирање хомогенијих група унутар којих би анализа резултата била тачнија.

Са друге стране, прогностички ефекат гена модификатора код појединачног болесника нема велики значај, јер је потребно узети у обзир велики број других варијабли појединца, како генетичких тако и срединских, као и њихову интеракцију. Ово је поље које ће у будућности остати пријемчиво истраживачима који трагају за одговором како боље разумети ДМД, укључујући и фенотипску хетерогеност, и како се приближити проналаску специфичне каузалне терапије овог тешког обољења. До тада остаје потреба да се и у нашој популацији оболелих од ДМД спроведе истраживање утицаја свих гена модификатора на клинички ток болести, што је и започето од стране аутора овог рукописа (Kosac et al. 2022).

2. ЦИЉЕВИ:

1. Одређивање типова мутација у *DMD* гену.
2. Одређивање изоформи дистрофина, процена њиховог утицаја на клиничку прогресију болести (време губитка хода) и процена утицаја примене КС терапије на одређени тип изоформи дистрофина.
3. Одређивање учесталости алела одабраних варијанти гена *SPP1*, *LTBP4* и *CD40*.
4. Испитивање појединачне повезаности одабраних варијанти гена *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* са клиничком прогресијом болести (време губитка хода).
5. Испитивање повезаности одабраних варијанти гена *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* са употребом КС терапије која је примењивана код оболелих у периоду од најмање годину дана пре губитка способности самосталног хода.
6. Испитивање удружене повезаности одабраних варијанти гена *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* са клиничком прогресијом болести, праћеном преко времена губитка хода.
7. Испитивање утицаја гена модификатора *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* на клинички ток код покретних болесника током једногодишњег праћења.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ:

У овом истраживању учествовало је 95 оболелих од ДМД, лечених у Клиници за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду и Институту за здравствену заштиту мајке и детета "др Вукан Чупић" на Новом Београду (Слика 9).

Сваком болеснику и његовом родитељу/старатељу објашњено је у каквом истраживању би оболели учествовао. Објашњено је да би истраживање укључивало генетички материјал, ДНК оболелог од ДМД, који би након спроведеног истраживања био уништен.

У првом делу истраживања испитиван је утицај гена модификатора (*SPP1*, *LTBP4* и *CD40*) на узраст губитка хода. Други, проспективни део истраживања обухватио је покретне оболеле од ДМД код којих је био сагледан ефекат варијанти гена модификатора, *SPP1*, *LTBP4* и *CD40*, на клинички ток, тачније на моторна постигнућа током једногодишњег периода праћења.

Истраживање је спроведено у периоду 2020-2022. године, уз напомену да су услови пандемије SARS Cov2 инфекције умањили одзив у групи покретних оболелих од ДМД. Сви болесници и њихови родитељи/старатељи потписали су информисану сагласност за учешће у овом истраживању. Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора Медицинског факултета Универзитета у Београду. Свим оболелим постављена је дијагноза ДМД на основу узраста појаве првих симптома, типичне клиничке слике обољења, биохемијских параметара крви и иста потврђена на молекуларно генетичком нивоу – детекцијом специфичне мутације у *DMD* гену (Birnkraut et al.2018).



Слика 9. Приказ броја оболелих од Дишенове мишићне дистрофије који су учествовали у одређеним сегментима истраживања

3.1 Анализа клиничких карактеристика болесника

У истраживању су учествовали оболели од ДМД, старији од пет година који су лечени у Клиници за неурологију и психијатрију и Институту за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“ и налазе се у клиничким регистрима наведених установа. Предност су имали оболели од ДМД који су изгубили способност хода, имајући у виду да је циљ истраживања био утицај варијанти гена модификатора *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* на узраст у време губитка самосталног хода. Критеријуми за укључивање су, поред наведеног, били и постојање података о употреби КС терапије и доступност узорка ДНК ради генетичког испитивања модификатора болести. Одређен број узорака ДНК оболелих од ДМД био је, уз сагласност болесника/родитеља, сачуван у референтним генетичким лабораторијама, те за ову анализу није поново издвајан, већ је исти употребљен, уз писану сагласност испитаника/родитеља за текућу студију.

Мера исхода била је време губитка способности самосталног хода и дефинисана је као немогућност самосталног хода на дистанци од 10 метара и процењена на најближи узраст оболелог од пола године. Прикупљени су подаци о употреби КС терапије, дужини трајања, врсти и начину примене лека. Оболели су сматрани као лечени КС терапијом ако су примали терапију (преднизон или дефлазакорт) најмање годину дана пре него што су изгубили могућност хода.

Оболели са делецијом егзона 45 и делецијом егзона 3 до 7 у *DMD* гену су искључени из истраживања, пошто је показано да су ове мутације повезане са продуженим средњим узрастом у време губитка самосталног хода (Bello et al 2016, Van den Bergen et al. 2014, Wang et al. 2018).

3.2 Процена функционалности моторним скалама

Код оболелих од ДМД који су покретни и старији од пет година, начињена је процена моторних постигнућа користећи два теста у два временска интервала, на почетку и 12 месеци након започињања истраживања. Први тест је 6 минутни тест хода, спроведен по стандардизованој процедури развијеној у Универзитету у Калифорнији. Током 6 минута хода бележи се пређени пут у метрима, као и број падова у ходу, уколико их је било (McDonald et al. 2013).

Други тест је NSAA (енг. North Star Ambulatory Assessment) који је начинила клиничка мрежа North Star за збрињавање педијатријских неуромишићних обољења у Великој Британији (Scott et al. 2006, Eagle et al. 2007). Тест представља скалу од 17 задатака која градира постигнућа у различитим моторним вештинама оценом од нула (није у могућности), преко један (испуњава самостално, али уз модификацију) до два (испуњава задатак без компензације) (Слика 10). Сва тестирања спроведена су у Клиници за неурологију и психијатрију за децу и омладину током амбулантних посета од стране увек истог физиотерапеута.

Активност	2	1	0	Коментар
1. Стајање	Стоји усправно, мирно и симетрично, без компензације (са равним петама и неутралним ногама) минимум 3 секунде	Стоји мирно, али са одређеним степеном компензације (нпр. на прстима или са раширеним ногама ..) минимум 3 секунде	Не може да стоји мирно или самостално, потребна му је подршка (чак и минимална)	
2. Ход	Ходе прсти-пете, или равним стопалом	Упорно или уобичајено ходање на прстима, немогуће стално ходање пета-прсти	Губитак самосталног кретања – може користити ортозе или ходати кратко уз помоћ	
3. Устајање са столице	Држећи руке преклопљене, почетни положај кукова и колена од 90°, стопала на поду / ослоњена на степеницу	Уз помоћ бутина или гурање о столицу или окретање у положај пронације	Немогуће	
4. Стајање на једној ноzi, десној	Може да стоји опуштено (без фиксације) у трајању од 3 секунде	Стоји, али тренутно или треба доста фиксирања нпр. чврсто стегнута колена ..	Немогуће	
5. Стајање на једној ноzi, левој	Може да стоји опуштено (без фиксације) у трајању од 3 секунде	Стоји, али тренутно или треба доста фиксирања нпр. чврсто стегнута колена ..	Немогуће	
6. Пењање на степер, десно	Ка степеру, без подршке	Пење се бочно или му је потребна подршка	Немогуће	
7. Пењање на степер, лево	Ка степеру, без подршке	Пење се бочно или му је потребна подршка	Немогуће	
8. Силазак са степера, десно	Лицем напред, спушта се надоле контролишући ногу која носи тежину. Без подршке	Бочно, прескаче надоле, или је потребна подршка	Немогуће	
9. Силазак са степера, лево	Лицем напред, спушта се надоле контролишући ногу која носи тежину. Без подршке	Бочно, прескаче надоле, или је потребна помоћ	Немогуће	
10. Долазак у седећи положај	Почиње у супинарном положају – може користити једну руку за помоћ	Самопомоћ, нпр. вуче ноге, руке на глави..	Немогуће	
11. Устајање са пода	Из положаја супинације, без Gowers-овог маневра	Gowers-ов знак	(а) МОРА да користи спољњу помоћ (нпр. столицу) (б) Немогуће	Време (00.0s).....
12. Одизање главе	У лежећем положају, глава мора бити подигнута у средњој линији. Брада се помера ка грудим	Глава је подигнута али кроз бочну флексију или без савијања врата	Немогуће	
13. Стајање на петама	Обе ноге у исто време, јасно стојећи само на петама (прихватљиво је да се помери неколико корака за одржавање равнотеже) бројање до 3	Савија кук и подиже само предњи део стопала	Немогуће	
14. Скок	Обе ноге истовремено, одигнуте од подлоге истовремено	Једно стопало након другог (прескок)	Немогуће	
15. Скок десном ногом	Цело стопало одваја од пода	Савија колена и одиже пету, али не одваја цело стопало од пода	Немогуће	
16. Скок левом ногом	Цело стопало одваја од пода	Савија колена и одиже пету, али не одваја цело стопало од пода	Немогуће	
17. Трчање (10m)	Оба стопала од тла	'Duchenne jog'	Ходе	Време (00.0s).....
				УКУПНО = /34

Слика 10. North Star Ambulatory Assessment (NSAA)

3.3 Молекуларно генетичка дијагностика

Молекуларно генетичка испитивања спроведена су у Центру за хуману молекуларну генетику Биолошког факултета, Универзитета у Београду и лабораторији за медицинску генетику Института за здравствену заштиту мајке и детета “др Вукан Чупић”.

3.3.1 Одређивање мутација у *DMD* гену, одређивање изоформи дистрофина

Подаци о мутацији у *DMD* гену прикупљени су из доступне медицинске документације (историје болести и медицинског картона) оболелих. За оне болеснике код којих је овај податак недостајао или је генетичка анализа начињена у време када није било могуће испитати све егзоне *DMD* гена поновљена је/допуњена генетичка дијагностика.

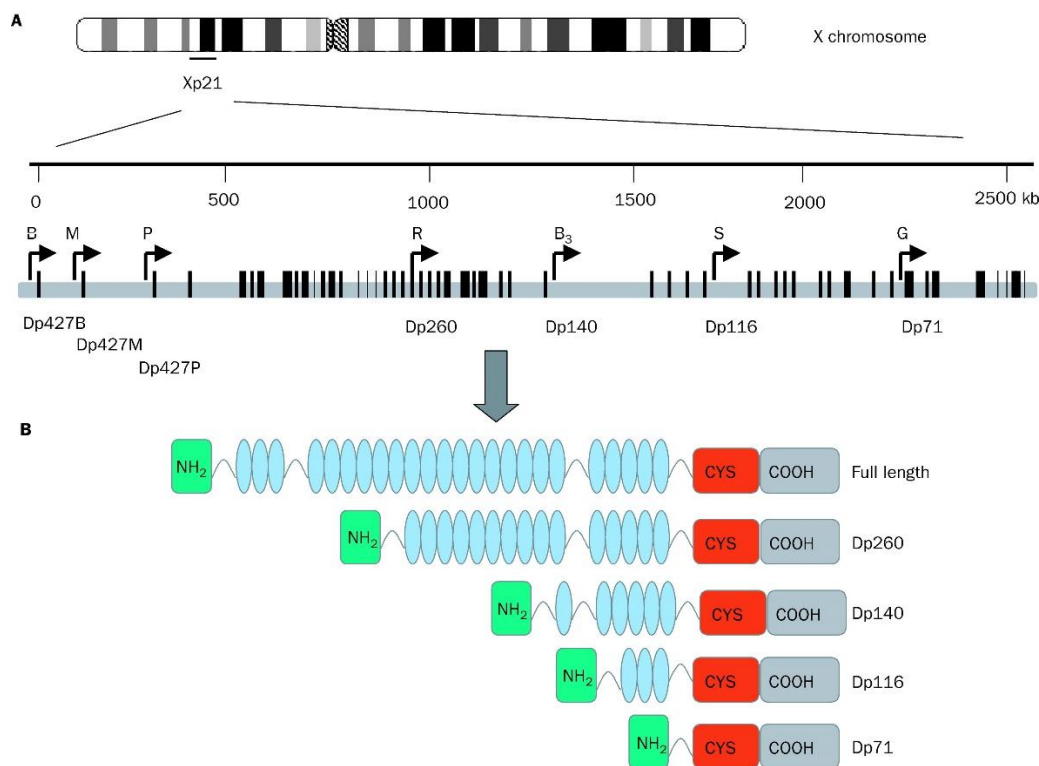
Умножавање већег броја лигираних проба, MLPA, је метода која омогућава брзо детектовање промена у броју копија (делеција или дупликација) до 50 различитих циљних секвенци молекула ДНК у једној реакцији (Schouten et al. 2002). Ова метода не умножава циљне секвенце ДНК, већ пробе које хибридују с њима. Свака MLPA проба састоји се од два олигонуклеотида, која хибридују са суседним циљним секвенцама на таквом растојању да између њих може да се одигра процес лигације. Лигацијом олигонуклеотида MLPA пробе (који су хибридували са суседним циљним секвенцама) формирају се успешно лигиране пробе које имају идентичне секвенце на 5' и 3' крајевима. Захваљујући овој особини омогућена је истовремена амплификација и до 50 различитих MLPA проба коришћењем само једног пара прајмера. Као резултат процеса амплификације лигираних MLPA проба, настају PCR производи јединствене дужине, односно комбинација јединствених, PCR-ом умножених фрагмената чији је опсег дужина од 64 до 500 бп. Умножени фрагменти се идентификују и квантификују фрагмент анализом. Пошто се само успешно лигиране пробе умножавају у реакцији PCR-а, амплификација дате пробе зависи од присуства њој комплементарне циљне ДНК. Осим тога, релативна количина продукта амплификације сваке пробе је мера релативне количине њене циљне секвенце у узорку. Како је MLPA релативна метода за квантификацију, сваки MLPA експеримент укључује и референтне узорке ДНК, при чему се очекује да они имају нормалан број копија секвенци ДНК од интереса. На тај начин, могуће је детектовати такве сигнале проба, који указују на делеције или дупликације циљних секвенци. У циљу добијања веродостојних резултата неопходно је да су узорци ДНК који се упоређују, изоловани из истог ткива и коришћењем исте методе.

За детекцију делеција и дупликација у гену *DMD* коришћене су две смеше проба које заједно садрже пробе за сваки од 79 егзона гена *DMD*.

Захваћене/недостајуће изоформе дистрофина одређене су на основу места мутације у *DMD* гену, који има седам промотора. Промотор, као нуклеотидна секвенца ДНК везује протеине који иницирају транскрипцију РНК која даље кодира протеин дистрофин, различите дужине мерене у kD. У зависности од места мутације различити промотори ће бити погођени те се различите изоформе дистрофина неће синтетисати. Код свих оболелих од ДМД недостаје најдужа/пуна изоформа дистрофина Dp427. Уколико се мутација налази низводно од егзона 29 *DMD* гена захваћена је и изоформа Dp260, уколико

се мутација налази дистално од интрона 44 захваћене су изоформе Dp260 и Dp140. Уколико се мутација налази низводно од егзона 55 захваћене су изоформе Dp260, Dp140 и Dp116. Уколико се мутација налази дистално од егзона 63 захваћене су изоформе Dp260, Dp140, Dp116 и Dp71 (Слика 11) (Sadoulet-Puccio et al. 1996, Muntoni et al. 2003).

На основу места мутације у *DMD* гену, оболели су подељени у две групе – „проксималну“ ако се мутација налази узводно од интрона 44 и утиче само на дуге изоформе дистрофина Dp427 и Dp260, и „дисталну“ ако мутација обухвата интрон 44 и регионе низводно од њега, утичући на дуже као и на једну или више краћих изоформи дистрофина (Dp140, Dp116, Dp71) (Bello, Angelo et al. 2020).



Слика 11. *А:* Геномска организација *DMD* гена. Црне вертикалне линије представљају 79 егзона гена за дистрофин. Стрелице показују различите промотере: посебно су промотори мозга (*B*), мишића (*M*) и Пуркиње (*P*); *R*, *B*, *S* и *G* представљају промоторе *Dp260*, *Dp140*, *Dp116* и *Dp71*. *Б:* Композиција домена различитих протеина дистрофина (*Dp*). Након аминокиселинског терминалног домена следе домен сличан спектрину, домен богат цистеином и карбокси-терминални домен. Преузето из рада Muntoni et al. 2003.

3.4 Генотипизација одабраних варијанти гена модификатора

Анализа генотипизације за варијанте rs28357094 у *SPP1* гену, rs2303729, rs1131620, rs1051303, rs10880 у *LTBP4* гену, и rs1883832 у *CD40* гену начињена је тестом алелне

дискриминације користећи одговарајуће TaqMan пробе C__1840809_10, C__22271866_10, C__8714829_10, C__8714838_20, C__2936821_1_ и C__11655919_20, редом (ThermoFisher Scientific, Сједињене Америчке државе).

PCR смеша садржала је 10-20 ng геномске ДНК, 1X FastGene® Probe One Step mix (Nippon Genetics Europe GmbH, Немачка), 0.25 μ M ROX боје (Nippon Genetics Europe GmbH, Немачка), 0,6 mg/ml BSA (New England Biolabs, Сједињене Америчке државе) и 0,6X одговарајућег TaqMan® SNP теста за генотипизацију. Реакција је спроведена у StepOnePlus™ Real-Time PCR систему (ThermoFisher Scientific, Сједињене Америчке државе) на следећем температурном профилу: 2 минута на 95°C, затим 40 циклуса од по 5 секунди на 95°C и 30 секунди на 60°C. Профил је такође укључивао кораке pre-PCR и post-PCR читања, оба начињена за по 30 секунди на 60°C. Флуоресценција је мерена помоћу StepOne Software v2.3. ROX боја је коришћена као пасивна интерна референца. Десет насумично одабраних узорака је анализирано у дупликату за сваки тест са 100% подударношћу.

3.5 Анализа утицаја варијанти гена модификатора на време губитка хода оболелих од ДМД и статистичка обрада података

Описана је фреквенца одређеног генотипа сва три испитана гена. Сагледан је ефекат варијанти три испитивана гена модификатора rs28357094 у *SPP1*, rs2303729, rs1131620, rs1051303, rs10880 у *LTBP4*, и rs1883832 у *CD40* гену, појединачно на клиничку прогресију болести, тачније на узраст у време губитка хода.

Анализиране варијанте тестиране су на Hardy Weinberg еквилибријум помоћу Hardy Weinberg пакета у R. Анализе преживљавања спроведене су како би се испитао утицај различитих фактора (КС терапија, генотипови одабраних варијанти и локализација мутације у *DMD* гену) на узраст губитка хода, док су покретни болесници били цензурисани. Да би се проценио ефекат једног фактора на време губитка хода, процењен је средњи узраст губитка хода и упоређен између различитих група оболелих од ДМД користећи Kaplan-Meier-ове криве и log-rank тест.

За варијанте *SPP1* и *CD40*, коришћен је доминантни модел за одговарајуће ређе алеле, као што је претходно описано (Pegoraro et al. 2011, Bello et al 2016). *LTBP4* варијанте нису разматране одвојено. Уместо тога, хаплотипови су реконструисани коришћењем haplo.stats пакета у R. Поред најчешћих хаплотипова (референтни VTTT и алтернативни IAAM), сви остали хаплотипови су имали појединачне фреквенције на или испод 10% и груписани су заједно као једна категорија у анализи, која је означена као Друго. За хаплотипове *LTBP4*, разматран је рецесивни и доминантни модел за IAAM хаплотип (Flanigan et al. 2013).

Да би се истовремено проценио ефекат испитиваних варијабли на узраст губитка хода и обезбедила јачина ефекта за сваку појединачну варијаблу, урађена је мултиваријантна Cox регресиона анализа. Зависна варијабла је била узраст у време губитка хода, док су КС терапија, локализација мутације у *DMD* гену и генотипови испитиваних гена, према доминантном моделу, били коваријанте. Додатна Cox регресиона

анализа је извршена са истим коваријантама, али укључујући две интеракције – једану између КС терапије и генотипова испитиваних гена, а другу између КС терапије и локализације мутације у *DMD* гену .

Даље, урађена је кластер анализа којом је процењен удружени утицај гена модификатора на ток болести. За ову анализу покретни болесници су били цензурисани.

Да би се откриле категорије оболелих које би додатно могле да објасне варијабилност у прогресији болести, извршена је кластер анализа. Кластер анализа, која је облик машинског учења без надзора, представља скуп мултиваријатних статистичких алата и алгоритама дизајнираних да открију обрасце у сложеним подацима и организују информације у релативно хомогене групе (Everitt et al. 2011). За разлику од метода класичне статистике које обезбеђују узрочну везу између датих варијабли, груписање је више усмерено на описивање података кроз откривање образаца и правилности (Bzdok et al. 2018).

Кластер анализа је урађена на 64 оболела који су изгубили способност кретања. Коришћене варијабли су кодирани у бинарним терминима ради једноставности. *SPP1* и *CD40* варијанте, као и *LTBP4* хаплотип су кодирани према доминантном моделу. Узраст у време губитка хода је трансформисан у бинарни формат у односу на средњи узраст губитка хода, тако да су узрасти испод и изнад 10,75 година кодирани као нуле, односно јединице. Овај праг је изабран на основу сличних вредности медијане и средње вредности узраста у време губитка хода свих 64 одабрана оболела (10,75 година и 10,78 година). Локација мутације у *DMD* гену је била кодирана као проксимална или дистална, док КС терапија није укључена због пристрасности према употреби КС (приближно 70% болесника, 45 оболела од 64 анализирана, је примало КС терапију). Недостајуће вредности су импутиране коришћењем стратегије „најчешће“, где се свака вредност која недостаје замењује начином дистрибуције варијабли. Оптималан број кластера је процењен коришћењем Elbow-ове методе и Ward-овог дендрограма везе.

Примењен је хијерархијски алгоритам кластерованања јер се сматра да добро функционише на малим скуповима података, не захтева претходно познавање броја кластера и резултати су лако поновљиви, пошто не укључује насумичне компоненте (R CoreTeam, 2022).

Евалуација груписања је процењена кроз знање о домену као и интерним индексима валидације: С-Н (Calinski-Harabasz) индекс, Dunn's index (DI), Davies-Bouldin (DB) индекс, Silhouette index (SI) и SDbw validity индекс (S_Dbw). За поређење категоријских варијабли (пропорција референтних vs. варијантних генотипова/хаплотипова из одговарајућих доминантних модела, пропорција проксималних наспрам дисталних мутација) између добијених кластера коришћен је Fisher-ов егзактни тест независности.

Да би се упоредио узраст у време губитка хода између добијених кластера, примењен је Wilcoxon-Mann-Whitney тест, након тестирања нормалности података помоћу Shapiro-Wilk теста. Анализа и евалуација груписања обављени су у Python3 (3.9.0). Статистичке анализе су обављене у R ver 4.0.4 (R Core Team, 2020). Двострана р-вредност на 0,05 се сматрала значајном у свим тестовима.

3.6 Процена утицаја гена модификатора на моторна постигнућа у групи покретних болесника

Ову групу чинило је 20 оболелих од ДМД, покретних, којима је начињена генотипизација варијанти три испитивана гена модификатора ДМД - rs28357094 у *SPP1* гену, хаплотипа - rs2303729, rs1131620, rs1051303, rs10880 у *LTBP4* гену, и rs1883832 у *CD40* гену.

Сагледана је фреквенца одређеног генотипа сва три испитана гена. Болесници су према генотипу даље подељени у две групе у односу на генотип испитиване варијанте и праћени 12 месеци. На почетку праћења начињена је процена моторних постигнућа применом две скале: 6 минутни тест хода и NSAA теста у Клиници за неурологију и психијатрију за децу и омладину. Тестирање је поновљено након 12 месеци и сагледан утицај варијанти гена на исход постигнућа мерен наведеним тестовима. Употребљене су методе дескриптивне статистике. Нормалности расподела добијених вредности NSAA и 6. минутног теста хода проверене су помоћу Kolmogorov-Smirnov теста. Коришћен је упарени Т тест за зависне узорке при поређењу вредности функционалних тестова добијених на почетку праћења и 12 месеци касније за све подгрупе оболелих дефинисане према генотипу *SPP1*, *CD40* и хаплотипу *LTBP4* гена. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација (СД).

4. РЕЗУЛТАТИ:

4.1 Клиничке карактеристике оболелих од ДМД

Укупно је одабрано 99 оболелих од ДМД, мушког пола. Четири оболела од ДМД искључена су из истраживања због делеције егзона 3 до 7 или делеције егзона 45 у *DMD* гену. Два оболела са делецијом егзона 45 у *DMD* гену изгубила су могућност хода са 10 и 13 година и нису користили КС терапију. Преостала два болесника са делецијом егзона 3 до 7 у *DMD* гену су у време истраживања били покретни, користили КС терапију, и били узраста 7 и 12 година.

У овој студији учествовало је 95 оболелих од ДМД. Средњи узраст оболелих био је $15,8 \pm 7,2$ година. Међу њима, 64 (67,4%; средњи узраст $18,7 \pm 7,1$ година) је било зависно од инвалидских колица, а 31 (32,6%; средњи узраст $10 \pm 2,2$ година) оболели је био покретан, од којих је 20 било проспективно праћено у периоду од годину дана.

КС терапија је примењивана код 73 болесника (76,84%). Оболели од ДМД који су користили КС терапију изгубили су способност самосталног хода у средњем узрасту од 11,14 година, док су болесници који нису користили КС терапију губили могућност хода у средњем узрасту од 9,95 година. Ова разлика је била статистички значајна ($p=0,021$) (Табела 1, Слика 14), што потврђује заштитни ефекат КС терапије на моторна постигнућа оболелих од ДМД, а самим тим и на прогресију обољења.

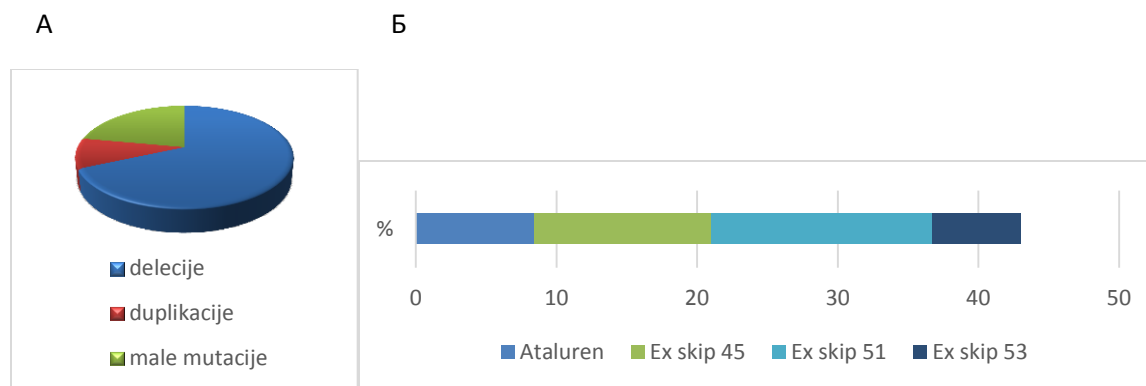
4.2 Мутације у *DMD* гену, изоформе дистрофина и утицај на прогресију болести

Спектар мутација у *DMD* гену је био следећи: делеције су откривене код 65 оболелих (68,4%), дупликације код 9 (9,5%) и мале мутације код 21 болесника (22,1%) (Слика 12).

Мутације су биле „проксималне“ код 40 болесника (42,1%) и „дисталне“ код 55 оболела од ДМД (57,9%). Што значи да су код 42,1% оболелих биле захваћене само дуге изоформе дистрофина и то Dp427 и Dp260, док су код 57,9% болесника биле захваћене и краће изоформе Dp140, Dp116, Dp71 и Dp40.

За терапију прескакања/искрајања егзона у нашој групи било је укупно подобно 34,6% оболелих. За искрајање егзона 45 - 12,6%, егзона 51 - 15,7% и егзона 53 у *DMD* гену 6,3% (Слика 12).

За терапију Аталуреном, према типу мутације, било је подобно 8,4% оболелих.



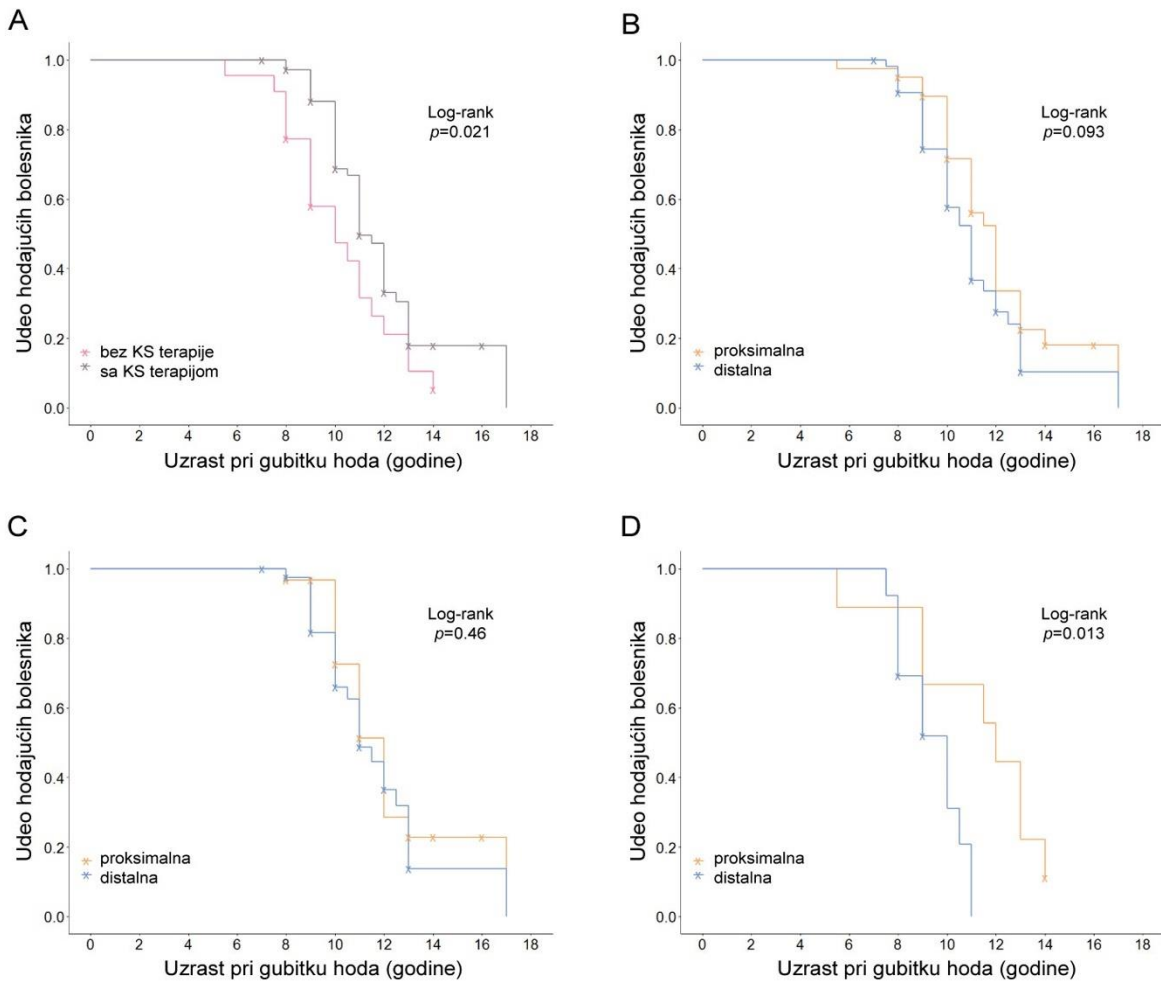
Слика 12. А - приказ типова мутација у *DMD* гену; **Б** - проценат оболелих подобних за поједине каузалне терапије Дишенове мишићне дистрофије.

Средња вредност узраста у време губитка хода код оболелих који имају „проксималне“ мутације у *DMD* гену, којих је било 26, била је 11,08 година, а оболелих са „дисталним“ мутацијама, којих је било 38, била је 10,59 година, чиме је уочен статистички тренд ($p=0,093$) (Табела 1, Слика 13). Ово заправо говори да оболели са мутацијама у *DMD* гену које су захватале дуже изоформе дистрофина као што су Dp427 и Dp260 су губили способност кретања у каснијем узрасту у односу на оболеле код којих су биле захваћене и краће изоформе дистрофина – Dp140, Dp116, Dp71 и/или Dp40.

Табела 1. Средњи узраст у време губитка хода код оболелих од Дишенове мишићне дистрофије, стратификован терапијом кортикостероидима (КС) и локализацијом мутације у *DMD* гену.

	КС терапија	Број (догађај)	Средњи узраст губитка хода године (95% CI)	KM Long-Rank p
	Да	73 (45)	11,14 (10,52-11,76)	0,021
	Не	22 (19)	9,95 (8,90-11,0)	
<i>DMD</i> локализација мутације				
Проксимална	/	40 (26)	11,08 (10,21-11,95)	0,093
Дистална		55 (38)	10,59 (9,88-11,30)	
Проксимална	Да	31 (18)	11,17 (10,25-12,09)	0,46
Дистална		42 (27)	11,13 (10,24-12,02)	
Проксимална	Не	9 (8)	10,88 (8,51-13,25)	0,013
Дистална		13 (11)	9,27 (8,40-10,14)	

Када се посматрају само оболели који користе КС терапију, није било разлике у средњој вредности узраста у време губитка хода између оних са „проксималним“ и „дисталним“ мутацијама ($p=0,46$). Оболелих са проксималним мутацијама у *DMD* гену који су користили КС терапију било је 31. Од овог броја 18 болесника је изгубило способност самосталног хода у просечном узрасту од 11,17 година. Болесника са дисталним мутацијама у *DMD* гену који су користили КС терапију било је 42. Од овог броја 27 болесника је изгубило способност самосталног хода у просечном узрасту од 11,13 година (Табела 1, Слика 13).



Слика 13. Kaplan-Meier дијаграми који показују ефекат КС терапије и локализације мутације на узраст у време губитка хода за 95 оболела од Дишенове мишићне дистрофије. **А** - Две линије преживљавања представљају оболеле од ДМД стратификоване терапијом КС, где су лечени болесници касније губили могућност хода у поређењу са нелеченим болесницима. **Б** - Две линије преживљавања представљају болеснике стратификоване по локализацији мутације у *DMD* гену, где су оболели са проксималном локализацијом показали тренд каснијег губитка хода у поређењу са

болесницима са дисталном локализацијом. Ефекат локализације мутације није био значајан код Ц - болесника који су користили КС терапију, док је код Д - болесника без КС терапије проксимална локализација показала заштитни ефекат. Log-rank тест је коришћен за поређење различитих Kaplan-Meier кривих и одговарајуће р-вредности су приказане у горњем десном углу свих дијаграма. Цензурисани болесници су означени са „х“ на линијама преживљавања.

Међутим, у групи оболелих код којих није примењена КС терапија, они са „дисталним“ мутацијама у *DMD* гену изгубили су кретање раније, ова разлика је достигла статистичку значајност ($p=0,013$). Оболелих са дисталним мутацијама у *DMD* гену који нису користили КС терапију било је 13. Од овог броја 11 болесника је изгубило способност самосталног хода у просечном узрасту од 9,27 година. Болесника са проксималним мутацијама у *DMD* гену који нису користили КС терапију било је девет. Од овог броја осам болесника је изгубило способност самосталног хода у просечном узрасту од 10,88 година (Табела 1, Слика 13). Сходно наведеном, оболели са захваћеним и краћим изоформама дистрофина - Dp140, Dp116, Dp71 и/или Dp40, који нису користили КС терапију губили су способност кретања значајно раније од оних код којих су, по локализацији мутације у *DMD* гену, биле захваћене само дуже форме дистрофина Dp427 и/или Dp260.

4.3 Учесталости алела одабраних варијанти гена *SPPI*, *LTBP4* и *CD40*

Све тестиране варијанте нису показале одступања од Hardy Weinberg-ове равнотеже (варијанта *SPPI* гена rs28357094 $p=0.82$; варијанта *CD40* гена rs1883832 $p=0.52$; хаплотип *LTBP4* гена rs2303729 $p=0.92$; rs1131620 $p=0.86$; rs1051303 $p=0.86$; rs10880 $p=0.85$).

Учесталост ређих алела за анализиране варијанте била је у складу са уоченом учесталосту за европску (нефинску) популацију из базе података генома gnomAD r3.0.

Изузетак је био ређи алел за *CD40* rs1883832, који показује фреквенцију од 0,33 у поређењу са 0,276 у бази података генома gnomAD r3.0.

4.4 Повезаност варијанти гена *SPPI*, *LTBP4* и *CD40* са клиничком прогресијом болести (време губитка хода) и употребом КС терапије

4.4.1 Варијанта гена *SPPI*

Из наше кохорте, 93 оболела су успешно генотипизована за *SPPI* rs28357094. ТТ генотип је детектован код 55, а TG и GG генотипови код 38 оболела од ДМД.

Начињена је стратификација непокретних болесника, којих је било 62, према доминантном моделу за ређи G алел rs28357094 *SPPI* гена. Болесници са ТТ генотипом, којих је било 36, изгубили су способност самосталног кретања у средњем узрасту од 10,94

година, са 95% индексом поверења од 10,23 до 11,65. Болесници са TG и GG генотиповима, којих је било 26, изгубили су покретљивост у средњем узрасту од 10,62 године, са 95% индексом поверења од 9,68 до 11,56 (Табела 2, Слика 14А).

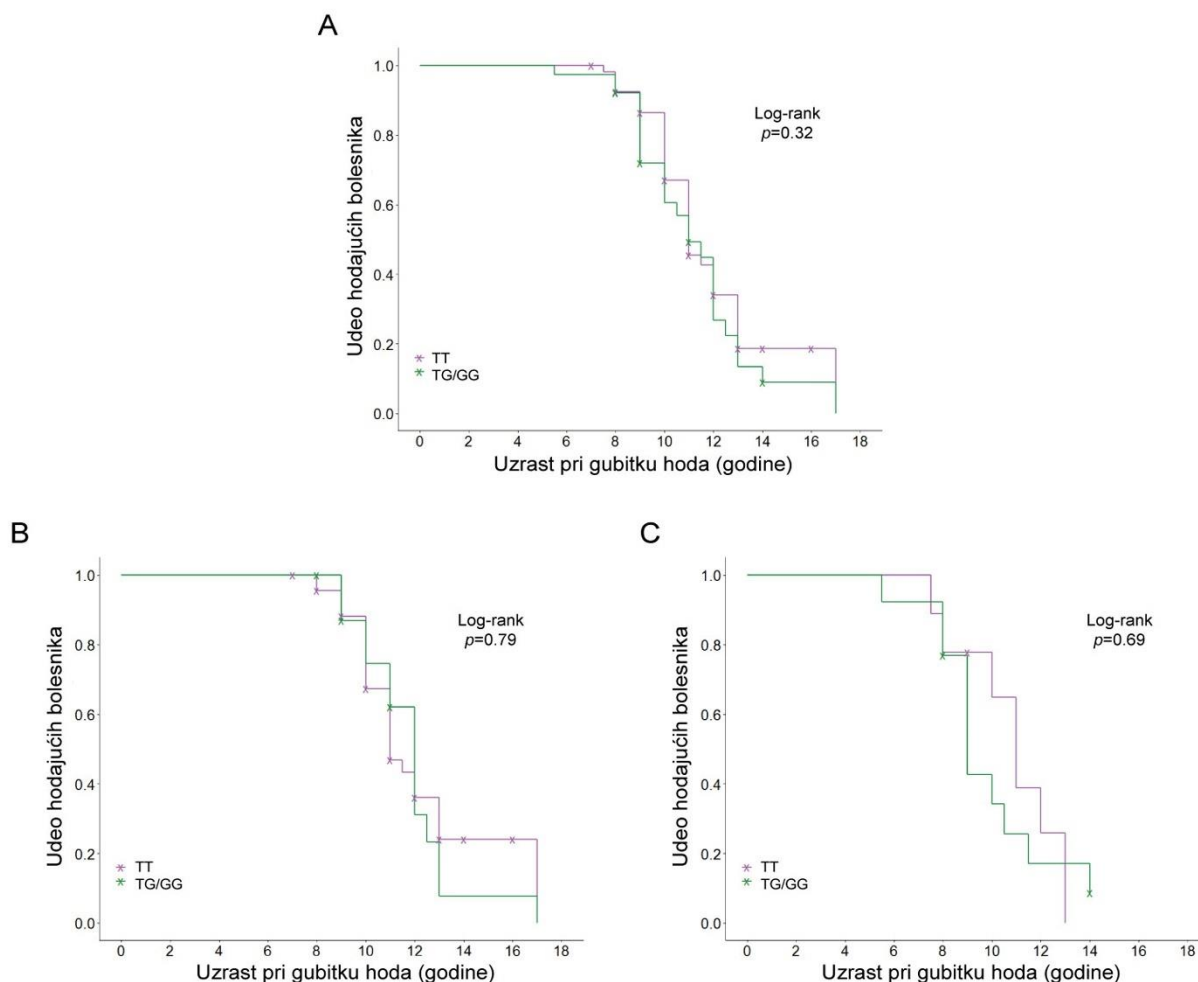
Табела 2. Средњи узраст у време губитка хода код оболелих од Дишенове мишићне дистрофије, стратификован терапијом кортикостероидима (КС) и генотиповима *SPP1*.

	КС терапија	Број (догађај)	Средњи узраст губитка хода године (95% CI)	KM Long- Rank p
<i>SPP1</i> (rs28357094)		93 (62)		
TT	/	55 (36)	10,94 (10,23-11,65)	0,32
TG + GG		38 (26)	10,62 (9,68-11,56)	
TT	Да	46 (28)	11,02 (10,19-11,85)	0,79
TG + GG		25 (15)	11,50 (10,35-12,65)	
TT	Не	9 (8)	10,69 (8,95-12,43)	0,69
TG + GG		13 (11)	9,41 (7,95-10,87)	

Иако су болесници носиоци ређег G алела у rs28357094 *SPP1* гена нешто раније губили способност самосталног кретања, овим поређењем није достигнута статистичка значајност на нивоу целе групе испитаника ($p=0,32$).

У групи у којој су оболели користили КС терапију укупно је 43 изгубило способност кретања. Болесници са TT генотипом, којих је било 28, изгубили су способност самосталног кретања у средњем узрасту од 11,02 године. Болесници са TG и GG генотиповима, њих 15, изгубили су покретљивост у средњем узрасту од 11,5 године. У групи у којој оболели нису користили КС терапију укупно је 19 изгубило способност самосталног хода. Болесници са TT генотипом, којих је било 8, изгубили су способност самосталног кретања у средњем узрасту од 10,69 године. Болесници са TG и GG генотиповима, њих 11, изгубило је могућност кретања у средњем узрасту од 9,41 године.

Испитани *SPP1* генотипови нису имали утицаја на време губитка способности самосталног кретања ни у групи лечених болесника КС терапијом ($p=0,79$) као ни у групи нелечених ($p=0,69$) (Табела 2, Слика 14Б и 14Ц).



Слика 14. Карпан–Мејер графикони који показују ефекат *rs28357094* у гену *SPP1* на узраст у време губитка хода за 93 болесника са Дишеновом мишићном дистрофијом. **А** - Две линије преживљавања представљају оболеле од ДМД стратификоване по *SPP1* генотиповима према доминантном моделу (ТТ и ТГ/ГГ). Болесници хетерозиготни или хомозиготни за ређи *G* алел нису показали разлику у узрасту у време губитка хода у поређењу са болесницима хомозиготним за *T* алел. Ефекат *SPP1* генотипа није био значајан ни код **Б** - лечених КС терапијом, нити **Ц** - код нелечених болесника. *Log-rank* тест је коришћен за поређење различитих Карпан-Мејер кривих и одговарајуће *p*-вредности су приказане у горњем десном углу свих дијаграма. Цензурисани болесници су означени са „x“ на линијама преживљавања.

4.4.2 Варијанта гена *CD40*

CD40 *rs1883832* је генотипизован код свих 95 оболелих од ДМД. Чetrдесет оболелих је имало СС генотип, а 55 оболела је имало СТ или ТТ генотипове.

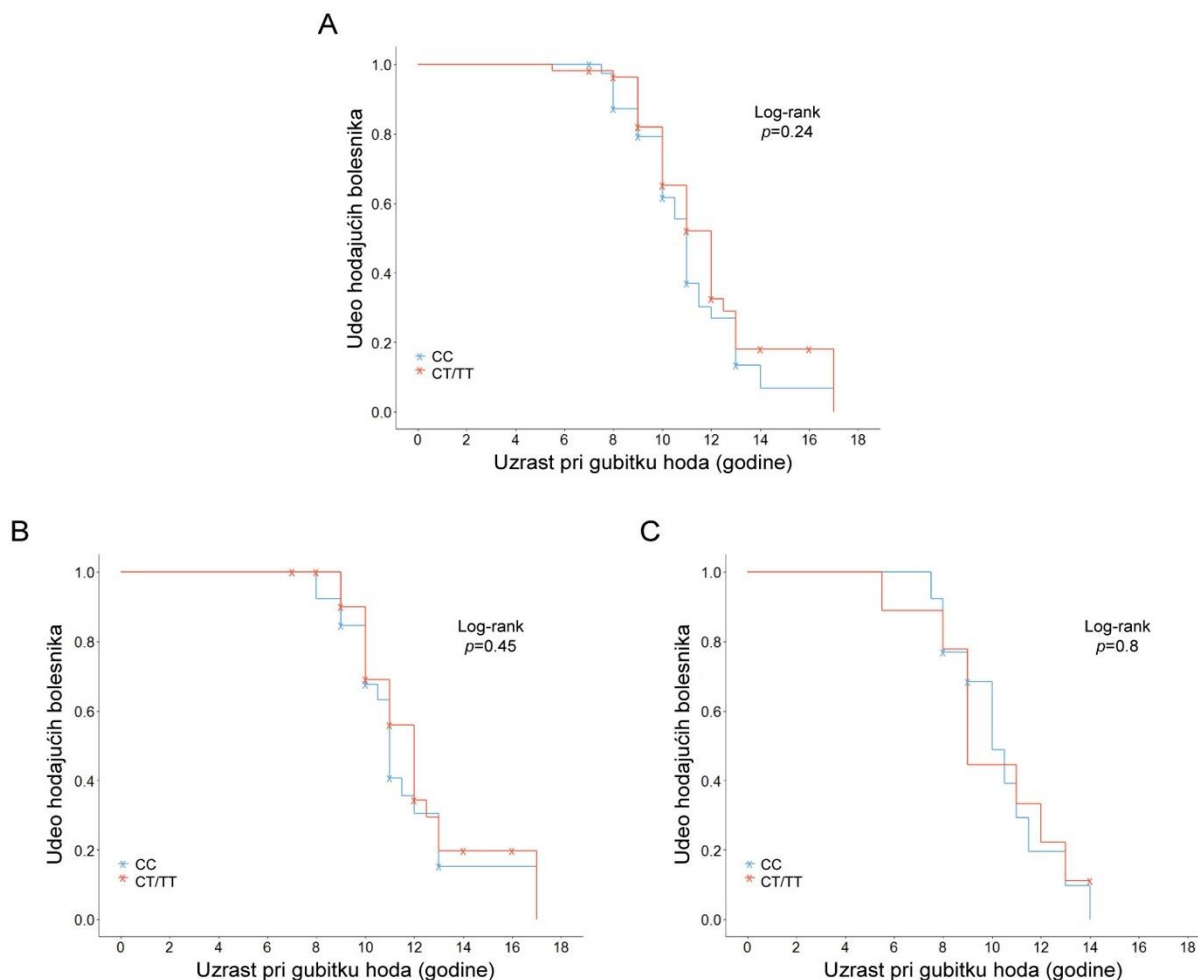
Непокретни болесници, којих је било 64, су стратификовани према доминантном моделу за ређи алел Т. Средња вредност узраста у време губитка способности хода код болесника са СС генотипом износила је 10,69 година, док је код болесника са СТ и ТТ генотиповима била 10,88 година ($p=0,24$) (Табела 3, Слика 15А).

У групи у којој су оболели користили КС терапију укупно је 45 изгубило способност кретања. Болесници са СС генотипом, којих је било 20, изгубили су способност самосталног кретања у средњем узрасту од 10,95 године. Болесници са СТ и ТТ генотипом, њих 11, изгубили су покретљивост у средњем узрасту од 11,3 године. У групи у којој оболели нису користили КС терапију укупно је 19 изгубило способност самосталног хода. Болесници са СС генотипом, којих је било 11, изгубили су способност самосталног кретања у средњем узрасту од 10,23 године. Болесници са СТ и ТТ генотиповима, њих осам, изгубило је могућност кретања у средњем узрасту од 9,56 године.

Табела 3. Средњи узраст у време губитка хода код оболелих од Дишенове мишићне дистрофије, стратификован терапијом кортикостероидима (КС) и генотиповима *CD40*.

	КС терапија	Број (догађај)	Средњи узраст губитка хода године (95% CI)	KM Long- Rank p
<i>CD40</i> (rs1883832)		95 (64)		
СС	/	40 (31)	10,69 (9,94-11,44)	0,24
СТ + ТТ		55 (33)	10,88 (10,07-11,69)	
СС	Да	27 (20)	10,95 (9,99-11,91)	0,45
СТ + ТТ		46 (25)	11,3 (10,42-12,18)	
СС	Не	13 (11)	10,23 (8,83-11,63)	0,80
СТ + ТТ		9 (8)	9,56 (7,57-11,55)	

Слично генотипу *SPP1*, испитивани генотипови *CD40* нису имали утицаја на време губитка способности самосталног хода када се разматрају ни у групи лечених болесника КС терапијом ($p=0,45$) нити у групи нелечених ($p=0,80$) (Табела 3, Слика 15Б и 15Ц).

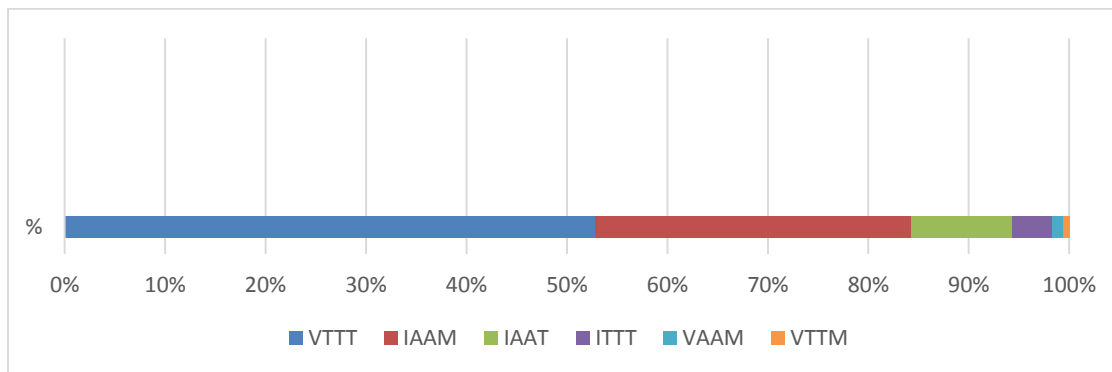


Слика 15. *Kaplan-Meier* графикони који показују ефекат *rs1883832* у гену *CD40* на узраст у време губитка хода за 95 болесника са Дишеновом мишићном дистрофијом. **A** - Две линије преживљавања представљају оболеле од ДМД стратификоване по *CD40* генотиповима према доминантном моделу (CC и CT/TT). Болесници хетерозиготни или хомозиготни за мањи T алел нису показали разлику у узрасту у време губитка хода у поређењу са болесницима хомозиготним за C алел. Ефекат генотипа *CD40* није био значајан ни код **B** лечених КС, нити **Ц** код болесника који нису лечени КС терапијом. Лог-ранг тест је коришћен за поређење различитих Каплан-Меиерових кривих и одговарајуће *p*-вредности су приказане у горњем десном углу свих дијаграма. Цензурисани болесници су означени са „x“ на линијама преживљавања.

4.4.3 Хаплотип гена *LTP4*

LTP4 хаплотип *rs2303729-rs1131620-rs1051303-rs10880* је реконструисан код 89 болесника.

Расподела учесталости посматраних хаплотипова била је следећа: VTTT 52,8%, IAAM 31,5%, IAAT 10,1%, ITTT 3,9%, VAAM 1,1% и VTTM 0,6% (Слика 16).



Слика 16. Расподела учесталости *LTP4* хаплотипова

Анализиран је ефекат IAAM хаплотипа код 58 непокретних болесника користећи доминантне и рецесивне моделе (Слике 17. и 18).

Болесника без IAAM хаплотипа је укупно било 41, од којих је 27 изгубило могућност кретања у средњем узрасту од 10,39 година. Од болесника са најмање једним IAAM хаплотипом, којих је било 48, њих 31 је изгубило способност самосталног хода у средњем узрасту од 10,69 година (Табела 4, Слика 17А).

Оболели носиоци најмање једног IAAM хаплотипа *LTP4* гена нешто касније су губили способност самосталног кретања, али свакако без статистичке значајности на нивоу целе групе испитаника ($p=0,61$).

Укупно је идентификовано 8 оболелих од ДМД који су били хомозиготни за IAAM хаплотип, од којих је пет изгубило способност кретања у средњем узрасту од 11,5 година. Оболелих са свим осталим комбинацијама испитиваног хаплотипова било је укупно 81, од којих је 53 изгубило покретљивост у просечном узрасту од 10,46 година. Ово поређење није било статистички значајно ($p=0,29$) (Табела 4).

Није било разлике у средњем узрасту у време губитка хода приликом стратификације болесника према IAAM хаплотипу и КС третману (Табела 4, Слика 17Б и 17Ц).

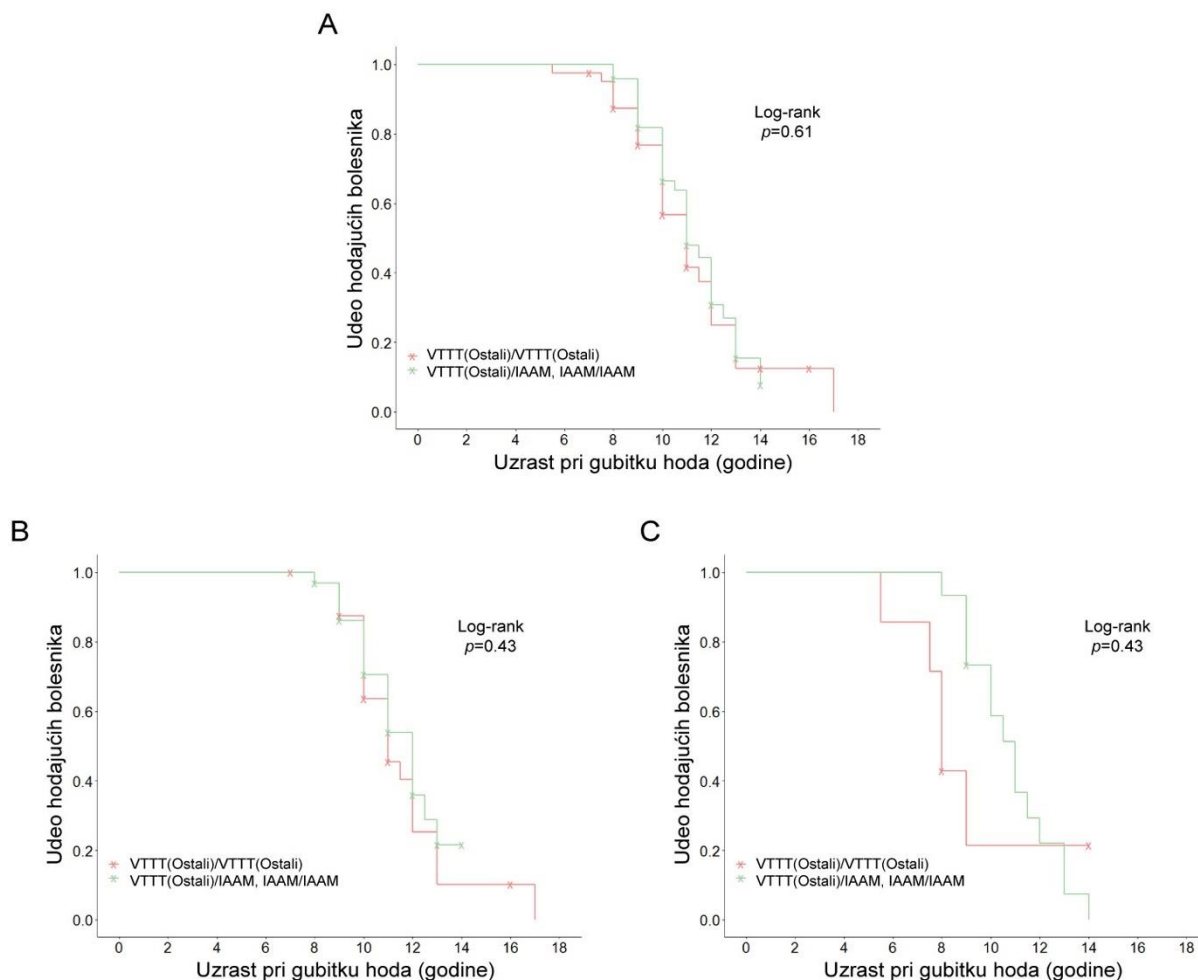
У групи оболелих који су користили КС терапију, код болесника без IAAM хаплотипа, којих је био 34, њих 22 је изгубило могућност кретања у средњем узрасту од 11,02 година. Код болесника са најмање једним IAAM хаплотипом и КС терапијом, којих је било 33, њих 17 је изгубило могућност кретања у средњем узрасту од 10,62 година. У групи оболелих који нису користили КС терапију, забележена је највећа разлика у узрасту у време губитка хода у корист оболелих са макар једним IAAM хаплотипом, али ипак без достизања статистичке значајности ($p=0,43$). Наиме, код болесника без IAAM хаплотипа,

којих је био седам, њих пет је изгубило могућност кретања у средњем узрасту од 7,6 година. Код болесника са најмање једним IAAM хаплотипом и без КС терапије, којих је било 15, њих 14 је изгубило могућност кретања у средњем узрасту од 10,76 година.

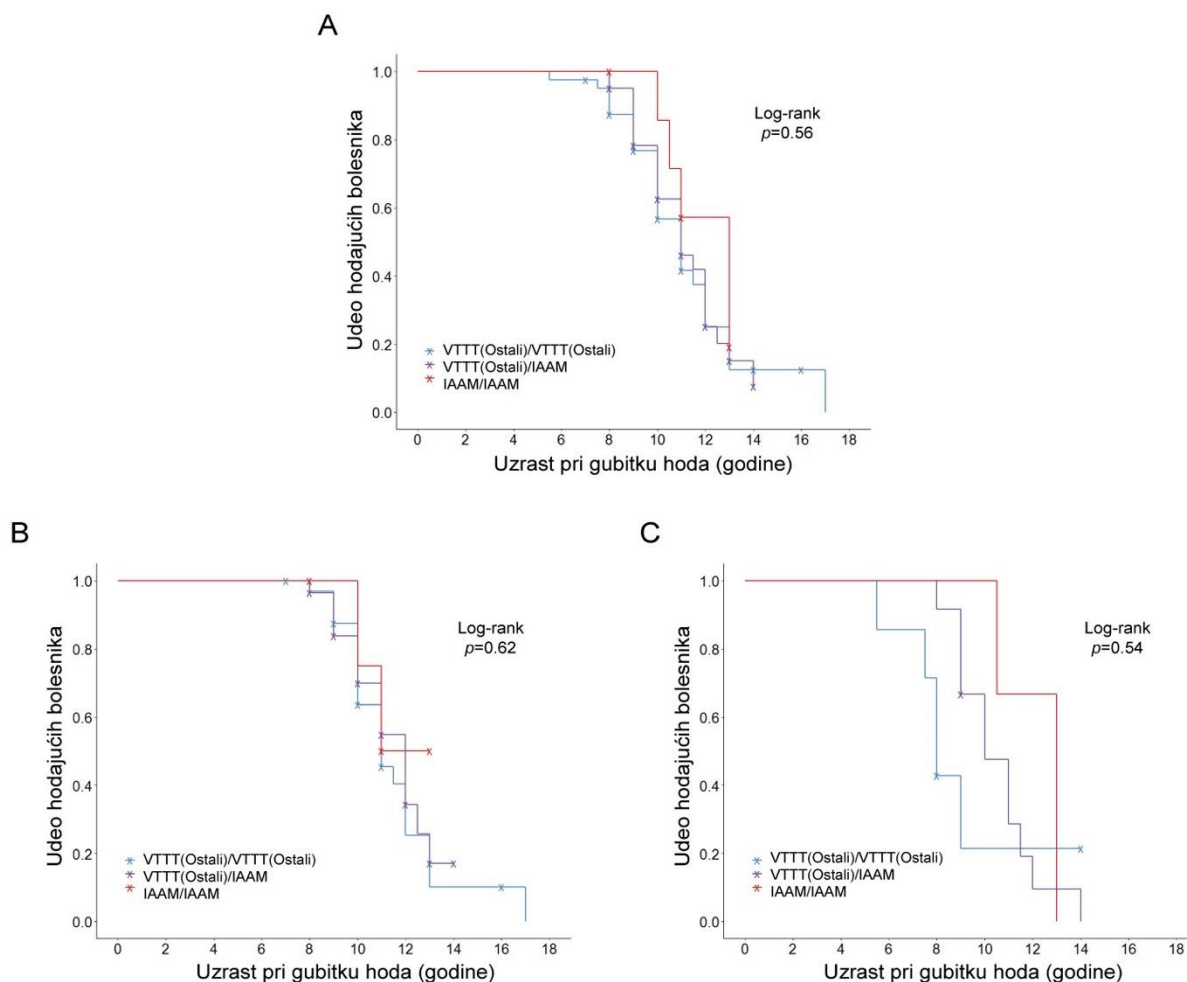
У групи оболелих који су користили КС терапију, код болесника са макар једним IAAM хаплотипом, којих је био 62, њих 37 је изгубило могућност кретања у средњем узрасту од 10,86 година. Код болесника хомозиготних за IAAM хаплотип и КС терапијом, којих је било пет, двоје је изгубило могућност кретања у средњем узрасту од 10,5 година ($p=0,43$). У групи оболелих који нису користили КС терапију, са макар једним IAAM хаплотипом, којих је био 19, њих 16 је изгубило могућност кретања у средњем узрасту од 9,53 година. Код болесника хомозиготних за IAAM хаплотип и без КС терапије, којих је било три, сва тројица су изгубила могућност кретања у средњем узрасту од 12,17 година. Ни ово поређење није досегло статистичку значајност ($p=0,34$).

Табела 4. Средњи узраст у време губитка хода код оболелих од Дишенове мишићне дистрофије, стратификован терапијом кортикостероидима (КС) и хаплотиповима *LTBP4*.

	КС терапија	Број (догађај)	Средњи узраст губитка хода године (95% CI)	KM Long- Rank p
<i>LTBP4</i> (хаплотип)		89 (58)		
Друго/Друго		41 (27)	10,39 (9,50-11,28)	0,61
Друго/IAAM + IAAM/IAAM	/	48 (31)	10,69 (10,12-11,26)	
Друго/Друго		34 (22)	11,02 (10,16-11,88)	0,43
Друго/IAAM + IAAM/IAAM	Да	33 (17)	10,62 (9,9-11,34)	
Друго/Друго		7 (5)	7,60 (5,99-9,21)	0,43
Друго /IAAM + IAAM/IAAM	Не	15 (14)	10,79 (9,77-11,81)	
Друго /Друго + Друго/IAAM	/	81 (53)	10,46 (9,93-10,99)	0,29
IAAM/IAAM		8 (5)	11,5 (9,74-13,26)	
Друго/Друго + Друго/IAAM	Да	62 (37)	10,86 (10,27-11,45)	0,43
IAAM/IAAM		5 (2)	10,5 (4,15-16,85)	
Друго/Друго + Друго/IAAM	Не	19 (16)	9,53 (8,44-10,62)	0,34
IAAM/IAAM		3 (3)	12,17 (8,58-15,76)	



Слика 17. Карпан-Мејер дијаграми који показују ефекат IAAM хаплотипа у LTBP4 гену (доминантни модел) на узраст у време губитка хода за 89 оболела од Дишенове мишићне дистрофије. **A** - Оболели од ДМД хетерозиготни или хомозиготни за IAAM хаплотип нису показали никакву разлику у узрасту у време губитка хода у поређењу са болесницима који носе друге хаплотипове. Ефекат LTBP4 хаплотипа IAAM није био значајан ни код **B** лечених КС, нити **Ц** код пацијената који нису лечени КС. Log-rank тест је коришћен за поређење различитих Карпан-Мејер кривих и одговарајуће p -вредности су приказане у горњем десном углу свих дијаграма. Цензурисани болесници су означени са „x“ на линијама преживљавања.



Слика 18. Карпан-Мејер графикаони који показују ефекат IAAM хаплотипа у гену LTBP4 (рецесивни модел) на узраст у време губитка хода за 89 оболела од Дишенове мишићне дистрофије. **A** - Оболели од ДМД хомозиготни за IAAM хаплотип нису показали никакву разлику у узрасту у време губитка хода у поређењу са болесницима хетерозиготним за IAAM или који су носили било који други хаплотип. Ефекат LTBP4 хаплотипа IAAM није био значајан ни код **B** лечених КС, нити **Ц** код болесника који нису лечени КС. Log-rank тест је коришћен за поређење различитих Карпан-Мејер кривих и одговарајуће p -вредности су приказане у горњем десном углу свих дијаграма. Цензурисани болесници су означени са „x“ на линијама преживљавања.

4.4.4 Мултиваријантни Соx регресиони модел

Конструисан је мултиваријантни Соx регресиони модел са узрастом у време губитка хода као променљивом исхода и КС терапијом, локализацијом мутације у *DMD*

гену, *SPP1* генотипом, *CD40* генотипом и *LTBP4* хаплотипом као коваријантама (Табела 5).

Кортикостероидна терапија је показала протективни ефекат (HR=0,44, p=0,01), док је дистална локализација мутације у *DMD* гену значајно повећала ризик од ранијег губитка хода (HR=1,92, p=0,03).

Није било значајних ефеката *SPP1* варијанте (HR=1,03, p=0,9), *CD40* варијанте (HR=0,86, p=0,59) и *LTBP4* хаплотипа на узраст у време губитка хода (HR=0,72, p=0,25). Укупни модел је показао тренд ка значајности (p=0,068, конкорданца=0,64).

Табела 5. Утицај кортикостероидне (КС) терапије, локализације мутације у *DMD* гену и *SPP1*, *CD40* и *LTBP4* гена на узраст у време губитка хода.

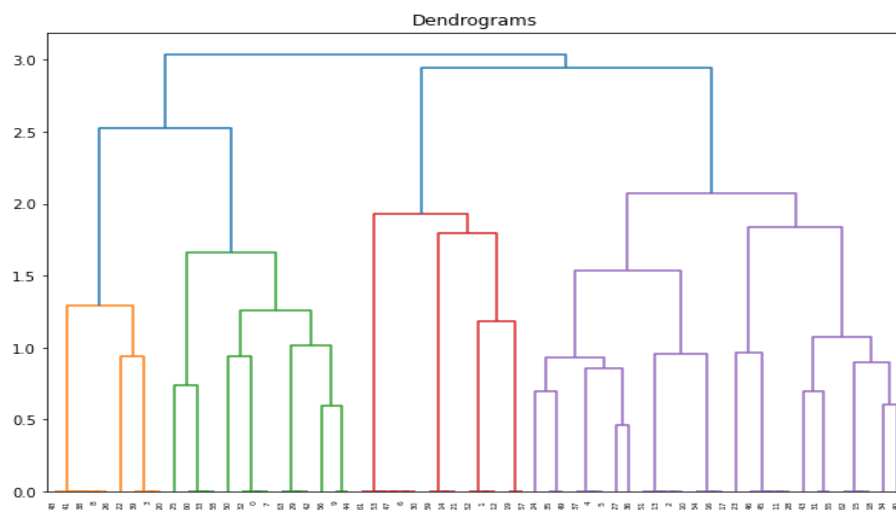
	N (догађај)	HR (95% CI)	Z скор	P вредност	Сох P вредност
КС терапија					0,068*
без терапије	22 (19)	1			
са терапијом	73 (45)	0,44 (0,23-0,83)	-2,51	0,01	
<i>DMD</i> локализација мутације					
Проксимална	40 (26)	1			
Дистална	55 (38)	1,92 (1,07-3,47)	2,18	0,03	
<i>SPP1</i> (rs28357094)	93 (62)				
ТТ	55 (36)	1			
TG + GG	38 (26)	1,03 (0,60-1,78)	0,12	0,9	
<i>CD40</i> (rs1883832)	95 (64)				
СС	40 (31)	1			
СТ + ТТ	55 (33)	0,86 (0,5-1,48)	-0,54	0,59	
<i>LTBP4</i> (Хаплотип)	89 (58)				
Друго/Друго	41 (27)	1			
Друго/IAAM + IAAM/IAAM	48 (31)	0,72 (0,41-1,26)	-1,15	0,25	
Интеракција					
КС терапија x <i>DMD</i> локализација (дистална)	42 (27)	0,21 (0,06-0,74)	-2,42	0,02	0,056*
КС терапија x <i>SPP1</i> rs28357094 (TG + GG)	25 (15)	0,69 (0,19-2,55)	-0,56	0,58	
КС терапија x <i>CD40</i> rs1883832 (СТ + ТТ)	46 (25)	0,68 (0,19-2,38)	-0,6	0,55	
КС терапија x <i>LTBP4</i> (Друго/IAAM + IAAM/IAAM)	33 (17)	1,25 (0,29-5,4)	0,3	0,76	

У Соx регресионом моделу који је укључивао термине интеракције, постојала је статистички значајна интеракција између КС терапије и дисталне локализације мутације у *DMD* гену (HR=0,21, p=0,02).

С друге стране, термин интеракције између КС терапије и генетских варијанти није био значајан: *SPP1* варијанта (HR=0,69, p=0,58), *CD40* варијанта (HR=0,68, p=0,55), као и *LTBP4* хаплотип (HR= 1,25, p=0,76). Укупни модел је био на граничном нивоу значајности (p=0,056, конкорданција=0,68).

4.5 Удружена повезаност варијанти гена *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* са клиничком прогресијом болести (време губитка хода) – кластер анализа

Оптималан број кластера одређен Elbow методом и дендрограмом указао је на постојање два или четири кластера, са сличним индексима унутрашње мере (за два кластера – DB скор=1.056, Silhouette скор=0.409, S_Dbw скор=2.559, Calinski Harabasz индекс=47.894; за 4 кластера - DB скор =0.809, Silhouette скор=0.517, S_Dbw скор=2.422, Calinski Harabasz индекс=101.513) (Слика 19).



Слика 19. Дендрограм заснован на Валдовој методи хијерархијског груписања веза. Вертикална оса представља меру удаљености, означену висином плавих линија. 64 оболела од ДМД су груписана у четири најмања дефинисана кластера (приказана бојама наранџасте, зелене, црвене и љубичасте) на основу сличности. Поред тога, могу се уочити два већа кластера која се састоје од мањих наранџастих + зелених и црвених + љубичастих кластера, као што је назначено горњом граном дендрограма.

Пошто се цео скуп података састојао од само 64 болесника, раздвајање оболелих у четири кластера би сигурно довело до претераног уклапања, јер би број случајева у једном кластеру био прилично мали. Из тог разлога, извршена је накнадна кластер анализа на два већа кластера – кластер 1 који обухвата 41 болесника и кластер 2 са 23 болесника. Профили кластера су дати у табели 6.

Табела 6. Кластер профили непокретних болесника са Дишеновом мишићном дистрофијом према генетским факторима и узрасту у време губитка хода.

Варијабла	Опис	Кластер I	Кластер II	p- вредност
		N = 41	N = 23	
<i>SPP1</i> rs28357094*	ТТ	24	14	1**
	TG + GG	17	9	
<i>CD40</i> rs1883832*	СС	13	18	5,7E-04**
	СТ + ТТ	28	5	
<i>LTBP4</i> хаплотип*	Друго/Друго	26	1	2,8E-06**
	Друго/IAAM + IAAM/IAAM	15	22	
локализација мутације у <i>DMD</i> гену	проксимална	12	14	0,018**
	дистална	29	9	
узраст губитка хода	≤10,75 година	24	8	0,06***
	>10,75 година	17	15	

* – доминантни ефекат ређег алела/хаплотипа

** – Fisher exact test

*** – Wilcoxon-Mann-Whitney test

Добијени кластери нису показали значајну разлику у дистрибуцији генотипова rs28357094 у *SPP1* гену према доминантном моделу ($p=1$).

Међутим, постојала је статистички значајна разлика у дистрибуцији генотипа rs1883832 у *CD40* гену ($p=5,7E-04$) и *LTBP4* хаплотиповима ($p=2,8E-06$). Кластер 2 је имао пет пута мање генотипова rs1883832 са *CD40* штетним ређим алелом Т и примећен је само један случај без IAAM хаплотипа.

Поред тога, добијени кластери су се значајно разликовали у дистрибуцији локализације мутације дистрофина ($p=0,02$). „Дисталне“ мутације су уочене три пута ређе у кластеру 2, док су оба кластера имала скоро једнак број „проксималних“ мутација.

Коначно, кластер 2 је имао три пута мање болесника који су изгубили могућност самосталног хода раније од средњег узраста од 10,75 година. Када се пореди дистрибуција

стварне старости у време губитка хода између два кластера, уочен је тренд ка значајности ($B=339$, $p=0,06$).

Узимајући у обзир све статистички значајне варијабле из кластер анализе, упоредили смо болеснике који носе све штетне ($rs1883832$ СТ/ТТ генотипове, Друго/Друго *LTBP4* хаплотипови и дисталну локализацију мутације) са онима са свим заштитним факторима ($rs1883832$ СС генотип, Друго/IAAM и IAAM/IAAM *LTBP4* хаплотипови и проксимална локализација мутације). Занимљиво је да је прву групу чинило осам болесника из првог кластера, а другу групу осам болесника из другог кластера. У групи из првог кластера, пет од осам болесника изгубило је кретање пре средњег узраста од 10,75 година, док је у групи из другог кластера шест од осам болесника изгубило покретљивост касније.

4.6 Утицај гена модификатора на клинички ток код покретних болесника током једногодишњег праћења

Кохорта од 20 покретних болесника са дијагнозом ДМД праћена је током 12 месеци и евалуирана на почетку и крају наведеног периода праћења 6 минутним тестом хода и моторном скалом NSAA. Болесници су стратификовани према генотипу одабраних варијанти у генима модификаторима болести и то према $rs28357094$ *SPP1*, *LTBP4* хаплотипу и $rs1883832$ *CD40*. Тестирана је хипотеза о утицају гена модификатора на прогресију болести код покретних оболелих од ДМД.

Средња вредност узраста оболелих од ДМД у време почетка истраживања била је 10,15 година \pm 2,35 (распон 7-16 година).

Типови мутација у *DMD* гену код 20 болесника су: 65% делеције једног или више егзона, 30% мале мутације и 5% дупликације једног или више егзона у гену за дистрофин. Од болесника са описаним малим мутацијама у *DMD* гену 50% је имало тачкасту мутацију која ствара стоп кодон.

Проксималне мутације у *DMD* гену (проксимално од интрона 44) са захваћеношћу дугих изоформи дистрофина, и то Dp427 и Dp260, имало је 40% болесника. Дисталне мутације у *DMD* гену (дистално од интрона 44, укључујући и интрон 44) за захваћеношћу дугих и макар једне кратке изоформе дистрофина - Dp140, Dp116, Dp71 и/или Dp40, описане су код 60% оболелих.

Сви болесници су користили КС терапију.

Само је један болесник имао све заштитне варијанте у три испитана гена и то IAAM хаплотип у *LTBP4*, ТТ у $rs28357094$ *SPP1* и ређи Т алел у $rs1883832$ *CD40*. Овај болесник је имао 11 година на почетку истраживања и тачкасту мутацију која ствара стоп кодон у *DMD* гену. Резултати његових моторних постигнућа, на две испитане скале, се нису битније променили у једногодишњем периоду праћења и даље је 6 минутни тест хода био преко 400 m, док је скор на NSAA тесту био 32/34.

Током једногодишњег праћења три болесника су изгубила могућност самосталног хода. Ниједан од наведена три болесника није имао заштитни IAAM хаплотип, нити повољнију варијанту у rs10880 *LTBP4* гену, већ CC/CT генотип који је повезан са ранијим губитком хода. Два болесника су имала неповољнију варијанту у *SPP1* гену, такође су два болесника имала варијанту у *CD40* гену удружену са млађим узрастом у време губитка хода.

Сензитивнија метода за оцену промене моторног функционисања током 12 месеци била је NSAA тест. На резултат 6 минутног теста хода често је утицала тренутна мотивација болесника, док је већи број краћих моторичких задатака учинио NSAA тест прихватљивијим и поузданијим мерилем тренуне моторне функције.

Kolmogorov-Smirnov тест је показао нормалну дистрибуцију за вредности NSAA теста.

ТТ генотип у rs28357094 *SPP1* гену имало је 60% болесника, док је преосталих 40% оболелих имало TG/GG генотип. На самом почетку праћења носиоци оба генотипа имали су сличне средње вредности на NSAA тесту (23,7 vs 23; ТТ vs TG/GG генотип).

Током једногодишњег праћења носиоци заштитног Т алела имали су промену средње вредности NSAA са $23,7 \pm 8,0$ на $20,8 \pm 8,7$ (упарени Т тест за зависне узорке $p=0,007$). Носиоци TG/GG генотипова имали су промену средње вредности NSAA са $23,0 \pm 8,5$ на $18,9 \pm 11,6$ (упарени Т тест $p=0,036$). Средња вредност промене у NSAA скору (нулта и процена након 12 месеци) код оболелих носиоца заштитног Т алела била је $- 2,9 \pm 3,0$, док је код носиоца TG/GG генотипова износила $- 4,1 \pm 4,5$ (Табела 7).

Табела 7. Вредности NSAA ($X \pm СД$) на почетку и након 12 месеци код варијанти гена *SPP1*, *CD40* и хаплотипа *LTBP4*

	NSAA		
	0. месец	12. месец	разлика
<i>SPP1</i>			
ТТ	$23,7 \pm 8,0$	$20,8 \pm 8,7$	$- 2,9 \pm 3,0$
TG+GG	$23,0 \pm 8,5$	$18,9 \pm 11,6$	$- 4,1 \pm 4,5$
<i>CD40</i>			
CC	$20,3 \pm 7,6$	$15,2 \pm 9,3$	$- 5,2 \pm 2,9$
CT+TT	$24,8 \pm 8,0$	$22,1 \pm 9,4$	$- 2,6 \pm 3,7$
<i>LTBP4</i>			
Друго/Друго	$20,2 \pm 8,0$	$15,4 \pm 9,0$	$- 4,8 \pm 3,9$
Друго/IAAM + IAAM/IAAM	$28,4 \pm 5,3$	$27,0 \pm 6,0$	$- 1,4 \pm 2,0$

Ређи Т алел у rs1883832 *CD40* гену имало је 70% оболелих од ДМД. Примарно су оболели носиоци ређег Т алела имали боље средње вредности постигнућа на NSAA тесту у односу на носиоце СС генотипа.

Током једногодишњег праћења носиоци ређег Т алела имали су промену средње вредности NSAA са $24,8 \pm 8,0$ на $22,1 \pm 9,4$ (упарени Т тест за зависне узорке $p=0,02$). Носиоци СС генотипа имали су промену средње вредности NSAA са $20,3 \pm 7,6$ на $15,2 \pm 9,3$ (упарени Т тест $p=0,008$). Средња вредност промене у NSAA скору (нулта и процена након 12 месеци) код оболелих носиоца ређег Т алела била је $- 2,6 \pm 3,7$, док је код носиоца СС генотипа у rs1883832 *CD40* гену износила $- 5,2 \pm 2,9$ (Табела 7)

Макар један IAAM хаплотип *LTBP4* гена имало је осам болесника, док је 12 оболелих од ДМД имало другу варијанту, тачније било без IAAM хаплотипа. На почетку праћења је била јасна разлика у постигнућима између групе болесника са макар једним IAAM хаплотипом у односу на групу оних без IAAM хаплотипа *LTBP4* гена.

Током једногодишњег праћења носиоци макар једног заштитног IAAM хаплотипа имали су промену средње вредности скорa NSAA са $28,4 \pm 5,3$ на $27,0 \pm 6,0$ (упарени Т тест за зависне узорке $p=0,092$). Оболели у групи без иједног заштитног IAAM хаплотипа имали су промену средње вредности скорa NSAA са $20,2 \pm 8,0$ на $15,4 \pm 9,0$ (упарени Т тест $p=0,001$). Средња вредност промене у NSAA скору (нулта и процена након 12 месеци) код оболелих носиоца заштитног IAAM хаплотипа била је $- 1,4 \pm 2,0$, док је код болесника без иједног заштитног IAAM хаплотипа износила $- 4,8 \pm 3,9$ (Табела 7).

5. ДИСКУСИЈА:

У овој студији испитан је појединачни и удружени утицај три гена модификатора *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* на клинички ток Дишенове мишићне дистрофије, први пут у популацији оболелих припадника југоисточно европских народа.

У овом истраживању испитан је ефекат варијанти гена, независних од *DMD* гена, на моторичку функционалност оболелих, није разматран утицај истих на плућну и срчану функцију.

Кохорта је укључила 95 добро окарактерисана болесника са ДМД.

Средњи узраст оболелих од ДМД био је $15,8 \pm 7,2$ година, а у групи оболелих који су изгубили способност самосталног хода $18,7 \pm 7,1$ година. Средња вредност узраста оболелих често није навођена у студијама утицаја генетичких модификатора на клинички ток ДМД, већ само узраст у време губитка хода, као главна мера исхода. У студији европских центара, приближни узраст испитаника имала је кохорта оболелих из енглеских центара око 19 година, док је у центрима у Ферари, Монпељеу и Лајдену, просечна старост оболелих била између 21 и 25 година (van den Bergen et al. 2015).

Свим болесницима је потврђена дијагноза ДМД на молекуларно генетичком нивоу. Добијена дистрибуција типа мутација у *DMD* гену је била упоредива са описаним у другим популацијама, а то је између 55 и 65% за делеције, 6-11% за дупликације егзона и 18-25% за мале мутације (Muntoni et al. 2003, Aartsma-Rus et al. 2006, Aartsma-Rus et al. 2016, Bladen et al. 2015). Изузетак од до сада описаног удела типа мутација јесте недавно публикован рад руских аутора, који је укључио 778 оболелих од ДМД. У наведеном истраживању удео делеција једног или више егзона је 49%, што је значајно мање од до сада познатог, док је удео малих мутација (36,5%) посебно *non sense* мутација значајно већи, са описаних 19,3% (Zinina et al. 2022).

Укупан број наших болесника подобних за неку од регистрованих каузалних терапија ДМД, од стране Америчке и Европске агенције за лекове, је 43%. Према регистру Treat NMD, укупан број оболелих од ДМД који испуњавају услове за терапију је приближно 39%, што је упоредиво са нашим резултатима. У нашој кохорти регистровано је нешто мање оболелих подобних за терапију аталуреном, 8,4%. У до сада објављеним студијама, најчешће се наводи проценат од око 10%. Изузетак и значајно већи број подобних болесника за терапију аталуреном регистрован је у Руској кохорти оболелих од ДМД и то 19,3% (Zinina et al. 2022). За терапију прескакања/искрајања егзона *DMD* гена у нашој групи било је укупно подобно 34,6% оболелих. За искрајање егзона 45 - 12,6%, егзона 51 - 15,7% и егзона 53 у *DMD* гену 6,3%. У до сада публикованим радовима најчешћи проценат оболелих од ДМД подобних за искрајање егзона 51 био је 13%, потом егзона 53 од 8 до 10% и на крају 8% подобних за искрајање егзона 45 (Waldrop et al. 2020, Lim et al. 2017, Clemens et al. 2020, Wagner et al. 2021). И овде се значајно разликују резултати недавно публиковане руске студије, у оквиру које се наводи да је за терапију прескакања егзона 45 подобно 4,3% оболелих, егзона 51 – 5,9% и егзона 53 4,7% оболелих од ДМД (Zinina et al. 2022).

Иако је број испитаних болесника упоредив са неким раније објављеним студијама (Doogenweerd et al. 2017), величина узорка наше кохорте је једно од ограничења за студију генетске асоцијације.

У овој кохорти оболелих детектована је слична превага „дисталних“ мутација у *DMD* гену као у италијанској кохорти и кооперативној међународној неуромишићној истраживачкој групи (CINRG-DNHS, Cooperative International Neuromuscular Research Group - Duchenne Natural History Study) (Bello et al. 2015, Bello et al. 2020).

Као главни миљоказ прогресије болести коришћен је узраст у време губитка способности самосталног хода, те су из истраживања искључени оболели од ДМД са делецијама егзона 3 до 7 и егзона 45 у *DMD* гену, пошто је описано да ови болесници имају нешто спорију прогресију болести и самим тим губе способност кретања касније (Bello et al. 2016, Winnard et al. 1995, Gualandi et al 2006). У истраживању спроведеном од стране Wang-а и сарадника тема различитог клиничког исхода оболелих са појединим типовима мутација у *DMD* гену, сагледана је кроз регрутацију болесника подобних за прескакање/искрајање егзона 8, 44, 45, 50, 51, 52, 53 и 55. Испитана је велика популација оболелих из регистра за самопријављивање, доминантно америчких болесника и њихових породица. Од примарне групе, коју су чинила 3383 болесника, издвојено је 765 оних који су задовољили критеријуме - генетички потврђене ДМД, примена КС терапије и податак о узрасту у време губитка самосталног хода. Из наведене кохорте, болесници су подељени према типу мутације у одговарајуће подгрупе. Највећи проценат оболелих био је подобан за прескакање егзона 51 (13,8%), а најмањи егзона 8 (2,4%) у *DMD* гену. Под хипотезом да неке мутације у *DMD* гену могу довести до ендеогеног прескакања егзона и поновног успостављања оквира читања транскрипта, неопходног за синтезу протеина, процес је квантификован у културама миотубула или миобласта оболелих. На овај начин испитан процес ендеогеног прескакања егзона потврдио је низак ниво за егзон 51, најчешће око 3%, варијабилан до висок за егзон 44 од 8 до 90% и висок за егзон 8 у *DMD* гену од 43%. Поред високог нивоа ендеогеног прескакања егзона 8, за делеције егзона 3 до 7, описана је и експресија дистрофина у узорцима мишићне биопсије и култури миотубула (Wang et al. 2018.). Оболели подобни за прескакање егзона 8 и 44 су са значајном разликом у каснијем узрасту губили способност хода у односу на друге групе оболелих. И овом студијом потврђен је блажи ДМД фенотип оболелих са делецијом егзона 45 (искрајање егзона 44) и делецијом егзона 3 до 7 у *DMD* гену (искрајање егзона 8).

Примарна изоформа дистрофина пуне дужине Dp427 недостаје код свих оболелих од ДМД, а одређене мутације у *DMD* гену утичу на захваћеност и краћих изоформи дистрофина. Dp427 пуне дужине постоји у три скоро идентичне изоформе. Dp427m, је изоформа која је најизраженија у скелетним мишићима. Dp427c и Dp427p се експримирају у кортексу, амигдали, хипокампусу и малом мозгу. Две краће изоформе, Dp140 и Dp71, су високо изражене у централном нервном систему (ЦНС). Док је улога Dp140 и Dp71 на ЦНС коморбидитете код оболелих од ДМД добро позната, односи између недостатка Dp140 и Dp71 и моторних исхода обољења нису. У европској ДМД кохорти, 15% оболелих којима недостаје само Dp427 је имао интелектуалну недовољност, у поређењу са 25% оних којима недостаје Dp427 и Dp140 и 64% болесника без Dp427, Dp140 и Dp71 (Taylor et al. 2010). Овакав закључак донет је у популацији наших болесника (Milić et al., 2015.). У истраживању публикованом 2015. године анализиран је 41 болесник са ДМД, од

којих је 16,22% имало граничну интелигенцију, док је 18,92% имало умну недовољност. Коефицијент интелигенције није био удружен са дистинкцијом мутације као проксималне/дисталне, са границама на егзону 30 и 45 *DMD* гена. Међутим описана је јасна статистичка значајност када је сагледан ефекат мутације у *DMD* гену на захваћеност изоформи дистрофина. Мутације које су захватале и Dp140 и Dp71/Dp40 су биле удружене са тежом и чешћом појавом интелектуалне недовољности. У закључку је описан јасан кумулативни ефекат губитка изоформи дистрофина који повећава ризик интелектуалне ометености у ДМД уз уочену потребу ка раној когнитивној интервенцији код ове групе болесника.

У новој студији Chesshyre и сарадници процењивали су однос између мутација које доводе до губитка Dp427/Dp140 и Dp427/Dp140/Dp71 у поређењу са губитком само Dp427 на моторну функцију у великој кохорти оболелих од ДМД. Мере исхода биле су: (1) NSAA тест, (2) време устајања из лежећег положаја (3) време ходања/трчања на дистанци од 10 метара и (4) узраст у време губитка хода код оболелих од ДМД. Резултати јасно показују значајно смањење постигнућа код оболелих узраста пет година (смањени средњи резултати NSAA и време устајања из лежећег положаја) и у време достизања врхунца моторних функција (смањени средњи резултати NSAA и 10m брзина ходања/трчања) код ДМД болесника којима недостају Dp140 и Dp71, са јасним кумулативним ефектом губитка изоформе. Средњи узраст у време губитка хода био је млађи у групи у којој недостају обе краће изоформе дистрофина 13 и 13,6 година у поређењу са групом оболелих којима недостаје само Dp427 који су губили способност хода у просеку са 15,7 година. Ипак ова разлика није достигла статистичку значајност (Chesshyre et al. 2022).

У нашој групи оболелих од ДМД показан је сличан тренд. Оболели са мутацијама у *DMD* гену које су захватале дуже изоформе дистрофина - Dp427 и/или Dp 260 су губили способност кретања у каснијем просечном узрасту од 11,08 година у односу на оболеле код којих су биле захваћене и краће изоформе дистрофина – Dp140, Dp116, Dp71 и Dp40 и који су губили способност хода са 10,59 година. Ова разлика показала је статистички тренд ($p=0,093$). У групи болесника лечених КС терапијом није описан наведени ефекат изоформи, али у групи болесника који нису примали КС терапију разлика у корист дужих изоформи дистрофина, Dp427 и/или Dp 260, била је статистички значајна ($p=0,013$).

Што се тиче могућности да су ДМД болесници којима недостају Dp140 и Dp71 били мање способни да разумеју упутства током тестирања, Chesshyre и сарадници сматрају ово мало вероватним. Наводе да је процена функционалним скалама била део дечје рутине, и да се спроводила сваких шест месеци од стране обучених професионалаца. Предложена је хипотеза по којој уочене разлике у моторној функцији могу бити повезане са директним утицајем ЦНС на моторне функције, и то утицаја виших центара моторне функције, контроле и координације, са могућом улогом дефицита у малом мозгу и/или церебеларно таламичко кортикалној повезаност (Chesshyre et al. 2022). У времену пред нама нова истраживања ће расветлити наведену хипотезу.

Подаци о КС терапији били су доступни за све болеснике и исти су сматрани „лечени КС“ ако су примали КС најмање годину дана пре него што су изгубили могућност хода, док су „нелечени“ примали терапију у краћем временском интервалу или је уопште нису користили.

У целој групи КС терапија је примењивана код 77% оболелих, док је у групи непокретних болесника тај проценат био нешто нижи – 70%. Према добијеним резултатима, КС терапија је продужила средњи узраст у време губитка самосталног хода за 1,2 године код болесника са ДМД који су примали КС терапију годину дана или дуже пре него што су изгубили способност хода.

Прва велика проспективна лонгитудинална студија која користи „*time to event*“ како би демонстрирала дугорочну корист од КС терапије код оболелих од ДМД дала је резултате који су објављени у раду McDonald-а и сарадника 2018. године. У студији је учествовало 440 оболелих из CINRG-DNHS групе, од којих је 77% примало КС дуже од годину дана пре губитка хода. Позитиван ефекат КС је описан са одлагањем средњег узраста у време губитка хода за 3,4 године, а бољи исход је постигнут применом дефлазакорта (McDonald et al. 2018). Оболели који су користили КС терапију мање од месец дана губили су способност хода у просечном узрасту од 10 година, док су они који су користили КС терапију дуже од годину дана мобилност изгубили у просеку са 13,4 година.

Могући разлози изостанка већег ефекта КС терапије у нашој групи би могли бити то што је терапија уведена касније у животу, што је више болесника користило преднизон, што код свих није примењена предложена доза од 0,75 mg/kg преднизона, односно 0,9 mg/kg дефлазакорта, као и различито трајање лечења (једна година и више) пре губитка самосталног хода.

КС терапија представља стандард неге оболелих од ДМД, чији бенефит је показан у већем броју публикованих резултата (Quattrocelli et al. 2021). Ипак у систематском прегледу литературе, објављеном у Кохреиновој бази података 2016. године, невелики број студија испунио је услове за анализу утицаја КС код оболелих од ДМД (Matthews et al. 2016). Од 12 идентификованих студија само је једна адекватно сагледала примарну меру исхода, време губитка хода у двогодишњем периоду праћења ефекта дефлазакорта (2 mg/kg на други дан) код 28 оболелих од ДМД. Одлагање губитка хода било је 13 месеци у групи оболелих који су примали наведену терапију (Angelini et al. 1994). Ипак ни ови подаци нису били, по статистичкој анализи, одговарајући за извођење закључака. Наведени преглед литературе није могао да испита дугорочне користи и ризике лечења кортикостероидима из публикованих рандомизовано контролираних испитивања због одсуства студија са дугорочним праћењем дужим од две године.

По питању избора препарата једна од првих мултицентричних дупло слепих рандомизованих клиничких студија показала је сличан учинак дневне примене преднизона (0,75 mg/kg) и дефлазакорта (0,9 mg/kg), с тим што је дефлазакорт био повезан са мањом учесталашћу прекомерног пораста телесне масе. Студија која је укључила 340 болесника са ДМД указала је на већу корист дефлазакорта у продужењу времена самосталне покретљивости, али и на већу учесталост нежељених дејстава попут нижег раста, кушингоидног изгледа и појаве катаракте код оболелих лечених овим препаратом (Bello, Gordish-Dressman et al. 2015).

У истраживањима која су уследила показан је бољи резултат примене дефлазакорта и у 6 минутном тесту хода, пењању уз четири степеника и устајању из лежећег положаја у поређењу са преднизоном (Shieh et al. 2018, McDonald et al. 2020).

Питање режима дозирања КС у ДМД и даље је актуелно. У истраживању Griggs и сарадници спровели су анкету међу лекарима специјализованим у пољу неуромишићних обољења. Од 105 лекара специјалиста у овој области описано је 29 различитих режима примене КС терапије у лечењу ДМД (Griggs et al, 2013). Ипак 4 најчешће примењивана режима била су: 0,75 mg/kg/дневно преднизона (61 центар), 0,75 mg/kg преднизона 10 дана примене, 10 дана паузе (36 центара), 0,9 mg/kg/дневно дефлазакорта (32 центра) и 5 mg/kg/дневно преднизона викендима (10 центара). У нашој групи оболелих КС терапија (преднизон или дефлазакорт) је примењивана свакодневно. Дневна примена КС изазива већи број нежељених ефеката, али одржава оболеле од ДМД дуже покретним (Crabtree et al., 2018), док викенд примена КС терапије показује нижи профил нежељених дејстава у дужем временском периоду, (Quattrocelli et al., 2019) мању супресију осовине хипоталамус-хипофиза-надбубрежне жлезде, као и ниже нивое гликемије, инсулинемије и масне масе. Недавно су публиковани резултати велике рандомизоване клиничке студије која је укључила 196 оболелих од ДМД, узраста четири до седам година. Болесници су праћени три године, а упоређен је ефекат дневне примене преднизона (0,75 mg/kg), дневне примене дефлазакорта (0,9 mg/kg), наспрам (0,75 mg/kg) интермитентне примене преднизона (10 дана примене лека, 10 дана паузе). Примарне мере исхода су биле време потребно за устајање са пода као функционална мера исхода, форсирани витални капацитет и задовољство третманом процењено, од стране болесника и родитеља/старатеља, прилагођеним упитником. Није забележена разлика у ефикасности преднизона и дефлазакорта у свакодневној примени, али јесте статистички значајна разлика између режима дневне и интермитентне терапије, у корист дневне примене КС на моторна постигнућа (Guglieri et al. 2022). Није било значајне разлике међу режимима примене КС и форсираног виталног капацитета, као ни анкетом процењеног задовољства терапијом оболелог/родитеља/старатеља. Није било значајне разлике између дневне примене преднизона и дефлазакорта ни по питању секундарних мера исхода, а то су 10 метарски ход/трчање, NSAA скор и 6 минутни тест хода. Ипак и у секундарним мерама исхода забележена је значајна разлика када су се дневни режими примене КС терапије поредили са интермитентним, у корист дневне примене преднизона/дефлазакорта код оболелих од ДМД. Најчешће забележена нежељена дејства, у трогодишњем периоду праћења, била су поремећај понашања (34% у групи оболелих код којих је примењен преднизон дневно, 38% дневни дефлазакорт и 36% интермитентни преднизон), инфекција горњих респираторних путева и повраћање.

У току су напори да се генеришу нови глукокортикоидни деривати који би смањили нежељене ефекте и/или побољшали циљане аспекте терапије, као што је активација глукокортикоидних рецептора (ГР) (Bromberg et al., 2004, Desmet et al, 2017). Примери нових синтетичких деривата укључују SpdX, антиинфламаторни агонист ГР (Hua et al. 2019, Hua et al 2019), и ваморолон, дисоцијативни лиганд ГР и антагонист минералкортикоидних рецептора, који побољшава стабилност мембране.

У нашем истраживању, болесници са „дисталним“ мутацијама који нису користили стероиде су изгубили кретање раније од оних са проксималним, што указује на важност благовременог лечења КС за све болеснике, али посебно за оболеле са дисталним мутацијама у *DMD* гену.

У италијанској кохорти, ефекат „дисталних“ мутација на узраст губитка самосталног хода није испитиван, али студија је истакла дисталну мутацију као фактор ризика за лошије резултате на тестовима плућне функције (Bello et al. 2020). Овај налаз је делимично објашњен упитном сарадњом, знајући да су код оболелих од ДМД са дисталним мутацијама захваћене и краће изоформе дистрофина, присутне у централном нервном систему, те самим тим и когнитивно функционисање (Bello et al. 2020, Milic Rasic et al. 2015, van de Bergen 2015). Међутим, утицај кратких изоформи дистрофина, које недостају код дисталних мутација, на друге варијабле, као што је усклађеност зида грудног коша или деформитети скелета, не може бити потпуно искључен и захтева даљу анализу.

У ревијалном прегледу литературе по питању проналажења валидних прогностичких индикатора прогресије ДМД, Феризовић и сарадници, од претрагом пронађених 3018 радова, издвојили су 135 публикација. Радови су обухватили популацију од 25610 оболелих од ДМД из 18 земаља света. Идентификована су 23 прогностичка индикатора прогресије ДМД. Ендогени индикатори су били узраст у време постављања дијагнозе, симптоми на почетку болести, гени модификатори ДМД, тип мутације у *DMD* гену, висина, тежина и индекс телесне масе оболелих. Спољни/егзогени индикатори прогресије ДМД били су терапија аталуреном, ATL1102, кардиолошка терапија, дрисаперсен, едасалонексат, етеплирсен, КС терапија, идебенон, хирургија доњих екстремитета, ортозе, оксандролон, спинална хирургија, TAS-205, ваморолон, витлоларсен и асистирана вентилација (Ferizovic et al. 2022). Најчешће испитани прогностички индикатор у литератури била је КС терапија, чији је утицај описан кроз укупно 73 идентификоване публикације. Овај главни егзогени фактор је значајно утицао на узраст у време губитка хода, моторну функцију доњих екстремитета, мишићну снагу, респираторну функцију, преживљавање и функцију горњих екстремитета оболелих од ДМД (процењено са високим нивоом доказа). КС терапија утицала је и на срчану функцију (процењено са средњим нивоом доказа) и могуће на развој сколиозе код оболелих од ДМД (процењено са нижим нивоом доказа). Следећи најчешћи спољни прогностички индикатор прогресије обољења, сагледан кроз 13 одабраних студија, била је кардиолошка терапија. Два ендогена прогностичка индикатора која су се издвојила, у овом ревијалном прегледу литературе, била су гени модификатори ДМД и тип мутације у *DMD* гену. Иако је потребно више истраживања да би се квантификовао утицај специфичних модификатора и самих мутација у *DMD* гену, нови подаци показују да ови генетички аспекти могу имати важну улогу у укупној прогресији обољења.

Наша група оболелих од ДМД је, према учесталости од 41% за rs28357094 G алел *SPP1* гена и без одступања од Hardy Weinberg-ове равнотеже, упоредива са групама из других студија, у којима се фреквенција G алела кретала од 29% у италијанској кохорти до 47,7% код болесника у Лајденској групи (Bello et al. 2015, Pegoraro et al. 2011, Bello et al. 2012, van den Bergen et al. 2015). Све наведене кохорте, укључујући и нашу, обухватале су мање од 100 оболелих од ДМД.

У овом истраживању, није потврђен значајан утицај генотипа *SPP1* на узраст у време губитка хода код 93 оболела од ДМД, од којих је 62 изгубило способност самосталног хода.

Није примећена повезаност између генотипа *SPP1* и узраста у време губитка хода ни у кохортама из пет европских центара (Лондон, Њукасл, Монпеље, Лајден и Ферара) (van den Bergen et al. 2015). У валидационом испитивању у наведеним центрима утврђен је генотип *SPP1* код 336 оболелих од ДМД, број оболелих по центрима кретао се између 43 и 107. Највећи број оболелих били су непокретни и то 85,7%, док је КС терапију користило 30,4% оболелих. Није потврђен значајан ефекат генотипа *SPP1* на узраст губитка хода, као ни значајна интеракција између генотипа и терапије КС, док је описан значајан утицај терапије КС на време губитка хода оболелих од ДМД. Такође је опсервирана значајна разлика међу групама оболелих, у корист кохорте из Њукасла и Лондона у узрасту у време губитка хода. Као две главне лимитације студије наведене су: мали проценат оболелих лечених КС терапијом и време губитка хода као једина мера исхода. Иако је време губитка хода један од важних миљоказа у прогресији ДМД, није сензитиван на потенцијалне мале ефекте испитиваних варијабли. Такође назначено је да мали број оболелих у кохортама ретких обољења лимитира студије генске асоцијације.

Недостатак повезаности између генотипа *SPP1* и узраста у време губитка способности хода (по доминантном и адитивном моделу) је описан и у значајно већој групи оболелих од ДМД, код 239 непокретна болесника из кохорте пројекта Уједињене дистрофинопатије (Flanigan et al, 2013). У наведеној кохорти није показана повезаност генотипа *SPP1* са применом КС терапије, као ни са типом мутације у *DMD* гену.

Прва студија која је показала модификујући ефекат rs28357094 у гену *SPP1* спроведена је у две кохорте које су чинила 106 болесника из Падове и 156 болесника из кохорте CINRG-DNHS. Мере исхода биле су узраст у време губитка хода оболелих од ДМД, скор мишићне снаге, снага стиска и квантитативно мишићно тестирање. Ређи G алел rs28357094 (присутан код 35% болесника) анализиран по доминантном моделу, био је повезан са годину дана ранијим губитком хода у кохорти из Падове, и слабијим стиском песнице мереним у CINRG-DNHS кохорти, међу којима је најочигледнији утицај регистрован код болесника који нису лечени КС терапијом (Pegoraro et al, 2011). У узрасту од 14 година, 20% болесника са ДМД са ТТ генотипом су били покретни, док ниједан оболели са GT/GG генотиповима rs28357094 у гену *SPP1* није био покретан. У CINRG-DNHS кохорти, болесници са G алелом показали су мању снагу стиска, са већим ефектом у популацији непокретних болесника лечених КС терапијом. Оболели са GT/GG генотиповима у rs28357094 показали су смањење снаге стиска за 12% у односу на оболеле са ТТ у свим старосним групама, са посебним повећањем на 19% разлике код непокретних болесника.

Ређи G алел rs28357094 *SPP1* гена био је, по доминантном моделу, удружен са 1,2 године ранијим средњим узрастом у време губитка хода у истраживању спроведеном у кохорти CINRG-DNHS која регрутује оболеле из 20 клиничких центара са четири континента (Bello et al 2015). У наведеној студији генотипизација начињена је за 283 оболела од ДМД. Када су сагледани само болесници лечени КС терапијом уочена је још већа разлика од 1,9 година у време губитка хода код два генотипа rs28357094 *SPP1* гена. Оболели који су примали КС терапију са TG/GG генотиповима губили су у просеку

могућност хода са 12 година, док су оболели са ТТ генотипом у rs28357094 *SPP1* гена губили ход са 13,9 година. У групи оболелих који нису користили КС терапију, средњи узраст у време губитка хода био је идентичан, и износио је 10 година код оболелих носиоца оба генотипа у rs28357094 *SPP1* гена.

Наведено упућује да би *SPP1* ген могао бити фармакодинамски маркер одговора на КС терапију, пре него директни модификатор клиничке прогресије ДМД.

Овакав ефекат *SPP1* гена забележен је и у другим кохортама оболелих од ДМД и у сагласју је са преклиничким студијама (Bello et al. 2012, van den Bergen et al. 2015, Chen et al. 2020). Ређи G алел rs28357094 *SPP1* гена смањује транскрипциону активност гена, али у одговору на КС терапију показује троструки пораст експресије гена (Giacopelli et al. 2004, Varfield et al. 2014). У прилог наведеном говоре и резултати код оболелих носиоца оба генотипа *SPP1* који нису лечени КС терапијом и код којих није забележена разлика у нивоу информационе РНК међу групама *in vivo* у ДМД дијагностичким мишићним биопсијама начињеним пре почетка примене КС (Piva et al. 2012). Кортикостероиди су познати регулатор транскрипције гена везаних за инфламаторне процесе (Rhen et al. 2005), како директно преко позитивних и негативних елемената КС одговора, тако и индиректно преко супресије других транскрипционих фактора као што је на пример NF-κB.

Наша студија није потврдила интеракцију генотипа rs28357094 *SPP1* и КС терапије, што би могло бити повезано са увођењем терапије касније у животу и хетерогеношћу у трајању терапије међу болесницима. Ова интеракција није потврђена ни у већ наведеним студијама из европских центара, као ни у кохорти пројекта Уједињене дистрофинопатије (Flanigan et al. 2013, van den Bergen et al. 2015).

Код болесника који су покретни, у проспективној студији од 80 оболелих од ДМД (94% на КС терапији), стратификованих у две групе према *SPP1* генотипу (ТТ vs TG/GG), процењивани су тестови моторних функција. Достигнућа на NSAA и 6 минутном тесту хода праћена су 12 месеци, а подгрупа оболелих са алелом G имала је значајан пад функционалног исхода (Bello et al, 2012).

У кинеској кохорти *SPP1* ефекат rs28357094 није проучаван јер је учесталост алела G била нижа од 0,01 (1 од 326 болесника), што је у сагласју са референцама за азијску популацију. У овој кохорти оболелих од ДМД rs11730582 *SPP1* гена описан је као нови генски модификатор КС терапије и тестиран код 326 болесника (Chen et al, 2020). По доминантном моделу средњи узраст у време губитка хода код болесника са СС/СТ генотиповима у rs11730582 *SPP1* гена био је 11 година, а код оболелих са хомозиготним Т алелом 10,33 година. По рецесивном моделу средњи узраст у време губитка хода код болесника са хомозиготним С алелом био је 11,17 година, док је код оболелих са ТТ/СТ генотиповима био 10,5 година. У групи оболелих који су користили КС терапију виђен је јасан ефекат ређег С алела rs11730582 *SPP1* гена, по доминантном моделу, на успорење прогресије болести, док је у групи без КС терапије овај ефекат изостао, потврђујући да су КС познати регулатор транскрипције гена који су део процеса инфламације, укључујући и *SPP1* ген.

Утицај генотипа rs28357094 *SPP1* на развој ДК процењен је у студији која је обухватила 178 оболела од ДМД, који су били праћени 15,9±6,7 година (Varp et al. 2015).

Од наведене кохорте 42,1% је примало КС терапију најмање годину дана пре процењиваног догађаја – губитка хода/развоја ДК. Дилатативну кардиомиопатију развило је 40% болесника. Просечан узраст болесника у време развоја ДК био је $16,5 \pm 6,0$ година (распон 5,4–40,1 година). Код 60% оболелих од ДМД који нису развили ДК током периода посматрања и били цензурисани за даљу анализу, средњи узраст на последњој контроли и забележеном нормалном ехокардиографском прегледу био је $15,5 \pm 7,1$ година (опсег 3,6–36,5 година). У овој кохорти није примећена статистички значајна разлика утицаја КС терапије на развој ДК, лечени – средњи узраст у време развоја ДК 20,0 година vs. 20,5 година код болесника који нису лечени КС терапијом. Показан је тренд, без достизања статистичке значајности, у разлици међу генотиповима ТТ vs. ТG/GG и времену развоја ДК: 24,1 година за ТG/GG, код 111 оболелих и 19,1 за ТТ код 67 оболела од ДМД. Постојао је тренд ка каснијем настанку ДК и код оболелих од ДМД који су носили *LTBP4* rs10880 ТТ наспрам СС/СТ генотипова (29,5 наспрам 19,0 година, $p = 0,13$). Статистичка значајност достигнута је код болесника лечених КС са рецесивним Т алелом *LTBP4* rs10880 ($< 50\%$ ТТ болесника развијају ДК током праћења; $p = 0,027$).

У истој студији Вагг-а и сарадника процењен је утицај генотипа rs28357094 *SPP1* на узраст у време губитка хода и није показана значајна разлика. Од 123 болесника, 38,2% је лечено КС терапијом најмање годину дана пре губитка хода. Kaplan-Meier-овом анализом груписања према *SPP1* генотипу и КС третману, нису уочене значајне разлике, иако је примећени ефекат КС терапије на средњи узраст у време губитка хода са тенденцом да буде старији код болесника носиоца ТТ генотипа (9,9 година код нелечених наспрам 11,3 године код лечених) него код ТG/GG болесника (10,3 године код нелечених наспрам 10,9 код лечених), показујући тренд ка већој ефикасности лечења кортикостероидима код носиоца ТТ генотипа, као што је претходно и описано. У овој студији сагледан је и посредан утицај моторне функције на срчану, код 57 болесника који су били непокретни и развили ДК, и није уочен заштитни ефекат раног губитка хода на развој ДК, као што је у неким претходним студијама сугерисано (Nigro et al. 1990, Spurney et al. 2011).

Остеопонтин је и пре открића модификујуће варијанте rs28357094 био у пољу интересовања истраживача посвећених мишићној патологији. Тако је на моделу кардиотоксином оштећених мишића миша (*m. tibialis anterior*) откривена појачана транскрипција *SPP1* гена и до 118 пута, 48 сати након повреде. Остеопонтин је локализован око инфилтрирајућих макрофага, односно у некротичним влакнима која су била захваћена макрофагима. На овај начин је описано да, посредством своје интегрин везујуће адхезивне улоге, остеопонтин води инвазију макрофага, а самим тим представља важан медијатор у раној фази мишићне регенерације (Bello et al. 2020, Hirata et al 2003). Остеопонтин испитиван је на анималним моделима ДМД. Експериментални модел миша којем су недостајали и дистрофин и остеопонтин је показао редукцију фиброзе, појачану снагу и снижену активност TGF β , који је познати поспешивач фиброзе у каснијим фазама ДМД (Bello et al. 2020). У наведеном моделу запажена је модификација инфилтративних имунских ћелијских популација - снижене НК (енг. natural killer) Т ћелије и неутрофили, модификација макрофага ка прорегенеративним М2 ћелијама, односно даље од проинфламаторних М1 ћелија. Наведеним је дата већа шанса регенерацији мишића и тиме успорена фиброза.

У истраживањима која су уследила потврђена је улога остеопонтина у узорцима мишића оболелих од дистрофинопатија и конгениталних мишићних дистрофија. Међу неколико гена укључених у процес фиброзе, *SPP1* је имао најизраженије повећање активности.

Када се полемише о остеопонтину као фармакодинамском маркеру одговора на КС терапију, важно је разумети резултате истраживања о регулацији транскрипције остеопонтина у хуманим ћелијским линијама малигног астроцитома. У наведеној студији откривена су два претходно препозната елемента у промотору остеопонтина која синергистички врше регулацију синтезе остеопонтина од стране туморских ћелија (Wang et al. 2000). Део откривених елемената је и глукокортикоидни рецептор реагујући елемент, који заједно са естроген реагујућим елементима сугеришу комплексну регулацију *SPP1* промотора стероидним хормонима, што није необично за гене који су укључени у процес инфламације. Vianello и сарадници спровели су истраживање на примарним миобластима добијеним од оболелих од ДМД и миотубулима, пре и после терапије КС (дефлазакортом). Примена дефлазакорта довела је до повећања *SPP1* транскрипта и протеина у дистрофином дефицијентним миотубулима у групи носиоца G алела у rs28357094 *SPP1* гена. Мултиваријантна анализа потврдила је значајну интеракцију између G алела и КС терапије. Овај закључак подржава модел у којем претерана експресија *SPP1* гена доводи до лошијих моторних постигнућа код оболелих на терапији КС, али не и код оних код којих ова терапија није примењена. Ипак величина овог ефекта није довољна да би се оболелим од ДМД носиоцима G алела у rs28357094 *SPP1* гена саветовала обустава КС терапије (Vianello et al. 2017, Bello et al 2020).

Остеопонтин има три изоформе које настају искрајањем пре-информационе РНК, главни протеин пуне дужине ОПНа, потом ОПНб којем недостаје егзон 5 и ОПНц којем недостаје егзон 4. Изоформа пуне дужине је окарактерисана у различитим ћелијским процесима и њена улога у биологији тумора је широко истражена. Студије о функционалној улози и експресији изоформи искрајања остеопонтина су новије и углавном су фокусиране на туморске ћелије. У ћелијама глиома, ОПНа и ОПНц активирају инвазију, док у ћелијама тумора простате, ОПНб и ОПНц имају неколико протуморогенних улога, активацијом различитих корака у прогресији тумора. У ћелијама тумора јајника и тумора дојке, само ОПНц активира туморску прогресију. Новији подаци су показали да ОПН варијанте искрајања могу бити укључене у одговор здравих ћелија на канцерогене стимулусе, као што су никотин и пушење. Такође наведене изоформе проучавају се и у другим патофизиолошким стањима, као што је, на пример, калцификована болест аортног залистка (Gimba et al. 2013).

Студије изоформи остеопонтина, на хуманим и анималним моделима, идентификовале су ОПНа као најзаступљенију изоформу у дистрофичном мишићу. У *in vivo* експериментима у култури хуманих макрофага и миобласта, показано је да је ОПНа најактивнији изоформа која индукује секрецију неколико проинфламаторних цитокина. Наиме током поправке трауме мишића ОПНа који луче миобласти делује у почетку проинфламаторно и хемотактично за неутрофиле, док касније, спојени миотубули прелазе на ОПНб и ОПНц изоформе које су мање инфламогене и модулирају регенерацију ткива. Потребни су даљи експерименти да би се овај модел детаљније тестирао и сагледао (Bello et al. 2020).

Дистрибуција специфичних *LTBP4* хаплотипова код болесника који су учествовали у овом истраживању била је слична оној у другим испитиваним кохортама.

VTТТ и IAAM су најчешћи и чине више од 80% хаплотипова (Flanigan et al. 2013, van den Bergen et al. 2015, Варр et al 2015.).

Није уочена повезаност IAAM хаплотипа са узрастом у време губитка хода, према доминантним и рецесивним моделима, као што је то био случај и у студији кинеских аутора у популацији 326 болесника са ДМД (Chen et al. 2020). Однос хазарда (енг. hazard ratio - HR) је био 1.06 (95% CI - интервал поверења 0,76–1,48, $p = 0,713$) за IAAM/IAAM, 0.42 (95% CI 0,33–0,53, $p < 0.001$) за оболеле лечене КС терапијом. Статистичка значајност није уочена у комбинацији КС терапије, *DMD* генотипа и *LTBP4* хаплотипа. Аутори су сугерисали могућ уплив етничке припадности, конфигурације хаплотипова, других срединских фактора, стандарда лечења на добијени резултат.

С друге стране, статистички значајан ефекат је показан кроз многе студије почевши од Flanigan-а и сарадника који су први описали *LTBP4* хаплотип као генски модификатор ДМД у кохорти пројекта Уједињене дистрофинопатије која броји 254 учесника (Flanigan et al. 2013).

IAAM хаплотип, у рецесивном моделу, био је повезан са 1,5-2 године старијим средњим узрастом у време губитка хода. Све четири варијанте rs2303729, rs1131620, rs1051303, rs10880 у *LTBP4* гену су повезане са каснијим губитком хода, али је варијанта rs10880 показала најзначајнији појединачни ефекат (Flanigan et al. 2013, Weiss et al 2018). Резултати су потврђени у мултицентричној студији од 265 учесника из пет европских центара, наглашавајући заштитни ефекат IAAM хаплотипа на време губитка самосталне покретљивости (van den Bergen et al. 2015).

Модификујући ефекат *LTBP4* је процењен у мултиетничкој CINRG-DNHS кохорти од 274 оболела од ДМД. Генотипови СС/СТ у rs10880 *LTBP4* био повезан са млађим средњим узрастом у време губитка хода - 12 година код 242 оболела, у односу на ТТ генотип код 32 оболела и 13,9 година у време губитка мобилности. Овим је показан позитиван тренд, али у целој кохорти није постигнута статистички значајна повезаност варијанте *LTBP4* са узрастом у време губитка способности хода. Када су подаци одвојено анализирани у мањој подгрупи белаца, рецесивни Т генотип у rs10880 је био значајно повезан са продуженом мобилношћу, одлажући средњи узраст у време губитка хода за 2,4 године (Bello et al. 2015). У наведеном истраживању није показан ефекат КС терапије на генотип rs10880 *LTBP4*, како у примарно, тако ни у накнадно стратификованој популацији оболелих од ДМД.

Напротив, у италијанској мултицентричној студији, која је имала за циљ да процени везу између модификатора ДМД и дилатативне кардиомиопатије, рецесивни IAAM хаплотип је био повезан са ранијим узрастом у време губитка могућности самосталног хода. У овој студији одређен је *LTBP4* хаплотип код 135 оболелих од ДМД у кохорти оних који су изгубили покретљивост (Варр et al, 2015). Генотип ТТ у rs10880 и IAAM/IAAM хаплотип, био је повезан са ранијим средњим узрастом у време губитка хода. Носиоци ТТ генотипа, којих је било 25, изгубили су способност хода на средњем узрасту од 9,9 година, за разлику од носиоца СС/СТ генотипова у rs10880 *LTBP4* гена, њих 112,

који су изгубили мобилност са 10,9 година. Носиоци претходно описаног заштитног IAAM/IAAM хаплотипа, којих је било 13, у овом истраживању, губили су могућност хода раније, у просечном узрасту од 9,7 година. Носиоци VTTT/VTTT хаплотипа, њих 39, губили су способност самосталног хода са 11,1 година, а носиоци свих других хаплотипова у *LTBP4* гену, којих је било 83, губили су кретање са у просеку 10,8 година. Оваква повезаност у супротном је смеру асоцијације у поређењу са првом и највећим бројем студија које су уследиле по открићу *LTBP4* хаплотипа као генетичког модификатора ДМД.

У кохортама оболелих од ДМД из 5 европских центара (Лондон, Њукасл, Монпеље, Лајден и Ферара), анализиран је утицај варијанти *SPP1* и *LTBP4* гена на прогресију болести. Генотипизација хаплотипа rs2303729, rs1131620, rs1051303, rs10880 *LTBP4* гена начињена је код 265 оболелих од ДМД, од којих је 82,3% било непокретно, док је преосталих 17,7% цензурирано за даљу анализу, јер је мера исхода била узраст у време губитка кретања. IAAM хаплотип, користећи адитивни модел, је био удружен са статистички значајним одлагањем губитка хода у односу на VTTT и друге хаплотипове *LTBP4* гена. Наведени ефекат је био значајан у обе популације – лечених и нелечених болесника од ДМД. Ефекат IAAM хаплотипа потврђен је и рецесивним моделом. У наведеном истраживању уочене су и разлике између кохорти, те су оболели од ДМД из Лондона, Њукасла, Монпељеа са статистичком значајношћу имали одложено време губитка хода у односу на оболеле из кохорте из Фераре и Лајдена (van den Bergen et al., 2015).

У кохорти пројекта Уједињене дистрофинопатије, у којој је иницијално описан модификујући ефекат *LTBP4* хаплотипа, Weiss и сарадници начинили су студију асоцијације целокупног генома (Weiss et al. 2018). Иако је величина кохорте била прилично мала, 253 оболела од ДМД, идентификована су два модификујућа локуса rs2725797 и rs710160. Подаци о експресији гена и интеракцији хроматина указују на то да варијанта rs710160 има регулаторни утицај на *LTBP4*, док rs2725797 регулаторну улогу остварује на *THBS1* ген. Идентификована варијанта rs710160 налази се 12 kb узводно од *LTBP4* промотора, што сугерише регулаторну улогу, а ређи C алел rs2725797 удружен је са смањеном *LTBP4* транскрипцијом. C алел rs2725797 „дели“ IAAM алел, и чини следеће главне хаплотипове: T-VTTT (49%), C- IAAM (17%) и T-IAAM (13%). C- IAAM хаплотип је био удружен са најдужом мобилношћу болесника и са најнижом *LTBP4* експресијом, те претпостављено мањим обимом фиброзе и блажим фенотипом ДМД.

Поред ефекта на моторне функције оболелих од ДМД, у студији Barnard и сарадници проценили су утицај гена модификатора, и то варијанти у *SPP1* и *THBS1* гену, као и хаплотипа *LTBP4* гена, на прогресију болести мерену методама магнетне спектроскопије мишића. Учествовало је 175 оболелих од ДМД, од којих су сви користили КС терапију и којима је начињена поновљена магнетна спектроскопија мишића доњих екстремитета, са квантификацијом мишићне масне инфилтрације, изражене као фракција масти (ФМ). Код ДМД, ФМ се предвидиво повећава са годинама и клиничком прогресијом болести. Стога је примарни циљ студије био да се утврде ефекти наведених генетичких модификатора ДМД на замену мишићног масним ткивом (Barnard et al., 2022). Иако су многи учесници још увек били покретни, 77 је изгубило могућност хода на средњем узрасту од 13,3 година. Од укупно 175, генотипизовано је 125 оболелих од ДМД.

ТТ генотип у rs28357094 *SPP1* регистрован је код 64%, док је IAAM хаплотип *LTBP4* гена био присутан код 8,8% оболелих. За *SPP1* није било разлика у вредностима ФМ за одабране мишиће (*m. soleus*, *m. vastus lateralis*) између оних са и без алела Г. Слично, није пронађена разлика у параметрима моделовања мишића ногу између оболелих хомозиготних за IAAM хаплотип *LTBP4* гена и других хаплотипова. Ипак уочени су трендови ка значајности за rs710160 *LTBP4* и rs2725797 *THBS1*, те је саветована евалуација у већим кохортама.

Систематски преглед литературе са мета анализом, начињен 2021. године, сугерише да би TGF β пут могао да моделује фенотип ДМД, те, као делове наведеног пута, процењује утицај *SPP1* и *LTBP4* гена на време губитка хода и срчану функцију оболелих од ДМД (Pascual-Morena et al. 2021). Идентификовано је 8 студија, од којих су 4 ушле у мета-анализу података (Pegoraro et al. 2011, Flanigan et al 2013, van den Bergen et al 2015, Bello et al 2015, Chen et al 2020, Barp et al 2015, Van Dorn et al 2018, Weiss et al. 2018). Укупно је анализирано 2050 оболелих од ДМД. Пет студија сагледало је повезаност *LTBP4* хаплотипова са узрастом у време губитка хода (Flanigan et al 2013, van den Bergen et al 2015, Bello et al 2015, Chen et al 2020, Barp et al 2015), пет је анализирано повезаност генотипова *SPP1* са узрастом у време губитка хода (Pegoraro et al. 2011, Flanigan et al 2013, van den Bergen et al 2015, Bello et al 2015, Chen et al 2020), једна је проценила утицај *LTBP4* и *THBS1* генотипова на губитак хода (Weiss et al. 2018), две студије истраживале су повезаност генотипа *LTBP4* са срчаном функцијом (Barp et al 2015, Van Dorn et al 2018), а једна је анализирано повезаност генотипа *SPP1* са срчаном функцијом (Barp et al 2015). Систематски преглед указује на заштитни ефекат *LTBP4* хаплотипа IAAM (рецесивни модел) на узраст у време губитка хода, док није примећена повезаност *SPP1* rs28357094 са временом губитка хода. Мета-анализа *LTBP4* хаплотипа IAAM показала је заштитну повезаност са узрастом у време губитка хода, са HR = 0,78 (95% CI: 0,67–0,90). *SPP1* rs28357094 генотип G може бити повезан са slabим одговором на глукокортикоиде. *LTBP4* rs10880 није био значајно повезан са узрастом у ком се јавља дилатативна кардиомиопатија или дисфункција миокарда (Barp et al 2015, Van Dorn et al 2018). Ипак је постојао тренд већег процента оболелих од ДМД без миокардне дисфункције са rs10880 ТТ генотипом (Van Dorn et al 2018). У подгрупи лечених КС терапијом, rs10880 генотип Т (рецесивни модел) је био повезан са каснијим узрастом почетка дилатативне кардиомиопатије (Barp et al 2015). *SPP1* rs28357094 генотип није био повезан са узрастом у време појаве ДК или дисфункције миокарда, иако је генотип Т имао тенденцију да испољи штетан утицај.

Студије у којима се процењује ефекат *LTBP4* хаплотипа на узраст у време губитка кретања, праћене су и *in vitro* експериментима у култури фибробласта са хомозиготним VTTT, хетерозиготним и хомозиготним IAAM генотипом. У условима једнаког нивоа *LTBP4* експресије, IAAM алел је био адитивно повезан са снижењем активности TGF β сигналног пута. Повећана секвестрација TGF β од стране IAAM изопротеина, који је вероватно отпоран на протеолизу и/или везује TGF β са повећаном функционалним афинитетом, је основа заштитног ефекта овог *LTBP4* генотипа код оболелих од ДМД (Lamar et al. 2016).

LTBP4 је гликопротеин екстрацелуларног матрикса, један је од 4 изоформе *LTBP*, који припадају суперфамилији фибрилина и просечне су молекуларне масе од 120 до 200

kDa. LTBP4 се ковалентно везује за TGFβ1. LTBP4–TGFβ1 комплекс се секретује у цитоплазми и инкорпорира у матрикс што је веома важно у активацији TGFβ1. TGFβ1 је цитокин широко распрострањен, са улогом у процесима хроничне фиброзе у многим органима, као што су плућа, бубрези, јетра, кожа. У туморима може поспешити карциногенезу, дезмоплазијом екстрацелуларног матрикса, као и улогом у ангиогенези, инфламацији и сниженом адаптивном антиканцерском имуном одговору. (Su et al, 2021). LTBP4 омогућава секрецију TGFβ и регулише његову активацију. Поред улоге у модификацији клиничке слике ДМД, биалелна варијанта у *LTBP4* гену одговорна је за аутозомно рецесивну cutis laxa подтип Ц. Ово обољење карактерише се раним почетком емфизема у детињству, стенозом плућне артерије, ингвиналним хернијама и формирањем дивертикула у дигестивном тракту. Када говоримо о стеченим обољењима, LTBP4 утиче на прогресију фиброзних процеса код склеродерме, а нивои LTBP4 у плазми су корисни биомаркери обољења.

Постоје докази да регулација LTBP-протеина има потенцијалну улогу у карциногенези због њихове важне улоге у хомеостази екстрацелуларног матрикса и утицаја на епително-мезенхималну транзицију повезану са активацијом TGFβ (Koli et al. 2004, Wang et al. 2015).

Недостатак LTBP4 доводи до абнормалне еластогенезе и повишеног нивоа TGFβ у плућима, као што је описано у моделу аутозомно рецесивне cutis laxa подтип Ц. Показано је такође да је LTBP4 био од важног значаја за ремоделовање плућа и опоравак од повреде на анималном моделу. Експресија *LTBP4* гена је кључна за развој и одржавање плућне архитектуре, док су варијанте у гену повезане са оштећеном алвеоларизацијом и воде у колапс дисајних путева (Urban et al 2009). Повишена количина TGFβ и LTBP4 откривена је у базалној површини дисајних путева пушача, а варијанте у генима који кодирају оба ова протеина су повезане са склоношћу ка развоју хроничне опструктивне болести плућа. Протеин LTBP4 значајно утиче на функционални капацитет плућа, укључујући капацитет вежбања и толеранцију на напор и тестове плућне функције (Su et al. 2021).

Код кардиоваскуларних обољења варијанте у *LTBP4* гену повезане су са анеуризматским обољењем и инфарктом миокарда. У кохорти Уједињеног Краљевства (УК) показано је да TGFβ1 има кључну улогу у развоју анеуризме абдоминалне аорте, а пет варијанти у *LTBP4* гену повезане су са значајним смањењем раста анеуризме абдоминалне аорте (Thompson et al 2010). Једна студија о дисфункцији леве коморе после акутног инфаркта миокарда идентификовала је панел од три гена (*TNXB*, *TGFBR1* и *LTBP4*) који би потенцијално могли побољшати предикцију срчане инсуфицијенције након инфаркта миокарда (Voileau et al. 2018).

У нашој кохорти, није откривен значајан ефекат Т алела rs1883832 у *CD40* гену на време губитка хода оболелих од ДМД, према доминантном моделу.

Носиоци ређег Т алела rs1883832 у *CD40* су заправо нешто касније губили способност самосталног хода, у средњем узрасту од 10,88 година, за разлику од оболелих од ДМД са СС генотипом који су губили мобилност у просеку са 10,69 година.

Исти тренд је виђен у групи болесника лечених КС терапијом, али не и у групи оболелих од ДМД који нису користили КС терапију, у којој су носиоци ређег Т алела

rs1883832 у *CD40* гену губили способност хода за 0,67 година раније, недостижући статистичку значајност.

Као ген модификатор ДМД, *CD40* је описан 2016. године у студији асоцијације варијанти егзона на нивоу генома од 384 одабрана гена који чине два пута, користећи адитивни модел. Показана је медијана узраста од 2,8 година ранијег губитка самосталног хода код носиоца ређег Т алела rs1883832 у *CD40* гену оболелих од ДМД (Bello et al. 2016). Валидација је обављена код 660 болесника из више независних ДМД кохорти, користећи и адитивни и доминантни модел са статистички значајним закључком о средњем узрасту од годину дана ранијег губитка хода код болесника који имају ређи Т алел rs1883832 у *CD40* гену.

Студија која је анализирала ефекат генотипа *CD40* rs1883832, код болесника са ДМД у две кохорте са мета-анализом, на плућну функцију показала је негативан ефекат ређег Т алела rs1883832 на нижи ФВЦ и ранији губитак хода (Bello et al. 2016). У наведеној студији описан је негативан ефекат ређег G алела rs28357094 *SPP1* гена на форсирани витални капацитет, док за варијанте *LTBP4* и *ACTN3* није уочена значајна повезаност са резултатима тестова плућних функција.

У раду из 2022. године, Sabbatini и сарадници анализирали су утицај гена модификатора - *SPP1*, *LTBP4*, *CD40* и *ACTN3* на функцију горњих екстремитета код непокретних болесника користећи две скале у две популације оболелих од ДМД. У фази након губитка хода, код оболелих од ДМД, функција горњих екстремитета такође испољава прогресиван пад, који снажно утиче на независност и квалитет живота болесника. Међу генетичким модификаторима, само је за *SPP1* потврђен утицај на снагу стиска, те је било за очекивати да се резултат понови користећи друге две скале за процену функције руку. Међутим, пронађена је значајна повезаност између G алела на промотеру *SPP1* и снаге руку само у једној кохорти. *CD40* rs1883832 је показао најјачу повезаност са резултатом добијеним на две функционалне скале. Ефекат је био негативан за ређи Т алел, у складу са описани ефектом на губитак функције самосталног хода. Процењени линеарни коефицијенти годишњег смањења показао је већи утицај на раменом него на дисталном нивоу. Ефекат rs1883832 *CD40* гена је потврђен и у валидацијоној кохорти. Претпостављени механизам деловања *CD40* ређег алела Т би могао бити смањење регенеративне способности мишића и повећање фиброзе. Описан је и утицај *ACTN3* rs1815739 у једној кохорти на лакатну и дисталну функцију руке, док утицај варијанти *LTBP4* гена на функцију руке процењену моторних скалама није описан (Sabbatini et al 2022).

CD40 је трансмембрански протеин који припада суперфамилији TNF (tumor necrosis factor). Експримован је на широком спектру ћелија укључујући дендритске ћелије, моноците, Б ћелије, фоликуларне ћелије штитасте жлезде и фибробласте (Clark et al. 2014, Rayuhakrit et al. 2015). Активација *CD40* и *CD40* лиганда (*CD40L*) игра кључну улогу у активацији макрофага и Т ћелија. Осим тога *CD40* - *CD40L* пут је укључен у секвенцу кључних костимулаторних догађаја неопходних за Б-ћелијску пролиферацију, промену класе имуноглобулина, лучење антитела и заштиту Б ћелија од апоптозе. *CD40* - *CD40L* интеракције могу регулисати хуморални имунитет.

Постоји јасна повезаност *CD40* гена са неколико аутоимуних болести, укључујући, између осталих, Graves-ову болест (ГБ) (Jacobson et al. 2005) мултиплу склерозу (Gandhi et al. 2010), и Kawasaki-јеву болест (Japan Kawasaki Disease Genome Consortium 2012). Посебно је утврђено да ређи Т алел у rs1883832 *CD40* гена даје повећан ризик од неких од ових аутоимуних обољења, али код других пружа заштитни ефекат. Наведено указује на сложену имунолошку мрежу интеракција и патогенетске процесе специфичне за болест и ткиво.

Резултати мета анализе, до сада објављених радова, сугеришу протективну улогу rs1883832 *CD40* гена на развој ГБ, али и негативну асоцијацију између rs1883832 и Graves-ове офталмопатије (ГО), као најчешће екстратироидне манифестације ГБ (Wang et al. 2019). Ова анализа обухватила је 17 публикација, односно 4707 оболелих и 4215 здравих контрола.

Студије на анималним моделима показале су значајно повећање експресије *CD40* у штитастој жлезди експерименталне ГБ. *In vivo* блокада *CD40* је значајно супримираола експериментални аутоимуни тироидитис, док код модела мишева, који конститутивно имају повишену експресију тироидног *CD40*, је повећана продукција антитела специфичних за штитасту жлезду, што узрокује тежи облик ГБ. Ређи алел rs1883832 смањује ефикасност *CD40* иРНК транслације што доводи до смањене експресије *CD40*. На основу наведеног закључује се да снижена експресија *CD40* индукована rs1883832 може да смањи ризик од развоја ГБ. Graves-ова офталмопатија присутна је код 20% до 50% болесника са ГД. Клиничке студије су показале да орбитални и фибробласти из периферне крви оболелих са ГО имају значајно веће нивое *CD40*. Ове ћелије су активирани преко *CD40* и доприносе развоју ГО производњом инфламаторних цитокина, регрутацијом инфламаторних ћелија и регулацијом ткивног ремоделовања (Wang et al. 2019).

Варијанта у rs1883832 *CD40* гена, која је идентификована као генетички модификатор ДМД, има важно место у покретању инфламације у процесу атеросклерозе, код коронарне болести срца. Ефекат варијанте је испитан у кохорти од 346 болесника и 106 контроле. Оса *CD40* - *CD40L* је једна од најмоћнијих костимулативних протеина контролних тачака имунитета који покрећу атеросклерозу. У хуманој популацији, експресија дијаде *CD40* - *CD40L* у плаку била је повезана са хистолошким карактеристикама вулнерабилности атеросклеротског плака. Повећани нивои растворљивог облика *CD40L* у серуму су повезани са хиперхолестеролемијом, можданом ударом, дијабетесом и акутном коронарним синдромом. Повећана експресија *CD40* на циркулишућим моноцитима је повезана са коронарном болести срца. СС генотип у rs1883832 *CD40* гена резултира проинфламаторним фенотипом васкуларног система ендотелних ћелија, што повећава подложност атеросклерози и коронарној болести срца. *CD40* би могао бити потенцијални нови биомаркер за проинфламаторне процесе који се јављају у атеросклерози (Sultan et al. 2019).

Као што је наведено дијада *CD40* - *CD40L* је први пут описана у активацији Б-ћелија за производњу антитела и пролиферацију инфламаторних ћелија као што су макрофаги и лимфоцити као одговор на инфекцију. Међутим, улога *CD40* - *CD40L* у неуролошким болестима неинфективне етиологије недавно је верификована. Аберантна експресија *CD40* може имати различито дејство у зависности од патофизиолошких механизма обољења. Може бити штетна за опстанак нервног ткива, на пример, код

аутоимуних неуролошких поремећаја као код мултипле склерозе, или и корисна у активирању имуних ћелија неопходних за лизу туморских ћелија код примарних и секундарних тумора мозга (Ots et al. 2022).

Три испитивана ДМД гена модификатора су укључена у раскршће NF- κ B и TGF β путева, који имају улогу у патогенези ДМД. Поред тога, и остеоопонтин и *LTBP4* директно модификују репарацију сарколеме у миофибрилима здравих и дистрофичних мишића (Quattrocelli et al. 2017). Може се претпоставити да модификујући ефекат варијанти *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* није изолован један од другог, што може даље да обликује њихов удружени ефекат.

Извршили смо кластер анализу да бисмо описали могућу подгрупу непокретних оболелих од ДМД према генетичким факторима. Иако нисмо приметили повезаност одређене варијанте у уобичајеним анализама преживљавања, профил два добијена кластера био је у складу са уоченим појединачним ефектима варијанти у другим ДМД кохортама (Pegoraro et al. 2011, Flanigan et al 2013, Bello et al. 2016). Важно је да је разлика у узрасту у време губитка способности хода, као мера исхода, између кластера показала статистички тренд.

Кластер који показује статистички тренд ка каснијем губитку способности самосталног хода (кластер 2) се састојао од појединаца који ређе носе варијанте повезане са већим ризиком од ранијег губитка хода. Конкретно, скоро сви ови болесници имају најмање једну копију заштитног IAMM *LTBP4* хаплотипа. Поред тога, ређе су носили алела T у *CD40* гену и дисталне мутације у *DMD* гену.

Наш резултат кластер анализе имплицира да је ефекат испитиваних ДМД модификатора вероватно удружен, а не изолован, с обзиром на чињеницу да су ови модификатори укључени у исте патолошке процесе. Непостизање статистички значајне разлике у узрасту у време губитка хода између кластера је вероватно због чињенице да изабране варијанте нису једини модификатори ДМД (Weiss et al. 2018, Hogarth et al. 2017, Spitali et al 2020), поред ограничења у вези са величином узорка. Оваква поређења истовременог утицаја већег броја гена модификатора ДМД до сада нису описана у литератури.

Испитивање удружених ефеката генских модификатора захтева велику популацију оболелих, што је посебно изазовно у области ретких обољења, као што је ДМД. Оно што је познато јесте да гени модификатори *SPP1* и *LTBP4* учествују у репарацији сарколеме. У мезенхимским ћелијама, остеоопонтин активира транскрипцију TGF β 1 преко мијелоидног *zinc finger 1* транскрипционог фактора. У истраживању Quattrocelli и сарадници поставили су управо питање о манипулацији и утицају *SPP1* и *LTBP4* гена на поновно затварање и поправку сарколеме. Обезбеђени су оптимални услови за микро, ласерски посредовану, повреду сарколеме и њено рано откривање и формирање услова за поправку у миофибрилима. Документовано је да остеоопонтин и штетна *LTBP4* изоформа конвергирају у сигналној петљи TGF β која је у корелацији са транскрипционом репресијом анексин гена и поремећеном поправком сарколеме. У закључку се наводи да остеоопонтин и *LTBP4* регулишу TGF β сигналну петљу како би модификовали поправку сарколеме у нормалном и дистрофичном мишићу (Quattrocelli et al. 2017).

Кластер анализа није спровођена у пољу ДМД, али је употребљена у другим фенотипски хетерогеним обољењима, у циљу идентификације подгрупа од интереса.

Кластер анализом моторних и немоторних симптома идентификоване су субфенотипске категорије Паркинсонове болести (ПБ) у највећој мултицентричној, интернационалној кохорти оболелих (Mu et al., 2017.). Идентификована су четири кластера – благи, доминантно немоторни, доминантно моторни и тешки субфенотип ПБ. Идентификовано је и шест нових мањих кластера груписања, од којих сваки карактеришу клинички релевантни немоторни симптоми. Кластери идентификовани у овој студији представљају статистичку потврду све важније улоге немоторних симптома у фенотипској хетерогености ПБ.

Следећи пример била би кластер анализа оболелих од опструктивне апнеје током спавања (Ferreira-Santos et al., 2021). Од 13 варијабли фенотипа идентификована су три кластера – први кластер, средовечни мушкарци који су пријавили апнеје и високу конзумацију алкохола, други кластер, средовечне жене са повећаним обимом врата, нарушеним спавањем и јутарњим главобољама и трећи кластер, који су чинили гојазни старији мушкарци који су пријавили апнеје и високу конзумацију алкохола. Оболели из валидационе кохорте потврдили су напред наведене формиране кластере.

Хијерархијска кластер анализа коришћена је у области срчане инсуфицијенције са очуваном ејекционом фракцијом. Кластер анализом фенотипских карактеристика описаних у 67 континуираних варијабли дефинисане су и окарактерисане међусобно искључиве групе оболелих на основу којих је начињена и нова класификација срчане инсуфицијенције са очуваном ејекционом фракцијом. У оквиру идентификоване три различите групе описане су значајне разлике оболелих по клиничким карактеристикама, структури и функцији срца, неинвазивној хемодинамици и исходу обољења (Shah et al., 2015.).

У нашем истраживању је процењен утицај варијанти гена *SPP1*, *CD40* и *LTBP4* хаплотипа на моторна постигнућа, објективизована помоћу две моторне скале, у 12 месечном периоду праћења код 20 оболелих од ДМД.

Сви болесници су лечени КС терапијом, и то преднизолом или дефлазакортом у континуираном режиму (свакодневна примена).

По типу мутација у *DMD* гену одабрана подгрупа покретних болесника имала је нешто већи проценат малих мутација у односу на целу групу испитаника, њих 95, као и нешто мањи проценат дупликација једног или више егзона. У овој подгрупи већи број оболелих био је, по типу мутације, подобан за терапију аталуреном (15%) у односу на целу кохорту испитаника (8,4%).

Проценти проксималних мутација у *DMD* гену (проксимално од интрона 44) са захваћеношћу дугих изоформи дистрофина, и то Dp427 и Dp260, и дисталних мутација (дистално од интрона 44, укључујући и интрон 44) за захваћеношћу дугих и макар једне кратке изоформе дистрофина - Dp140, Dp116, Dp71 и/или Dp40, били су компаративни са процентима описаним у целој кохорти оболелих од ДМД.

У нашем истраживању NSAA тест је показао већу конзистентност и бољу корелацију са клиничким стањем болесника, у односу на 6 минутни тест хода, код којег је тренутна мотивација оболелих имала значајан уплив на резултат. NSAA тест је поуздана и валидна мера покретности код оболелих од ДМД, укупан скор NSAA корелира са 6-минутним тестом хода. Пик вредности оболелих достижу у узрасту између шест и седам година. Показано је да NSAA тест такође корелира са узрастом у време губитка хода, као важним миљоказом прогресије ДМД, у већем броју студија. У истраживању спроведеном из базе података УК *North star network*, болесници су праћени најмање три године. Од 293 болесника 160 је изгубило способност самосталног хода у просечном узрасту од 11 година и 8 месеци. Веће вредности NSAA теста биле су удружене са каснијим губитком способности самосталног хода. На пример, болесници са најнижим (<22) или високим резултатом (>31) NSAA теста су имали повећање/смањење од приближно 50% ризика од губитка кретања у поређењу са групом оболелих који су постигли средње вредности NSAA теста (26–28), без обзира на режим КС терапије (дневна/интермитента). Болесници са резултатом NSAA од 32 до 34 имали су вероватноћу од 0,61 да ће бити покретни и у узрасту старијем од 13 година у поређењу са 0,34 вероватноће оних који су постигли 26 до 31 поена на NSAA тесту (Zambon et al. 2022).

У нашој подгрупи покретних болесника ТТ генотип у rs28357094 *SPP1* гену имало је 60% болесника, док је преосталих 40% оболелих имало TG/GG генотипове, што је упоредиво са процентима специфичног генотипа за целу кохорту наших болесника, њих 95. У групи испитаника у италијанском истраживању, Bello и сарадници наводе нешто већу разлику у процентима у корист ТТ генотипа у rs28357094 *SPP1* гену од 71% (Bello et al. 2012).

На самом почетку праћења носиоци оба генотипа у rs28357094 *SPP1* гену имали су сличне средње вредности на NSAA тесту (23,7 vs 23; ТТ vs TG/GG генотипови), као што је био случај и у италијанској проспективној кохорти (23,3 vs 24,6; ТТ vs TG/GG генотипови) (Bello et al. 2012).

Средња вредност промене у NSAA скору (нулта и процена након 12 месеци) код оболелих носиоца заштитног Т алела, у нашој групи, била је $-2,9 \pm 3,0$, док је код носиоца TG/GG генотипова била већа и износила $-4,1 \pm 4,5$. Слично је показано и у групи италијанских оболелих од ДМД (Bello et al. 2012).

Студија у којој је проспективно праћен утицај гена модификатора ДМД спроведена је у популацији покретних болесника (Bello et al. 2012). Сагледан је утицај варијанте *SPP1* гена на клинички ток оболелих од ДМД. Утицај других гена модификатора ДМД није сагледан на сличан начин. Од 80 оболелих од ДМД, из 11 италијанских центара, 94% је користило КС терапију, од којих 61% је примало континуирани режим (0,75 mg/kg преднизолон – 0,9 mg/kg дефлазакорта свакодневно), а 33% алтернативни режим (10 дана користи терапију, 10 дана не користи). Пет болесника (6%) није лечено КС терапијом. Просечни узраст на почетку испитивања био је $8,3 \pm 2,7$ година (распон 4,1–19,3 година). Оболели су стратификовани у две подгрупе према генотипу rs28357094 *SPP1* гена (ТТ vs TG/GG). Укупно 57 болесника је било ТТ хомозигот (71%, Т подгрупа) за rs28357094 у *SPP1* гену, 18 TG хетерозигота (23%), 5 GG хомозигота (6%). Подгрупа са TG/GG генотиповима је чинила 23 болесника (29%, G подгрупа). Достигнућа на NSAA и 6 минутном тесту хода праћена су 12 месеци, а подгрупа оболелих са алелом G rs28357094 у

SPP1 гену имала је статистички значајан пад функционалног исхода. Средње вредности промене у NSAA резултату у 12 месечном периоду евалуације биле су - $1,0 \pm 4,3$ у Т подгрупи и - $3,1 \pm 5,5$ у подгрупи G, док је промена у 6. минутном тесту хода била - 8 ± 61 m у Т подгрупи и - 44 ± 89 m у G подгрупи. Аутори су закључили да је резултат студије још један у низу доказа да rs28357094 генотип *SPP1* утиче на функционални исход оболелих од ДМД, у овом случају код покретних болесника.

Оно што је у даљим истраживањима постало јасно јесте да је овакав ефекат везан за оболеле који користе КС терапију, што је у наведеној студији био случај код 94% учесника, те је заправо потврђена улога варијанте у *SPP1* гену као фармакодинамског маркера одговора на КС терапију.

Утицај варијанти гена *CD40* и *LTBP4* хаплотипа на моторна постигнућа покретних болесника на проспективан начин није сагледан у литератури, те није могуће компарирати наше резултате. Важно је истаћи позитиван тренд раније описаних заштитних генотипова варијанти гена *CD40* и *LTBP4* хаплотипа на узраст у време губитка хода, који је потврђен и на моторна постигнућа покретних болесника у нашем истраживању. Током једногодишњег праћења средња вредност промене у NSAA скору код оболелих носиоца заштитног ређеј Т алела била је - $2,6 \pm 3,7$, док је код носиоца СС генотипа у rs1883832 *CD40* гену износила - $5,2 \pm 2,9$. Такође, средња вредност промене у NSAA скору (нулта и процена након 12 месеци) код оболелих носиоца заштитног IAAM хаплотипа у *LTBP4* гену била је - $1,4 \pm 2,0$, док је код болесника без иједног заштитног IAAM хаплотипа износила - $4,8 \pm 3,9$.

6. ЗАКЉУЧЦИ:

Ово је прва студија о генима модификаторима ДМД у популацији оболелих у Југоисточној Европи која доноси следеће закључке:

1. - Учесталост типова мутација у *DMD* гену у нашој кохорти упоредива је са до сада публикованим резултатима у популацији оболелих из других европских центара. Процент оболелих подобних за одређен тип каузалне терапије у складу је са до сада процењеним.
2. - Учесталост захваћених изоформи дистрофина у нашој кохорти упоредива је са до сада публикованим резултатима у популацији оболелих из других европских центара.
 - Оболели са мутацијама које су захватале дуже изоформе дистрофина као што су Dp427 и Dp260 су губили способност кретања у каснијем узрасту у односу на оболеле код којих су биле захваћене и краће изоформе дистрофина – Dp140, Dp116, Dp71 и Dp40.
 - Оболели са захваћеним и краћим изоформама дистрофина, који нису користили КС терапију, губили су способност кретања значајно раније од оних код којих су, по локализацији мутације, биле захваћене само дуже изоформе дистрофина.
3. - Учесталости ређих алела за анализираних варијанте гена *SPP1*, *LTBP4* и *CD40* биле су у складу са уоченом учесталости за европску (нефинску) популацију из базе података генома gnomAD r3.0.
 - Изузетак је ређи алел за *CD40* rs1883832, који показује нешто већу фреквенцу у поређењу са референтном базом података генома.
4. - Иако су болесници носиоци ређег G алела у rs28357094 *SPP1* гена нешто раније губили способност самосталног кретања, овим поређењем није достигнута статистичка значајност на нивоу целе групе испитаника.
 - Оболели носиоци најмање једног IAAM хаплотипа *LTBP4* гена нешто касније су губили способност самосталног кретања, али без статистичке значајности на нивоу целе групе испитаника.
 - Није откривен значајан ефекат T алела rs1883832 у *CD40* гену на време губитка хода оболелих од ДМД, према доминантном моделу.

5. - Кортикостероидна терапија значајно одлаже узраст у време губитка самосталног хода у нашој групи оболелих од ДМД.
 - Испитани генотипови *SPP1* нису имали утицаја на време губитка способности самосталног кретања ни у групи лечених болесника КС терапијом, као ни у групи нелечених оболелих од ДМД.
 - Није било разлике у средњем узрасту у време губитка хода приликом стратификације болесника према IAAM хаплотипу *LTBP4* ген и КС третману.
 - Испитани генотипови *CD40* нису имали утицаја на време губитка способности самосталног хода када се разматрају ни у групи лечених болесника КС терапијом нити у групи нелечених оболелих од ДМД.
6. - Резултат кластер анализе имплицира да је ефекат испитиваних ДМД модификатора, варијанти гена *SPP1*, *LTBP4* и *CD40*, вероватно удружен, а не изолован, с обзиром на чињеницу да су ови модификатори укључени у исте патолошке процесе.
 - Кластер који показује статистички тренд ка каснијем губитку способности самосталног хода (кластер 2) се састојао од оболелих који ређе носе варијанте повезане са већим ризиком од ранијег губитка хода. Скоро сви ови болесници имају најмање једну копију заштитног IAAM *LTBP4* хаплотипа и ређе су носиоци алела T у *CD40* гену и дисталне мутације у *DMD* гену.
7. - Током једногодишњег праћења средња вредност промене у NSAA скору код покретних оболелих носиоца заштитних варијанти у *SPP1* и *CD40* гену, као и макар једног заштитног хаплотипа у *LTBP4* гену била је мања у односу на носиоце генотипова који немају протективни ефекат на прогресију ДМД.

7. ЛІТЕРАТУРА:

- Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, Ginjaar I, van Deutekom J, van Ommen GJ, et al. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* 2009;30:293–299.
- Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet*. 2016;53(3):145-51.
- Aartsma-Rus A, Van Deutekom J.C, Fokkema I.F, Van Ommen G.J, Den Dunnen J.T. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006; 34:135–144.
- Aartsma-Rus A, van Ommen GJ. Less is more: therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol*. 2009;8(10):873-5.
- Angelini C, Pegoraro E, Turella E, Intino MT, Pini A, Costa C. Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect. *Muscle Nerve*. 1994;17(4):386-91.
- Anthony K, Arechavala-Gomez V, Ricotti V, et al. Biochemical characterization of patients with in-frame or out-of-frame DMD deletions pertinent to exon 44 or 45 skipping. *JAMA Neurol* 2014;71:32–40.
- Barfield WL, Uaesoontrachoon K, Wu CS, Lin S, Chen Y, Wang PC, et al. Eccentric muscle challenge shows osteopontin polymorphism modulation of muscle damage. *Hum Mol Genet*. 2014;23(15):4043-50.
- Barnard AM, Hammers DW, Triplett WT, Kim S, Forbes SC, Willcocks RJ, et al. Evaluating Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy Disease Progression Using Modeling and MRI. *Neurology*. 2022;99(21):e2406-e2416.
- Barp A, Bello L, Politano L, Melacini P, Calore C, Polo A, et al. Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy. *PLoS One*. 2015;10(10):e0141240.
- Bello L, Flanigan K.M, Weiss R.B, Dunn D.M, Swoboda K.J, Gappmaier E, et al. Association Study of Exon Variants in the NF- κ B and TGF β Pathways Identifies CD40 as a Modifier of Duchenne Muscular Dystrophy. *Am. J. Hum. Genet*. 2016; 99:1163–1171.
- Bello L, Kesari A, Gordish-Dressman H, Cnaan A, Morgenroth L.P, Punetha J, et al. Genetic modifiers of ambulation in the Cooperative International Neuromuscular Research Group Duchenne Natural History Study. *Ann. Neurol*. 2015; 77:684–696
- Bello L, Morgenroth L.P, Gordish-Dressman H, Hoffman E.P, McDonald C.M, Cirak S, CINRG investigators. DMD genotypes and loss of ambulation in the CINRG Duchenne Natural History Study. *Neurology* 2016; 87:401–409.
- Bello L, Pegoraro E. Genetic diagnosis as a tool for personalized treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Acta. Myol*. 2016;35(3):122–127.
- Bello L, Pegoraro E. The "Usual Suspects": Genes for Inflammation, Fibrosis, Regeneration, and Muscle Strength Modify Duchenne Muscular Dystrophy. *J Clin Med*. 2019;8(5):649.
- Bello L, Piva L, Barp A, Taglia A, Picillo E, Vasco G, et al. Importance of SPP1 genotype as a covariate in clinical trials in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 2012; 79:159–162.

- Bello L, D'Angelo G, Villa M, Fusto A, Vianello, Merlo B. et al. Genetic modifiers of respiratory function in Duchenne muscular dystrophy. *Ann ClinTransl Neurol.* 2020;7(5):786-98.
- Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Alman BA, Apkon SD, Blackwell A, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.* 2018;17(4):347-61.
- Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Brumbaugh D, et al; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* 2018;17(3):251-267.
- Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Colvin MK, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. *Lancet Neurol.* 2018;17(5):445-55.
- Bladen CL, Salgado D, Monges S et al. The TREAT-NMD DMD global database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* 2015;36(4):395–402.
- Boileau A, Lalem T, Vausort M, Zhang L, Devaux Y, Cardioline network (www.cardiolinc.org). A 3-gene panel improves the prediction of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2018; 254:28-35.
- Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salviati G, DiMauro S, et al. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell.* 1988;54(4):447-52.
- Bromberg MB, Carter O. Corticosteroid use in the treatment of neuromuscular disorders: empirical and evidence-based data. *Muscle Nerve.* 2004;30(1):20-37.
- Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moxley R, et al. Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology* 1989;39: 475–481.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):77-93.
- Bzdok D, Altman N, Krzywinski M. Statistics versus machine learning. *Nat. Methods* 2018; 15: 233–234.
- Castello L.M, Raineri D, Salmi L, Clemente N, Vaschetto R., Quaglia M, et al. Osteopontin at the crossroads of inflammation and tumor progression. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017:1–22.
- Ceco E, Bogdanovich S, Gardner B, Miller T, DeJesus A, Earley J.U, et al. Targeting latent TGFβ release in muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2014;6:259
- Chelly, J. et al. De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 1986;74: 193–196.
- Chen M, Wang L, Li Y, Chen Y, Zhang H, Zhu Y, et al. Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy in Chinese Patients. *Front. Neurol.* 2020;11:721.

- Chesshyre M, Ridout D, Hashimoto Y, Ookubo Y, Torelli S, Maresh K, et al. Investigating the role of dystrophin isoform deficiency in motor function in Duchenne muscular dystrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2022;13(2):1360-1372.
- Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: An open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 2011; 378:595–605.
- Clark EA. A Short History of the B-Cell-Associated Surface Molecule CD40. *Front Immunol*. 2014;5:472.
- Clemens P.R, Rao V.K, Connolly A.M, Harper A.D, Mah J.K, Smith E.C, et al. Safety, Tolerability, and Efficacy of Viltolarsen in Boys with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2020;77:982.
- Connolly AM, Zaidman CM, Golumbek PT, Craddock MM, Flanigan KM, Kuntz NL, et al; MDA DMD Clinical Research Network. Twice-weekly glucocorticosteroids in infants and young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2019;59(6):650-657.
- Crabtree NJ, Adams JE, Padidela R, Shaw NJ, Högler W, Roper H, et al. Growth, bone health & ambulatory status of boys with DMD treated with daily vs. intermittent oral glucocorticoid regimen. *Bone*. 2018; 116:181-186.
- de Feraudy Y, Ben Yaou R, Wahbi K, Stalens C, Stantzou A, Laugel V, et al. Very Low Residual Dystrophin Quantity Is Associated with Milder Dystrophinopathy. *Ann Neurol*. 2021;89(2):280-292.
- Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol*. 2007;36(1):1-7.
- Desguerre I, Christov C, Mayer M, Zeller R, Becane HM, Bastuji-Garin S, et al. Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS One*. 2009;4(2):e4347.
- Desmet SJ, De Bosscher K. Glucocorticoid receptors: finding the middle ground. *J Clin Invest*. 2017;127(4):1136-1145.
- Dhillon S. Viltolarsen: First Approval. *Drugs*. 2020;80(10):1027-1031.
- Doorenweerd N, Mahfouz A, van Putten M, Kaliyaperumal R, T' Hoen PAC, Hendriksen JGM, et al. Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep*. 2017;7(1):12575.
- Duan D, Goemans N, Takeda S. et al. Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers* 2021;7:13.
- Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M, Hoffman EP, Angelini C. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N Engl J Med*. 1997;336(9):618-24.
- Eagle M, Bourke J, Bullock R, Gibson M, Mehta J, Giddings D, Straub V, Bushby K. Managing Duchenne muscular dystrophy—The additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul. Disord*. 2007;17:470–475.
- Emery A. Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease. *Lancet*. 2001;357(9267):1529.

- Evans NP, Misyak SA, Robertson JL, Bassaganya-Riera J, Grange RW. Immune-mediated mechanisms potentially regulate the disease time-course of duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. *PM R*. 2009;1(8):755-68.
- Everitt S.B, Landau S, Leese M, Stahl D. *Cluster Analysis*, 5th ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, UK, 2011; pp. 73–110.
- Fairclough RJ, Wood MJ, Davies KE. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet*. 2013;14(6):373-8.
- Ferizovic N, Summers J, de Zárata IBO, Werner C, Jiang J, Landfeldt E, Buesch K. Prognostic indicators of disease progression in Duchenne muscular dystrophy: A literature review and evidence synthesis. *PLoS One*. 2022;17(3):e0265879.
- Ferreira-Santos D, Rodrigues PP. Obstructive sleep apnea: A categorical cluster analysis and visualization. *Pulmonology*. 2021:S2531-0437(21)00198-7.
- Ferrier P, Bamatter F. & Klein, D. Muscular dystrophy (Duchenne) in a girl with Turner’s syndrome. *J. Med. Genet*. 1965;2:38–46.
- FILNEMUS; Waldrop, M.A, Yaou, R.B, Lucas, K.K, Martin, A.S, O’Rourke, E. et al. Clinical Phenotypes of DMD Exon 51 Skip Equivalent Deletions: A Systematic Review. *J. Neuromuscul. Dis*. 2020;7:217–229.
- Finkel R, Flanigan K, Wong B, Bonnemann C, Sampson J, Sweeney HL, et al. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation muscular dystrophy. *Plos One* 2013;8:e81302.
- Flanigan K.M, Ceko E, Lamar K.M, Kaminoh Y, Dunn D.M, Mendell J.R, et al. LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol*. 2013;73:481–488.
- Gandhi K.S, McKay F.C, Cox M, Riveros C, Armstrong N, Heard R.N, et al. The multiple sclerosis whole blood mRNA transcriptome and genetic associations indicate dysregulation of specific T cell pathways in pathogenesis. *Hum. Mol. Genet*. 2010; 19: 2134–2143.
- Giacobelli F, Marciano R, Pistorio A, et al. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomics* 2004;20:87–96
- Gimba ER, Tilli TM. Human osteopontin splicing isoforms: known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. *Cancer Lett*. 2013;331(1):11-7.
- Gosselin MRF, Mournetas V, Borczyk M, Verma S, Occhipinti A, Róg J, et al. Loss of full-length dystrophin expression results in major cell-autonomous abnormalities in proliferating myoblasts. *Elife*. 2022;11:e75521.
- Griggs RC, Herr BE, Reha A, Elfring G, Atkinson L, Cwik V, et al. Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: major variations in practice. *Muscle Nerve*. 2013;48(1):27-31.
- Gualandi F, Rimessi P, TrabANELLI C, Spitali P, Neri M, Patarnello T, et al. Intronic breakpoint definition and transcription analysis in DMD/BMD patients with deletion/duplication at the 50 mutation hot spot of the dystrophin gene. *Gene* 2006; 370:26–33.
- Guglieri M, Bushby K, McDermott MP, Hart KA, Tawil R, Martens WB, et al. Effect of Different Corticosteroid Dosing Regimens on Clinical Outcomes in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2022;327(15):1456-1468.

- Haas M, Vlcek V, Balabanov P, Salmonson T, Bakchine S, Markey G, et al. European Medicines Agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord.* 2015;25(1):5-13.
- Hao C, Cui Y, Owen S, Li W, Cheng S, Jiang W.G. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2017; 39:1327–1337.
- Hartnett MJ, Lloyd-Puryear MA, Tavakoli NP, Wynn J, Koval-Burt CL, Gruber D, et al. Newborn Screening for Duchenne Muscular Dystrophy: First Year Results of a Population-Based Pilot. *Int J Neonatal Screen.* 2022;8(4):50.
- Herbelet S, De Paepe B, De Bleecker JL. Description of a Novel Mechanism Possibly Explaining the Antiproliferative Properties of Glucocorticoids in Duchenne Muscular Dystrophy Fibroblasts Based on Glucocorticoid Receptor GR and NFAT5. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9225.
- Heydemann A, Ceco E, Lim J.E, Hadhazy M, Ryder P, Moran J.L, et al. Latent TGF-beta-binding protein 4 modifies muscular dystrophy in mice. *J. Clin. Investig.* 2009; 119: 3703–3712.
- Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A, et al. Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. *Am J Pathol.* 2003;163(1):203-15.
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 1987;51(6):919-28.
- Hoffman EP. The discovery of dystrophin, the protein product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *FEBS J.* 2020;287(18):3879-3887.
- Hogarth MW, Houweling PJ, Thomas KC, Gordish-Dressman H, Bello L; Cooperative International Neuromuscular Research Group (CINRG), et al. Evidence for ACTN3 as a genetic modifier of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2017;8:14143.
- Holloway SM, Wilcox DE, Wilcox A, Dean JC, Berg JN, Goudie DR, et al. Life expectancy and death from cardiomyopathy amongst carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Scotland. *Heart.* 2008;94(5):633-6.
- Hor K.N, Mah M.L, Johnston ., Cripe T.P, Cripe L.H. Advances in the diagnosis and management of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 2018;28:711–716.
- Hua G, Zein N, Daubeuf F, Chambon P. Glucocorticoid receptor modulators CpdX and CpdX-D3 exhibit the same in vivo antiinflammatory activities as synthetic glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(28):14191-14199.
- Humbertclaude V, Hamroun D, Bezzou K, Bérard C, Boespflug-Tanguy O, Bommelaer C, et al. Motor and respiratory heterogeneity in Duchenne patients: implication for clinical trials. *Eur J Paediatr Neurol.* 2012;16(2):149-60.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature.* 1992;355(6362):696-702.
- Ishizaki M, Kobayashi M, Adachi K, Matsumura T, Kimura E. Female dystrophinopathy: Review of current literature. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(7):572-581.
- Jacobson E.M, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene

translation: A case for translational pathophysiology. *Endocrinology* 2005; 146:2684–2691.

- Japan Kawasaki Disease Genome Consortium; US Kawasaki Disease Genetics Consortium, Onouchi Y, Ozaki K, Burns J.C, Shimizu C, et al. A genome-wide association study identifies three new risk loci for Kawasaki disease. *Nat. Genet.* 2012; 44:517–521.
- Kamdar F, Garry DJ. Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2016 ;67(21):2533-46.
- Kaya Y, Sarikcioglu L. Sir William Richard Gowers (1845–1915) and his eponym. *Childs Nerv Syst.* 2015;31(5):633-5.
- Keegan NP. Pseudoexons of the DMD Gene. *J Neuromuscul Dis.* 2020;7(2):77-95.
- Kieny P, Chollet S, Delalande P, Le Fort M, Magot A, Pereon Y, Perrouin Verbe B. Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011. *Ann Phys Rehabil Med.* 2013;56(6):443-54.
- Koeks Z, Bladen CL, Salgado D, van Zwet E, Pogoryelova O, McMacken G, et al. Clinical Outcomes in Duchenne Muscular Dystrophy: A Study of 5345 Patients from the TREAT-NMD DMD Global Database. *J Neuromuscul Dis.* 2017;4(4):293-306.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell.* 1987;50(3):509-17.
- Koli K, Wempe F, Sterner-Kock A, Kantola A, Komor M, Hofmann WK, von Melchner H, Keski-Oja J. Disruption of LTBP-4 function reduces TGF-beta activation and enhances BMP-4 signaling in the lung. *J Cell Biol.* 2004;167(1):123-33.
- Komaki H, Takeshima Y, Matsumura T, Ozasa S, Funato M, Takeshita E, et al. Viltolarsen in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients: A phase 1/2 study. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2020; 7:2393–2408.
- Kosac A, Pesovic J, Radenkovic L, Brkusanin M, Radovanovic N, Djuriscic M, et al. LTBP4, SPP1, and CD40 Variants: Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy Analyzed in Serbian Patients. *Genes.* 2022;13(8):1385.
- Laing NG, Davis MR, Bayley K, Fletcher S, Wilton SD. Molecular diagnosis of duchenne muscular dystrophy: past, present and future in relation to implementing therapies. *Clin. Biochem. Rev.* 2011;32(3):129–134.
- Lamar K.-M, Bogdanovich S, Gardner B.B, Gao Q.Q, Miller T, Earley J.U, et al. Overexpression of latent TGF_ binding protein 4 in muscle ameliorates muscular dystrophy through myostatin and TGFβ. *PLoS Genet.* 2016;12:e1006019.
- Larner AJ (2011) A dictionary of neurological signs, 3rd edn. Springer, New York
- Lim K.R, Maruyama R, Yokota T. Eteplirsen in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Drug Des. Dev. Ther.* 2017;11:533–545.
- Mah J.K, Korngut L, Dykeman J, Day L, Pringsheim T, Jette N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 2014;24:482–491.
- Markati T, Oskoui M, Farrar MA, Duong T, Goemans N, Servais L. Emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol.* 2022;21(9):814-829.

- Massouridès E, Polentes J, Mangeot PE, Mournetas V, Nectoux J, Deburgrave N, et al. Dp412e: a novel human embryonic dystrophin isoform induced by BMP4 in early differentiated cells. *Skelet Muscle*. 2015;5:40.
- Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Manzur AY. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2016(5):CD003725.
- McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Duong T, Joyce NC, Hu F, et al. Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *Lancet*. 2018;391(10119):451-461.
- McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence J, Eagle M, Gappmaier E, et al. The 6-minute walk test and other clinical endpoints in duchenne muscular dystrophy: reliability, concurrent validity, and minimal clinically important differences from a multicenter study. *Muscle Nerve*. 2013;48(3):357-68.
- McDonald CM, Sajeev G, Yao Z, McDonnell E, Elfring G, Souza M, et al. Deflazacort vs prednisone treatment for Duchenne muscular dystrophy: A meta-analysis of disease progression rates in recent multicenter clinical trials. *Muscle Nerve*. 2020;61(1):26-35.
- Mendell J.R, Shilling C, Leslie N.D, Flanigan K.M, Gastier-Foster J, Kneile K, et al. Evidence-Based Path to Newborn Screening for Duchenne Muscular Dystrophy. *Ann. Neurol*. 2012;71:304–313.
- Mendell JR, Sahenk Z, Lehman K, Nease C, Lowes LP, Miller NF, et al. Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Neurol*. 2020;77(9):1122-1131.
- Mendell J, Shieh P, Sahenk Z, Lehman K, Lowes L, Miller N, et al. A Multicenter Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Gene-Delivery Clinical Trial of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin for Duchenne Muscular Dystrophy (4478). *Neurology* 2021; 96 (15 Supplement) 4478
- Milic Rasic V, Vojinovic D, Pesovic J, Mijalkovic G, Lukic V, Mladenovic J, et al. Intellectual ability in the duchenne muscular dystrophy and dystrophin gene mutation location. *Balkan J. Med. Genet*. 2015;17:25–35.
- Moulton H.M, Moulto, J.D. Morpholinos and their peptide conjugates: Therapeutic promise and challenge for Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1798:2296–2303.
- Mournetas V, Massouridès E, Dupont J-B, Kornobis E, Polvèche H, Jarrige M, et al. Myogenesis modelled by human pluripotent stem cells: a multi-omic study of duchenne myopathy early onset. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2021;12:209–232.
- Mu J, Chaudhuri KR, Bielza C, de Pedro-Cuesta J, Larrañaga P, Martinez-Martin P. Parkinson's Disease Subtypes Identified from Cluster Analysis of Motor and Non-motor Symptoms. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:301.
- Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*. 2003; 2:731–740.
- Nakamura A. Moving towards successful exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *J Hum Genet*. 2017;62(10):871-876.

- Neri M, Torelli S, Brown S, et al. Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human. *Neuromuscul Disord* 2007;17:913–918.
- Nigro G, Comi LI, Politano L, Bain RJ. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol.* 1990 Mar;26(3):271-7.
- Ots HD, Tracz JA, Vinokuroff KE, Musto AE. CD40-CD40L in Neurological Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8):4115.
- Parent A. Duchenne De Boulogne: a pioneer in neurology and medical photography. *Can J Neurol Sci.* 2005;32(3):369-77.
- Parker A.E, S.A. Robb, J. Chambers, A.C. Davidson, K. Evans, J. O’Dowd, et al. Analysis of an adult Duchenne muscular dystrophy population. *QJM*, 98 (2005), pp. 729-736
- Pascual-Morena C, Caverro-Redondo I, Saz-Lara A, Sequí-Domínguez I, Lucerón-Lucas-Torres M, Martínez-Vizcaíno V. Genetic Modifiers and Phenotype of Duchenne Muscular Dystrophy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pharmaceuticals.* 2021;14(8):798.
- Payuhakrit W, Panichakul T, Charoenphon N, Chalermmaenyakorn P, Jaovisidha A, Wongborisuth C, et al. In vitro production of functional immune cells derived from human hematopoietic stem cells. *EXCLI J.* 2015;14:1031-9.
- Pegoraro E, Hoffman EP, Piva L, Gavassini BF, Cagnin S, Ermani M, et al. SPP1 genotype is a determinant of disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2011;76(3):219-26.
- Pfizer’s statement to the community. December, 2021. The Pfizer DMD gene therapy team https://www.parentprojectmd.org/wp-content/uploads/2021/12/DMD-Study-1001-Update_Letter-to-the-Community.pdf (accessed Jan 12, 2022)
- Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR et al. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol. Ther.* 2011;19(5):830–840.
- Piva L, Gavassini B.F, Bello L, Fanin M, Soraru G, Barp A, et al. TGFBR2 but not SPP1 genotype modulates osteopontin expression in Duchenne muscular dystrophy muscle. *J. Pathol.* 2012; 228:251–259.
- Quattrocelli M, Capote J, Ohiri J.C, Warner J.L, Vo A.H, Earley J.U, et al. Genetic modifiers of muscular dystrophy act on sarcolemmal resealing and recovery from injury. *PLoS Genet.* 2017; 13:e1007070.
- Quattrocelli M, Zelikovich AS, Jiang Z, Peek CB, Demonbreun AR, Kuntz NL, et al. Pulsed glucocorticoids enhance dystrophic muscle performance through epigenetic-metabolic reprogramming. *JCI Insight.* 2019;4(24):e132402.
- Quattrocelli M, Zelikovich AS, Salamone IM, Fischer JA, McNally EM. Mechanisms and Clinical Applications of Glucocorticoid Steroids in Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2021;8(1):39-52.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 27 June 2022).
- Raphael JC, Chevret S, Chastang C, Bouvet F. Randomised trial of preventive nasal ventilation in Duchenne muscular dystrophy. French Multicentre Cooperative Group on Home Mechanical Ventilation Assistance in Duchenne de Boulogne Muscular Dystrophy. *Lancet.* 1994;343(8913):1600-4.

- Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1711-23.
- Rittling S.R, Singh R. Osteopontin in immune-mediated diseases. *J. Dental Res.* 2015; 94:1638–1645.
- Roberto R, Fritz A, Hagar Y, Boice B, Skalsky A, Hwang H, et al. The natural history of cardiac and pulmonary function decline in patients with duchenne muscular dystrophy. *Spine (Phila Pa 1976).* 2011;36(15):E1009-17.
- Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, Hoffman EP, Villalta SA, Rao VA, Wakefield LM, Woodcock J. Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med.* 2015;7(299):299rv4.
- Roshmi R.R, Yokota T. Viltolarsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drugs Today* 2019; 55:627–639.
- Sabbatini D, Fusto A, Vianello S, Villa M, Janik J, D'Angelo G, et al. Genetic modifiers of upper limb function in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol.* 2022;269(9):4884-4894.
- Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol.* 1996;6(1):25-35.
- Satre V, Monnier N, Devillard F, Amblard F. & Lunardi, J. Prenatal diagnosis of DMD in a female foetus affected by Turner syndrome. *Prenat. Diagn.*2004;24:913–917.
- Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci.* 2004; 35:83–92.
- Schmalbruch H. Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: A serial section study. *Neurology* 1984;34:60-5.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.
- Scott E, Mawson SJ. Measurement in Duchenne muscular dystrophy: considerations in the development of a neuromuscular assessment tool. *Dev Med Child Neurol.* 2006;48(6):540-4.
- Shah SJ, Katz DH, Selvaraj S, Burke MA, Yancy CW, Gheorghide M, et al. Phenomapping for novel classification of heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation.* 2015;131(3):269-79.
- Shi M, Zhu J, Wang R, et al. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature.* 2011; 474:343–349.
- Shieh PB. Emerging Strategies in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Neurotherapeutics.* 2018;15(4):840-848.
- Spitali P, Zaharieva I, Bohringer S, Hiller M, Chaouch A, Roos A, et al. TCTEX1D1 is a genetic modifier of disease progression in Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(6):815-25.
- Spurney CF. Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy: current understanding and future directions. *Muscle Nerve.* 2011;44(1):8-19.

- Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):3245-3276.
- Su CT, Urban Z. LTBP4 in Health and Disease. *Genes.* 2021;12(6):795.
- Sultan CS, Weitnauer M, Turinsky M, Kessler T, Brune M, Gleissner CA, et al. Functional association of a CD40 gene single-nucleotide polymorphism with the pathogenesis of coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2020;116(6):1214-1225.
- Takeshita E, Minami N, Minami K, Suzuki M, Awashima T, Ishiyama A, et al. Duchenne muscular dystrophy in a female with compound heterozygous contiguous exon deletions. *Neuromuscul Disord.* 2017;27(6):569-573.
- Tandon A, Villa C.R, Hor K.N, Jefferies J.L, Gao Z, Towbin J.A, et al. Myocardial fibrosis burden predicts left ventricular ejection fraction and is associated with age and steroid treatment duration in Duchenne muscular dystrophy. *J. Am. Heart Assoc.* 2015;4:1–8.
- Taylor PJ, Betts GA, Maroulis S, Gilissen C, Pedersen RL, Mowat DR, Johnston HM, Buckley MF. Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One.* 2010;5(1):e8803.
- Thompson AR, Cooper JA, Jones GT, Drenos F, van Bockxmeer FM, Biros E, et al. Assessment of the association between genetic polymorphisms in transforming growth factor beta, and its binding protein (LTBP), and the presence, and expansion, of Abdominal Aortic Aneurysm. *Atherosclerosis.* 2010;209(2):367-73.
- Tidball JG, Welc SS, Wehling-Henricks M. Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. *Compr Physiol.* 2018;8(4):1313-1356.
- Tyler KL. Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy". *Muscle Nerve.* 2003;28(4):402-22.
- Urban Z, Huchtagowder V, Schürmann N, Todorovic V, Zilberberg L, Choi J, et al. Mutations in LTBP4 cause a syndrome of impaired pulmonary, gastrointestinal, genitourinary, musculoskeletal, and dermal development. *Am J Hum Genet.* 2009;85(5):593-605.
- van den Bergen J.C, Hiller M, Böhringer S, Vijfhuizen L, Ginjaar H.B, Chaouch A, et al. Validation of genetic modifiers for Duchenne muscular dystrophy: A multicentre study assessing SPP1 and LTBP4 variants. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2015; 86:1060–1065.
- van den Bergen JC, Ginjaar HB, Niks EH, Aartsma-Rus A, Verschuuren JJ. Prolonged Ambulation in Duchenne Patients with a Mutation Amenable to Exon 44 Skipping. *J Neuromuscul Dis.* 2014;1(1):91-4.
- Van Dorn CS, Puchalski MD, Weng HY, Bleyl SB, Butterfield RJ, Williams RV. DMD mutation and LTBP4 haplotype do not predict onset of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Cardiol Young.* 2018;28(7):910-915.
- Verhaart IEC, Johnson A, Thakrar S, Vroom E, De Angelis F, Muntoni F, et al. Muscle biopsies in clinical trials for Duchenne muscular dystrophy - Patients' and caregivers' perspective. *Neuromuscul Disord.* 2019;29(8):576-584.
- Vianello S, Pantic B, Fusto A, Bello L, Galletta E, Borgia D, Gavassini BF, et al. SPP1 genotype and glucocorticoid treatment modify osteopontin expression in Duchenne muscular dystrophy cells. *Hum Mol Genet.* 2017;26(17):3342-3351.

- Vo AH, McNally EM. Modifier genes and their effect on Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol.* 2015;28(5):528-34.
- Vojinovic D, Adams HH, van der Lee SJ, Ibrahim-Verbaas CA, Brouwer R, van den Hout MC, et al. The dystrophin gene and cognitive function in the general population. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(6):837-43.
- Wagner K.R, Kuntz N.L, Koenig E, East L, Upadhyay S, Han B, Shieh P.B. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Casimersen in Patients with D Uchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 45 Skipping: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Dose-titration Trial. *Muscle Nerve* 2021; 64:285–292.
- Walters J. Muscle hypertrophy and pseudohypertrophy. *Pract Neurol.* 2017;17(5):369-379.
- Wang D, Yamamoto S, Hijiya N, Benveniste EN, Gladson CL. Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter: functional analysis and DNA-protein interactions. *Oncogene.* 2000;19(50):5801-9.
- Wang R.T, Barthelemy F, Martin A.S, Douine E.D, Eskin A, Lucas A, et al. DMD genotype correlations from the Duchenne Registry: Endogenous exon skipping is a factor in prolonged ambulation for individuals with a defined mutation subtype. *Hum. Mutat.* 2018; 39:1193–1202.
- Wang X, Zhang Y, Nilsson CL, Berven FS, Andrén PE, Carlsohn E, et al. Association of chromosome 19 to lung cancer genotypes and phenotypes. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34(2):217-26.
- Wang XX, Wang XX, Chen T. Association between the CD40 rs1883832 polymorphism and Graves' disease risk: a meta-analysis. *EXCLI J.* 2019;18:10-20.
- Weiss RB, Vieland VJ, Dunn DM, Kaminoh Y, Flanigan KM; United Dystrophinopathy Project. Long-range genomic regulators of THBS1 and LTBP4 modify disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2018;84(2):234-45.
- Winnard AV, Mendell JR, Prior TW, Florence J, Burghes AH. Frameshift deletions of exons 3-7 and revertant fibers in Duchenne muscular dystrophy: mechanisms of dystrophin production. *Am J Hum Genet.* 1995;56(1):158-66.
- Zambon AA, Ayyar Gupta V, Ridout D, Manzur AY, Baranello G, Trucco F, Muntoni F; UK Northstar Clinical Network. Peak functional ability and age at loss of ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol.* 2022;64(8):979-988.
- Zinina E, Bulakh M, Chukhrova A, Ryzhkova O, Sparber P, Shchagina O, et al. Specificities of the DMD Gene Mutation Spectrum in Russian Patients. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):12710.

Публиковани радови који су резултат истраживања у оквиру доктората:

1. Kosac A, Pesovic J, Radenkovic L, Brkusanin M, Radovanovic N, Djurisic M, Radivojevic D, Mladenovic J, Ostojic S, Kovacevic G, Kravljanac R, Savic Pavicevic D, Milic Rasic V. *LTBP4*, *SPP1*, and *CD40* Variants: Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy Analyzed in Serbian Patients. *Genes*. 2022;13(8):1385. M22, IF 4,141
2. Kosac A, Milic Rasic V, Savic Pavicevic D, Kravljanac R. The role of gene modifiers on clinical course of Duchenne muscular dystrophy. *MedPodml* 2023; doi: 10.5937/mp74-41662.M52

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА:

АОН антисенс олигонуклеотид

БМД Бекерова мишићна дистрофија

bp базни пар

CD40L CD40 лиганд

C-H *Calinski-Harabasz*-ов индекс

CINRG-DNHS *Cooperative International Neuromuscular Research Group - Duchenne Natural History Study*

CI интервал поверења (*confidence interval*)

ЦНС централни нервни систем

DB *Davies-Bouldin*-ов индекс

DI *Dunn*-ов индекс

ДК дилатативна кардиомиопатија

ДМД Дишенова мишићна дистрофија

ДНК дезоксирибонуклеинска киселина

Др дистрофин протеин

ЕФ ејекциона фракција

ФВЦ форсирани витални капацитет

ФМ фракција масти

ГБ *Graves*-ова болест

ГР глукокортикоидни рецептори

HR однос хазарда (*hazard ratio*)

IAAM изолеуцин, аланин, аланин, метионин

ITTT изолеуцин, треонин, треонин, треонин

иРНК информациона рибонуклеинска киселина

КК кратин киназа

КМ *Kaplan–Meier*

КС кортикостероиди

LTBP4 latent transforming growth factor- β binding protein 4

Mdx анимални (миш) модел Дишенове мишићне дистрофије са мутацијом у *DMD* гену која доводи до стварања стоп кодона

MLPA *multiplex ligation-dependent probe amplification*

N број (*number*)

NFAT5 *nuclear factor of activated T-cells 5*

NF- κ B *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK *natural killer*

NSAA *North Star Ambulatory Assessment*

ОПН остеоопонтин

r коефицијент корелације

PCR *polymerase chain reaction*

ПБ Паркинсонова болести

ПФТ плућни функционални тестови

РНК рибонуклеинска киселина

САД Сједињене Америчке државе

S_Dbw *SDbw validity* индекс

СД стандардна девијација

SI *Silhouette* -ов индекс

SPP1 secreted phosphoprotein 1

TGF β *transforming growth factor beta*

TNF *tumor necrosis factor*

TNFRSF5 *tumor necrosis factor receptor superfamily member 5*

VTTT валин, треонин, треонин, треонин

VAAM валин, аланин, аланин, метионин

BK витални капацитет

УК Уједињено Краљевство

x средња вредност

БИОГРАФИЈА:

Ана Косаћ је рођена 20.11.1982. године у Београду.

Медицински факултет Универзитета у Београду је уписала 2001. године. Дипломирала је 2008. године. Од децембра 2010. године је запослена у Клиници за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду, на одељењу неурологије.

Специјалистичке академске студије из неурологије завршила је 2014. године, одбранивши рад под називом “Туберозно склерозни комплекс – стални терапијски и дијагностички изазов” под менторством Проф. др Небојше Јовића.

Докторске академске студије, смер неурологија, уписала је 2014. године на Медицинском факултету Универзитета у Београду.

Специјализирала је дечју неурологију у периоду 2014-2017. године, на Медицинском факултету у Београду и специјалистички испит положила октобра 2017. године са оценом одличан.

Члан је домаћих и иностраних удружења (Друштво младих неуролога Србије, Удружење дечјих неуролога Србије, Српско лекарско Друштво, Treat NMD, ILAE, EPNS), секретар је Удружења за клиничку неурофизиологију Србије.

Усавршавала се у 6 месечном периоду (2012-2013.) на Факултету у Њукаслу, Уједињено Краљевство, као стипендиста Интернационалне федерације за клиничку неурофизиологију. Прошла је едукацију из електромионеурографије и области неуромишићних обољења под менторством др R. Whittaker-а и Проф др Н. Lochmullera- а.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ана Косаћ

Број индекса НЕ 1/14

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Процена утицаја генетичких модификатора на клинички ток Дишенове мишићне дистрофије“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 04.07.2023

Ана Косаћ

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Косаћ

Број индекса НЕ 1/14

Студијски програм неурологија

Наслов рада „Процена утицаја генетичких модификатора на клинички ток Дишенове мишићне дистрофије“

Ментор Проф. Др Ведрана Милић Рашић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 04.07.2023

Ана Косаћ

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Процена утицаја генетичких модификатора на клинички ток Дишенове мишићне дистрофије“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 04.07.2023

Ана Косач

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.