

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО НЕВРОЛОГИЯ
УМБАЛ “АЛЕКСАНДРОВСКА”, КЛИНИКА ПО НЕРВНИ БОЛЕСТИ

Завеждащ Катедра: проф. д-р Юлия Петрова, дмн
Научна специалност 030119 Неврология

Д-р Ани Стефанова Танева-Рачева

Клинико- генетично и генетично- епидемиологично
проучване на пояс- крайник прогресивни мускулни
дистрофии в България.

Дисертация
за присъждане на образователно научна степен “Доктор”

Научни ръководители:
Проф. д-р Ивайло Людмилов Търнев, дмн
Доц. д-р Теодора Кънчева Чамова, дм

София, 2022 година

Съдържание

Въведение	5
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	6
1.1. История:	6
• Ситуацията в България	7
1.2. Класификация и номенклатура	7
1.3. Епидемиология	12
1.4. Етиология и патогенеза на мускулното увреждане:	13
1.5. Подтипове ПКМД :	14
1.5.1. Калпаинопатии	14
1.5.1.1. AP калпаинопатия, ПКМД2A, R1- калпаин-3 асоциирана	14
1.5.1.2. AD калпаинопатия, ПКМД D4- калпаин 3 асоциирана	23
1.5.2. Саркогликанопатии	24
1.5.2.1. ПКМД 2C, γ -саркогликанопатия	30
1.5.2.2. ПКМД 2D, α -саркогликанопатия	32
1.5.2.3. ПКМД 2E, β -саркогликанопатия	34
1.5.2.4. ПКМД 2F, δ -саркогликанопатия	35
1.5.3. Z-диск протеинопатии:	37
1.5.3.1. ПКМД2J/R10 - титин-асоциирана	37
1.5.3.2. ПКМД2Q/R17 плектин- асоциирана	40
1.5.3.3. ПКМД2G/R7- телетонин асоциирана	43
1.5.3.4. ПКМД 1D – DNAJB6 свързана	46
1.5.4. Алфадистрогликанопатии:	48
1.5.4.1. ПКМД 2I/ R9 FKRP- асоциирана	51
1.5.4.2. ПКМД 2K/ R11 POMT1-асоциирана	53
1.5.4.3. ПКМД 2M/ R13 фукутин- асоциирана	54
1.5.4.4. ПКМД 2N/ R14 POMT2-асоциирана	55
1.5.4.5. ПКМД 2M/ R15 POMGnT1-асоциирана	56
1.5.4.6. ПКМД 2P/ R16 DAG1 (α -дистрогликан) асоциирана	56
1.5.4.7. ПКМД2 S/ R18- TRAPPC11- асоциирана	57
1.5.4.8. ПКМД 2T/ R19- GMPPB – асоциирана	59
1.5.4.9. ПКМД 2U/ R20 – ISPD- асоциирана	60
1.5.4.10. ПКМД 2Z / R21- POGLUT1 асоциирана	61
1.5.4.11. ПКМД R24 POMGNT2-асоциирана	63
1.5.5. ПКМД с дефекти в мембранната репарация:	63
1.5.6. ПКМД R23- ламинин α 2 асоциирана	70
1.5.7. Автозомно- доминантни форми	71
1.5.8. COLL6 свързани ПКМД	74
1.6. Диагностициране на пациенти с ПКМД:	75
1.7. Диференциална диагноза на ПКМД:	77
1.8. Проследяване, лечение и грижи за пациентите с ПКМД	83
• Сърце, дишане и диета	83
• Помощни устройства	84
• Трудова терапия и рехабилитация	84
• Ортопедични усложнения	85

•	Бъдещи стратегии за лечение	85
1.9.	Изводи от литературния обзор:	89
2.	<i>Цел и задачи</i>	90
2.1.	Цели на проучването:	90
2.2.	Задачи на проучването:.....	90
3.	<i>Клиничен контингент и методи на изследване</i>	91
3.1.	Контингент	91
3.2.	Методи на изследване.....	91
4.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	96
4.1.	Генотип-фенотип корелации и епидемиологични данни при групите с ПКМД	96
4.1.1.	Гамасаркогликанопатия	96
4.1.2.	Калапаинопатия	103
4.1.3.	Телетонинопатия	119
4.1.4.	ПКМД 2Z/R21- POGLUT1 асоциирана	128
4.1.5.	Аноктаминопатия.....	135
5.	ИЗВОДИ	138
6.	ПРИНОСИ	139
7.	ЛИТЕРАТУРА:	140
8.	ПРИЛОЖЕНИЯ	181
9.	НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: 183	

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

АД – Автозомно- доминантен	ПМД- Прогресивна мускулна дистрофия
АК- Аминокиселини	СГ- Саркогликан
АР- Автозомно- рецесивен	СГК- Саркогликанов комплекс
ВМД- Вродени мускулни дистрофии	СК- Сателитни клетки
ДГ- Дистрогликан	ТБС- Тазобедрена става
ДГК- Дистрогликанов комплекс	ФВК- Форсиран витален капацитет
ДМД-Дюшен мускулна дистрофия.	ФЕО1- Форсиран експираторен обем
ЕДМД – Емери-Драйфус мускулна дистрофия	ФИ- Фракция на изтласкване
ЕКГ- Електрокардиография	ФСХД- Фациоскапулохумерална мускулна дистрофия
ЕМГ- Електромиография	ЦНС- Централна нервна система
ЕНГ- Електроневрография	аДГ- Алфа-дистрогликан
ЕР- Ендоплазмен ретикулум	AAV- аденоасоцииран вирус
ЕхоКГ- Ехокардиография	CMS- Congenital Myasthenic syndrome
ENMC- The European Neuromuscular Centre	IQ- intelligence quotient
КФК- Креатин фосфокиназа	NGS- Next generation sequencing
МД- мускулна дистрофия	PCR- Polymerase Chain Reaction
МРТ- Магнитно резонанса томография	SCARMD- severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy
ПКМД- Пояс-крайник мускулна дистрофия	WES- Whole Exome sequencing
	WWS- Walker Warburg Syndrome

Клинико- генетично и генетично- епидемиологично проучване на пояс- крайник прогресивни мускулни дистрофии в България

Въведение

Наследствените миопатии включват широк спектър клинично, биохимично и генетично различни мускулни заболявания. Някои от тях са известни още от 19 век, а в последствие те са свързани с няколкостотин патогенни варианта в отделни гени, като всяка година се идентифицират нови мутации и гени, водещи до заболяване.

Сред тях, пояс-крайник прогресивната мускулна дистрофия (ПКМД) включва широка и хетерогенна група наследствени мускулни заболявания, обединени поради наличието на слабост на проксималните тазови или раменни мускули. Клиничният фенотип варира и включва тежки форми с ранно начало в детска възраст, такива с начало в юношеска възраст и по-леки форми с късно начало, при които засегнатите индивиди имат бавна прогресия на мускулната слабост и относително запазена продължителност на живота. Поради изразената генетична хетерогенност молекулярно- генетичната диагноза все още остава предизвикателство.

Основна цел на настоящото изследване е проучване на клинико- генетичните корелации и генетичната епидемиология на формите на Прогресивна мускулна дистрофия тип пояс- крайник в България.

До този момент не е провеждано подобно проучване в България, което да обобщи тази патология в българската популация, да фенотипизира българските пациенти и да определи спецификата на разпространение на заболяването. Това би могло да бъде в полза при диагностицирането на подобни случаи в бъдеще, както и да даде основата за профилактика и лечение на някои от установените форми.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. История:

Терминът Пояс-крайник мускулна дистрофия (ПКМД) е въведен за първи път от John Walton и Frederick Natrass през 1954г. Те отграничават тази клинична форма като самостоятелна нозологична единица, описвайки я като мускулна дистрофия с начало от детска до късна възраст, ангажираща първоначално мускулите на раменния или тазовия пояс, с автозомно- рецесивен (АР) тип на унаследяване. Описват значителната вариабилност в клиничното протичане, сравнявайки с познатите прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен (ПМД) и фациоскапулохумерална мускулна дистрофия (ФСХД), които имат по-ясен ход на прогресия [Walton and Natrass и съавт., 1954].

На базата на началото на мускулната слабост, ПКМД първоначално са били поделени на Erb фенотип (скапуло- хумерален), Leyden-Möbius фенотип (ангажиращ тазовия пояс), и Miyoshi фенотип (предимно дистален тип) [Vissing J и съавт., 2016].

През 1991г. Beckmann и съавт. за първи път свързват конкретна форма на ПКМД с мутация в конкретен ген- *CAPN3* [Beckmann J S и съавт., 1991]. В последствие се появяват още няколко доклада за отделни форми на ПКМД, унаследяващи се АД или АР, [Ben Othmane K и съавт., 1992, Azibi K и съавт., 1993, Beshir R и съавт., 1994, Roberts S и съавт., 1994].

През 1995г., вследствие на данните, подчертаващи генетичната хетерогенност на тази група заболявания, на Консорциум на Европейския център за невромускулни заболявания (ENCM) се стига до консенсус за създаване на единна номенклатура на Прогресивната мускулна дистрофия тип пояс-крайник. Въвеждат се включващи и изключващи критерии- клинични и генетични, които да се имат предвид при поставянето на диагнозата ПКМД [Bushby KMD и съавт., 1995].

Терминът ПКМД се развива, като към 2014г. определението се отнася за генетично хетерогенна група от автозомно унаследяващи се мускулни дистрофии, споделящи общ фенотип, който се състои от следните компоненти: прогресивна слабост и атрофия на мускулите на тазовия и или раменния пояс; начало след 2 годишна възраст, вариращи стойности на креатинфосфокиназа (КФК) от нормални до силно повишени; разнообразни патологоанатомични находки, демонстриращи от

неспецифични миопатни до дистрофични промени. [Narayanaswami P и съавт., 2014, Kang PB и съавт., 2015].

- **Ситуацията в България**

С. Божинов и съавт. за първи път описват пациенти с миопатии, между които е и група от 8 засегнати с клинична диагноза Пояс-крайник мускулна дистрофия. [Божинов С и съавт., 1973]

Б. Ишпекова и И. Миланов през 1996г. проучват значението на ЕМГ изследването при диференциална диагноза на пояс-крайник тип мускулна слабост. [Ishpekova B. и съавт., 1996]. Те заключават, че електромиографията и мускулната биопсия са полезни при диференцирането на различни видове пояс- крайник синдроми, както и при определяне на точния модел на мускулно засягане.

И. Търнев описва в Източна Европа за първи път гама- саркогликанопатия през 1997 г. [Tournev I и съавт., 1998], а през 2005г. Б. Георгиева и колектив описват първите пациенти с AP калпаинопатия, носители на 550delA в *CAPN3* гена. [Georgieva B и съавт., 2005].

1.2. Класификация и номенклатура

До скоро номенклатурата включваше цифрено- буквена комбинация, съдържаща цифрата „1“ за доминантните форми и „2“ за рецесивните. И двете групи се класифицират допълнително, като се използва система от букви по азбучен ред, определяща се от хронологичния ред на свързването на конкретен фенотип с определен генетичен локус [Bushby K M D и съавт., 1995].

Към днешна дата са идентифицирани повече от 30 гена, асоциирани с различни подтипове на ПКМД, повече от които са AP. [Li C и съавт., 2022].

Бройката на формите на ПКМД е нараснала с годините до общо 34 (26 ПКМД2 и 8 ПКМД1), според базата данни 2022 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) за 2022г.

Най-общо, според клиничните характеристики, ПКМД 1 и ПКМД2 могат да се сравнят по следния начин, представен на таблица 1 [Liewluck T и съавт., 2018].

Таблица 1. Сравнителна характеристика на AP и АД форми на ПКМД.

	ПКМД1	ПКМД2
унаследяване	АД	AP
подтипове	1A-1H	2A-2Z
възраст на начало	1B-1D могат да бъдат е начало в детска възраст	начало от детска до късна възраст.
тежест на слабостта	леко изразена	умерена до тежка
стойности на КФК	нормални до леко повишени	умерено до много повишени
нетолерантност към физическо натоварване, рабдомиолиза	не	2A, 2B-2E, 2I, 2L, 2T

Всички тези особености налагат да се постигне консенсус относно актуализираната дефиниция на ПКМД, да се оценят текущите подтипове, след което да се предложи нова класификация. Това води до провеждането на 229ти Международен консорциум на Европейския център по невромускулни заболявания в Наарден, Холандия през март 2017 с тема „Пояс- крайник мускулни дистрофии- номенклатура и обновена класификация“. На тази среща се поставят нови критерии за поставянето на диагнозата ПКМД, включени в самото определение. То гласи „Пояс- крайник мускулна дистрофия е наследствено генетично заболяване, което засяга предимно скелетните мускули, водещо до прогресивна, предимно проксимална мускулна слабост в началото, причинена от увреждане на мускулни влакна. За да се смята за форма на ПКМД, заболяването трябва да бъде описано в поне две несвързани семейства, като засегнатите са имали възможна самостоятелна походка, трябва да имат повишена креатинфосфокиназа (КФК) в хода на заболяването, да имат дистрофични промени в хистологичната находка, което в крайна сметка води до патология в краен стадий за най-засегнатите мускули“. [Straub V и съавт., 2018]

Като най-подходяща се избира следната нова номенклатура- отново е включен типът на унаследяване, поради значението на генетичното консултиране след диагностициране на такива пациенти. Доминантните форми се обозначават с „D“, а рецесивните- с „R“. Буквата „X“ ще се има предвид при откриване на X-свързани

ПКМД. За да се избегнат грешки и неточности, е решено да се включат подробности за засегнатия протеин. Това позволява групирането на ПКМД в кохорти с подобни засегнати протеини и фенотипове, подходящо за клинични изпитвания. Редът на откриване на засегнатия протеин е отбелязан с цифра. Това отразява историята на ПКМД и позволява по-добро разграничаване между подтиповете [Straub V и съавт., 2018].

Прилагайки новото определение към текущия списък на ПКМД, 10 от заболяванията не отговарят на критериите за поставяне на тази диагноза. Съответно актуализираната класификация изглежда по следния начин, като в таблицата са посочени кои форми отпадат, кои заболявания се добавят и причините за това. (Таблица 2) [Straub V и съавт., 2018].

Таблица 2. Генетична класификация на ПКМД (1995 г. и 2018 г.) (Национален консенсус за диагностика, лечение и профилактика на наследствените невромускулни заболявания).

Заболяване по класификацията от 1995 г.	Ген/локус/белтък	Субгрупа	Заболяване по класификацията от 2018 г.	Причина за изключване от групата на ПКМД
ПКМД1А	MYOT/Myotilin	Z- диск протеинопатии	Миофибрилерни миопатии	Наличие на дистална слабост
ПКМД1В	LMNA/ Lamin A/C	Заболявания на ядрената мембрана	Emery-Dreifuss мускулна дистрофия (EDMD)	Сърдечни аритмии, отнесени към EDMD
ПКМД1С	CAV3/ Caveolin-3	Кавеоло- асоциирани мускулни дистрофии	Rippling muscle disease	Rippling muscle disease, миалгии
ПКМД1D	DNAJB6/ DNAJ/Hsp40 homolog, subfamily B, member 6	Z- диск протеинопатии	ПКМД D1 DNAJB6-related	

ПКМД1Е	DES/Desmin	—	Миофибрилерни миопатии	Кардиомиопатия, дистална слабост
ПКМД1F	TNPO3/ Transportin-3	Заболявания на ядрената мембрана	ПКМД D2 TNPO3- свързана	
ПКМД1G	HNRNPDL/ Heterogeneous ribonucleoprotein D-like protein	—	ПКМД D3 HNRNPDL- свързана	
ПКМД1H	3p23-p25.1/ Неизвестен	—	Не е потвърдена	Погрешен линкидж
ПКМД1I	CAPN3/ Calpain-3	Калпаинопатия	ПКМД D4 calpain3- свързана	
ПКМД2A	CAPN3/ Calpain-3	Калпаинопатия	ПКМД R1 calpain3- свързана	
ПКМД2B	DYSF/ Dysferlin	Мускулни дистрофии с нарушено възстановяване на клетъчната мембрана	ПКМД R2 dysferlin- свързана	
ПКМД2C	SGCG/ γ -sarcoglycan	Саркогликанопатии	ПКМД R5 γ -sarcoglycan- свързана	
ПКМД2D	SGCA/ α -sarcoglycan	Саркогликанопатии	ПКМД R3 α -sarcoglycan- свързана	
ПКМД2E	SGCB/ β -sarcoglycan	Саркогликанопатии	ПКМД R4 β -sarcoglycan- свързана	
LGMD2F	SGCD/ δ -sarcoglycan	Саркогликанопатии	ПКМД R6 δ -sarcoglycan- свързана	
ПКМД2G	TCAP/ Telethonin	Z-диск протеинопатии	ПКМД R7 telethonin- свързана	
ПКМД2H	TRIM32/ Tripartite motif containing -32	—	ПКМД R8 TRIM32 свързани	
ПКМД2I	FKRP/ Fukutin-related protein	α -дистрогликанопатии	ПКМД R9 FKRP- свързани	

ПКМД2J	TTN/ Titin	Z-диск протеинопатии	ПКМД R10 Titin-свързана	
ПКМД2K	POMT1/ Protein-O- mannosyl transferase-1	α - дистрогликанопатии	ПКМД R11 POMT1- свързана	
ПКМД2L	ANO5/ Anoctamin-5	Мускулни дистрофии с нарушено възстановяван е на клетъчната мембрана	ПКМД R12 anoctamin5-свързана	
ПКМД2M	FKTN/ Fukutin	α - дистрогликанопатии	ПКМД R13 Fukutin- свързана	
ПКМД2N	POMT2/ Protein-O- mannosyl transferase-2	α - дистрогликанопатии	ПКМД R14 POMT2- свързана	
ПКМД2O	POMGNT1/ Protein- O- mannose b-1,2-N-acetylglucosaminyl transferase	α - дистрогликанопатии	ПКМД R15 POMGnT1- свързана	
ПКМД2P	DAG1/ Dystrophin-associated glycoprotein-1 (α -dystroglycan)	α - дистрогликанопатии	ПКМД R16 α -dystroglycan-свързана	
ПКМД2Q	PLEC1/ Plectin	Z- дискпротеинопатии	ПКМД R17 plectin- свързана	
ПКМД2R	DES/ Desmin	Z- дискпротеинопатии	Миофибрилерни миопатии	Дистална слабост
ПКМД 2S	TRAPPC11/ Transport protein particle complex 11	α - дистрогликанопатии	ПКМД R18 TRAPPC11- свързана	
ПКМД 2T	GMPPB/ GDP-mannose pyrophosphorylase B	α - дистрогликанопатии	ПКМД R19 GMPPB-свързана	
ПКМД 2U	ISPD/ Isoprenoid synthase domain-containing protein	α - дистрогликанопатии	ПКМД R20 ISPD-свързана	
ПКМД 2V	GAA/ α -1,4-glucosidase	—	Болест на Помпе	Метаболитна миопатия

ПКМД2W	LIMS2/ LIM и senescent cell antigenlike domains 2	—	PINCH-2 свързана миопатия	При 1 семейство
ПКМД2X	POPDC1/ Popeye domain-containing protein 1	Заболявания на ядрената мембрана	BVES- свързана миопатия	При 1 семейство
ПКМД2Y	TOR1AIP1/ Torsin-A interacting protein 1 или lamin-associated protein 1	Заболявания на ядрената мембрана	TOR1AIP1- свързана миопатия	При 1 семейство
ПКМД2Z	POGLUT1/ Protein O-glucosyltransferase 1	α - дигликозилопатия	ПКМД R21 POGLUT1- свързана	
Bethlem миопатия- AP	COL6A1, COL6A2, COL6A3	-	ПКМД R22 collagen 6- свързана	
Bethlem миопатия- АД	COL6A1, COL6A2, COL6A3	-	ПКМД D5 collagen 6- свързана	
Laminin α 2- свързана мускулна дистрофия	LAMA2	-	ПКМД R23 laminin α 2- свързана	
POMGNT2- Свързана мускулна дистрофия	POMGNT 2	α - дигликозилопатия	ПКМД R24 POMGNT2- Свързана	

1.3. Епидемиология

В световен мащаб, като група, ПКМД е четвъртата по честота мускулна дистрофия, с разпространение от 1.63 на 100, 000 (с вариация 0.56-5.75 на 100,000), следваща дистрофинопатиите, миотоничните дистрофии и ФСХД [Mah J K и съавт., 2016].

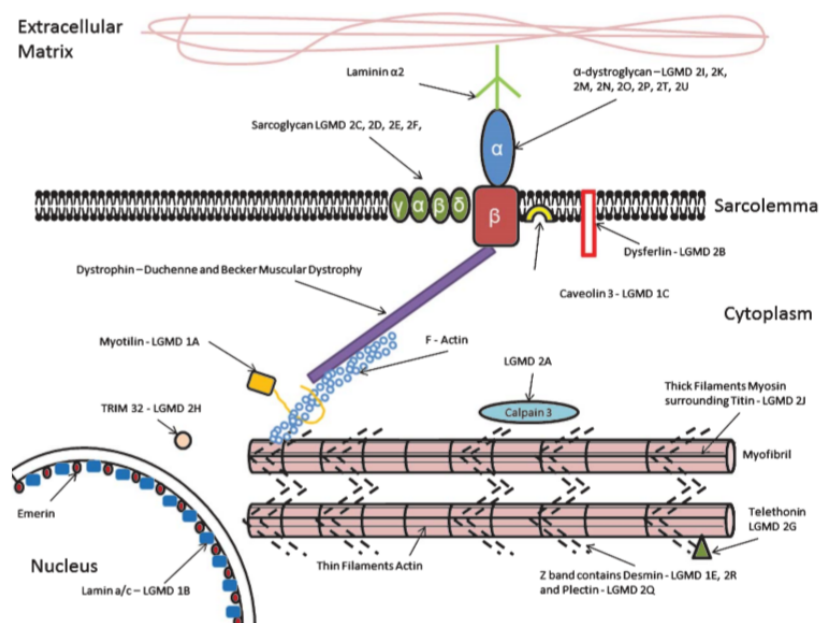
Автозомно-доминантно унаследяваните форми са по-рядко срещани и на тях се падат 5-10% от всички ПКМД. [Van der Kooy AJ и съавт., 1993, Bushby KMD и съавт., 1992].

Има голяма вариация в разпространението на подгрупите на ПКМД в различните етнически групи, предполагащо потенциален ефект на родоначалника

[Hicks D и съавт., 2011]. Те ще бъдат разгледани в съответните раздели за различните форми. Като най-чести форми, според докладваните случаи, се очертават ПКМД 2A/R1 (26.5-30%), след нея ПКМД 2L/R12 (19%), които варират спрямо популациите [Norwood FL и съавт., 2009, Magri F и съавт., 2012]. ПКМД 2C/R5 е особено разпространена в Северноафриканско и ромско население [Piccolo F и съавт., 1996, Merlini L и съавт., 2000, И Търнев., 2000].

1.4. Етиология и патогенеза на мускулното увреждане:

Различните форми на ПКМД нямат общ патофизиологичен механизъм. В зависимост от това, функцията на кой специфичен протеин е дефектна, могат да бъдат засегнати различни патофизиологични пътища и субклетъчни структури. Възможните патогенетични механизми включват мембранна нестабилност, грешки във формирането на функционален дистрогликанов комплекс (α -дистрогликанопатии), абнормен мембранен интегритет (саркогликани); абнормни мембранна репарация (дисферлинопатии); дефектна гликозилация на алфа-дистрогликана; абнормна полимеризация на кавеолини и тяхното акумулиране в апарата на Golgi (кавеолинопатии); загуба на протеолитична активност, абнормна ядрена апоптоза (калпаин 3 свързани МД); абнормен саркомерен механизъм на Z-линията (телетонинопатии, миотилинопатии, филамин С свързани МД); абнормен саркомерен механизъм (титинопатии) (фигура 1). [Thompson R и съавт., 2016].



Фигура 1. Изображение на организацията на сарколемата и подтиповете ПКМД, свързани с дефект във всеки протеин. От особено значение за стабилността на миоцита е дистрофин- гликопротеиновият комплекс- силно гликозилирана олигомерна структура, която свързва извънклетъчния матрикс със субсарколемния цитоскелет.

1.5. Подтипове ПКМД :

На базата на патогенезата на мускулното увреждане, формите на ПКМД могат да бъдат обособени в следните подгрупи [Liewluck и съавт., 2018]:

- калпаинопатии,
- саркогликанопатии
- Z-диск протеинопатии
- α -дискрогликанопатии.
- ПКМД с дефект в мембранната репарация

1.5.1. Калпаинопатии

1.5.1.1. AP калпаинопатия, ПКМД2А, R1- калпаин-3 асоциирана

Синоними: limb-girdle type 2a muscular dystrophy, limb-girdle type 2; Lgmd2, pelvofemoral muscular dystrophy, Leyden-Moebius muscular dystrophy, calpainopathy, calpain 3-related, limb-girdle muscular dystrophy type R1, Lgmdr1

ПКМД 2A/R1 калпаин-3 свързана е най-честата форма от ПКМД в световен мащаб, обхващаща около 30 % от случаите [Richard I и съавт., 2016].

През 1991, изучавайки семейства от остров “La Reunion”, Jacques Beckmann свързва фенотипът на ПКМД за първи път с минималната критична област (МКО), която се намира на хромозома 15q [Beckmann J и съавт., 1991] В последствие е потвърдено, че мутации, които са установени в този локус- 15q при *Homo sapiens* *CAPN3* гена, кодиращ протеолитичния ензим калпаин 3, са причина за този фенотип [Richard I и съавт., 1995].

ПКМД 2A/R1 [MIM 253600] е една от най-разпространените форми на автозомно-рецесивна мускулна дистрофия във всички изследвани досега страни и е причинена от загуба на функционални мутации в гена *CAPN3*. Човешкият *CAPN3* ген съдържа 24 екзона, обхваща геномна област от 50 kb и се експресира като транскрипт от 3,5 kb (2466 кодиращи нуклеотиди). Той транскриптира Калпаин-3, който е ензимен протеин с приблизително 94 kd молекулно тегло, съставен от 821 аминокиселини [Richard I и съавт., 1995]. Калпаин-3 е специфичен за мускулите член на семейството на Ca^{++} - активирани неутрални протеази, които разцепват протеините на къси полипептиди. Той е член на суперсемейството на калпаините, което включва различни вътреклетъчни кинази, фосфатази, фосфолипази, транскрипционни фактори и цитоскелетни протеини.

Мускулната тъкан експресира само една изоформа (пълноверижен транскрипт), докато левкоцитите експресират четири различни транскрипта (произведени чрез алтернативно сплайсиране на екзони 6,15,16) [Blázquez и съавт., 2008]. Калпаин-3 се експресира предимно в скелетните мускули. При стимулация Калпаин-3 се активира и инактивира бързо чрез автокатализа. В саркомерите калпаин-3 директно се свързва с титин [Keiga и съавт., 2003] и променя локализацията си от М-линиите към NA2 регионите, докато саркомерите се разширяват.

Повечето хора с калпаинопатия имат пълен или частичен дефицит на Калпаин-3 протеин от изследване на биопсичен материал от мускул. При 10 -30% от пациентите с калпаинопатия мускулната биопсия показва нормално количество протеин [Talim и съавт., 2001, de Paula и съавт., 2002, Fanin и съавт., 2004, Groen и съавт., 2007, Milic и съавт., 2007, Fanin и съавт., 2009b], въпреки че Калпаин-3 може да е загубил своята автокаталитична активност и да е функционално неактивен [Fanin и съавт., 2003, Fanin и съавт., 2007b]. Подвижността на Калпаин-3 между саркомерните М-линии и цитозола може да има ключова роля при физически стрес и е нарушена при калпаинопатия, когато неговата протеазна активност е загубена. Нарушаването на протеолитичната активност на калпаин води до ремоделиране на саркомера чрез стимулиране на убиквитин- медирано разграждане на саркомерни протеини [Duguez и съавт., 2006]. Нарушеното ремоделиране на саркомера също би повлияло сливането и възстановяването на миобластите, както и регенеративния

капацитет на мускулите при заболяването. Активирането на процеса на мускулна атрофия зависи главно от индукцията на убиквитин-протеазомната система. [Fanin и съавт., 2013].

Смята се, че Калпаин-3 обработва протеини, участващи в сигналните пътища, транскрипционни фактори, калциевия транспорт и цитоскелетните протеини като част от процес, наречен ремоделиране на саркомера, при който синтезът на нови протеини се балансира от разграждането на неправилно нагънатите протеини. [Baghdiguian и съавт., 1999, Baghdiguian и съавт., 2001, Kramerova и съавт., 2005, Duguez и съавт., 2006, Kramerova и съавт., 2007, Beckmann & Spencer 2008, Benayoun и съавт., 2008, Kramerova и съавт., 2008, Sáenz и съавт., 2008, Fanin и съавт., 2009, Ono и съавт., 2010, Ermolova и съавт., 2011].

По-голямата част от патогенните варианти на *CAPN3* водят до загуба на функция и обуславят рецесивно заболяване. Предполага се, че някои от мутации причиняват неправилна локализация и / или намалена стабилност на ензима. [Ermolova N и съавт., 2011, Garnham C и съавт., 2009]. Обсъжда се и идеята, че нарушаването на взаимодействието на Calmodulin-CAPN3 и нарушеното автолитично активиране може да бъде основният патогенен механизъм за някои мутации на ПКМД 2A/R1 [Kramerova I и съавт., 2007, Fanin M и съавт., 2003].

Предполага се, че механизмът, чрез който патогенните варианти на *CAPN3* водят до доминантно заболяване е доминантно- отрицателен ефект [Vissing и съавт., 2016]. Тъй като активният калпаин-3 е хомодимер, анормалният протеин може да се полимеризира с дивия протеин и да направи комплекса неактивен.

Към днешна дата няма единодушна концепция за функциите на калпаините. Изглежда, че всички те демонстрират ограничена протеолиза на своите субстрати и се смята, че имат по-скоро регулаторни, а не разграждащи клетъчни функции [Ermolova N и съавт., 2015].

Мутациите в *CAPN3* гена са разпределени в почти всички екзони на гена, като девет екзона (1, 4, 5, 7, 10, 11, 13, 21 и 22) обхващат около 85% от случаите. Повечето мутации (70%) са частни варианти, въпреки че определени мутации са по-чести в някои популации. [Chae J и съавт., 2001].

Според Leiden Open Variation Database са докладвани повече от 490 патогенни варианта в *CAPN3* [Anderson и съавт., 1998, de Paula и съавт., 2002, Zatz и съавт., 2003,

Fanin и съавт., 2004], повечето от които са еднонуклеотидни замени. Приблизително 70% от абнормните алели са безсмислени мутации, останалите са разновидности от мутации със загуба на функция (малки делеции или инсерции, причиняващи изместване на рамката на четене и преждевременен стоп кодон, безсмислени и splice-site мутации). [Richard и съавт., 1999]. Около 25% от патогенните варианти в *CAPN3* са разположени на границите на екзон-интрон и причиняват абнормен сплайсинг [Krahn и съавт., 2007, Blázquez и съавт., 2008, Nascimbeni и съавт., 2010]. Много дълбоки интронни патогенни варианти, които нарушават правилното снаждане, могат да бъдат пропуснати чрез секвениране на геномна ДНК [Krahn и съавт., 2007], като тяхната идентификация може да изисква секвениране на кДНК, получена от мускулни или кръвни тъкани [Krahn и съавт., 2006а, Blázquez и съавт., 2008, Nascimbeni и съавт., 2010]. Съобщават се за дълбоки интронни варианти, причиняващи псевдо-екзонизация на интронна последователност [Blázquez и съавт., 2008, Blázquez и съавт., 2013], както и за големи делеции на екзони, най-честата от които е делеция на 31,012 bp на екзони 2-8 (с.309 + 4469_с.1116-1204del). [Richard и съавт., 1999, Joncourt и съавт., 2003, Krahn и съавт., 2007, Todorova и съавт., 2007, Ginjaar и ставт., 2008, Nascimbeni и съавт., 2010, Piluso и съавт., 2011, Bartoli и съавт., 2012]. Тъй като тази делеция се повтаря при калпаинопатия при индивиди от различен етнически произход, това вероятно се дължи на независими мутационни събития [Todorova и съавт., 2007]. Понякога се съобщава за геномни пренареждания на Alu елементи [Salem и съавт., 2012], цяла делеция на гена *CAPN3* [Jaka и съавт., 2014] и мутации на синонимни кодони. [Richard & Beckmann 1995]. Единичен хетерозиготен патогенен вариант с.643_663del21 в *CAPN3* води до АД форма на калпаинопатия [Vissing и съавт., 2016]. За отбелязване е, че този вариант е идентифициран в хетерозиготно състояние с други патогенни варианти в *CAPN3*, включително с.2362_2363delinsTCATCT, с.550delA, р.Ala45Thr и р.Asp419Gly [Richard и съавт., 1997, Groen и съавт., 2007, Sáenz & López de Munain, 2017].

Много патогенни варианти са наблюдавани многократно при различни популации. Мутацията с.550delA, представляваща нуклеотидна делеция, е най-честата (около 75% от случаите) в европейските страни [Fanin M и съавт., 2015].

Патогенните варианти, които се повтарят в следните популации, са най-вероятно резултат от ефект на родоначалника, последван от генетична изолация.

Особено при малки популации, натрупването на специфични патогенни варианти (наричани още "**частни мутации**") може да се обясни с кръвно родство, свързано с исторически, демографски или културни / религиозни фактори:

- Остров Реюнион в Индийския океан (с.946-1G> A), [Fardeau и съавт., 1996]
- Общност на амишите от стария ред в северната част на Индиана, САЩ (стр. Arg769Gln), [Young и съавт., 1992, Richard и съавт., 1995]
- Русия, Хърватия, Турция, Чехия, България, Германия, Италия, Полша (с.550delA) [Dinçer и съавт., 1997, Погода и съавт., 2000, Canki-Klain и съавт., 2004, Chrobáková и съавт., 2004, Fanin и съавт., 2005, Milic & Canki-Klain 2005, Balci и съавт., 2006, Hanisch и съавт., 2007, Todorova и съавт., 2007, Stehlíková и съавт., 2014, Dorobek и съавт., 2015]. Този патогенен вариант може да произхожда от региона на Източното Средиземноморие [Негмановá и съавт., 2006]
- Провинция Гипускоа в баската държава Испания и в Бразилия (с.2362_2363delAGinsTCATCT) [Urtasun и съавт., 1998, de Paula и съавт., 2002]
- Япония (с.1795_1796insA) [Kawai и съавт., 1998, Chae и съавт., 2001]
- Село Chioggia във венецианската лагуна на Италия (р.Arg490Gln). [Fanin и съавт., 2005]
- Общност Mòcheni в долината на река Ферсина в италианските Алпи (с.1193 + 6T> A), [Fanin и съавт., 2012]
- Общност на Agarwal в Северна Индия (р.Asp780His, с.2099-1G> T, с.2051-1G> T), [Ankala и съавт., 2013, Khadilkar и съавт., 2016]
- Страни от Северна Европа, включително Обединеното кралство, Норвегия, Швеция, Дания (преобладаващо наследени с.643_663del21) [Vissing и съавт., 2016]
- Село Tлахсала в централно Мексико (р. Ala116Asp) [Pantoja-Melendez и съавт., 2017]

Клиничната картина на калпаинопатията се характеризира със симетрична и прогресираща слабост на поясната и проксималната мускулатура. Възрастта на начало на мускулна слабост варира от 2 до 40 г. Пациентите обикновено са с нормално двигателно развитие. Наблюдава се изразена интра- и интерфамилна клинична вариабилност, включваща от тежки до леко протичащи форми [Richard и съавт., 1999, Fanin & Angelini 2015].

Описани са три основни фенотипа на AP калпаинопатия на базата на вида на мускулната слабост и възрастта на начало: [Angelini и съавт., 2005]

- Пелвифемурална ПКМД (Leyden-Möbius тип), най-често срещаният фенотип наблюдаван при калпаинопатия. Мускулната слабост първоначално се появява на тазовия пояс и в последствие в раменния. Възрастта на начало може да е рано (<12 години), при възрастни (12-30 години), или късно (>30 години). Пациентите с ранно начало и бърза прогресия на заболяването обикновено имат пелвифемурална ПКМД.
- Скапулохумерална ПКМД (Erb тип), при която мускулната слабост първоначално се проявява в раменния пояс, а по-късно в тазовия. Ранното начало е рядко, ходът на заболяването е вариабилен, но обикновено по-леко протичащ от пелвио- фемуралния тип.
- Асимптомно повишаване на КФК, като повишаването на КФК може да бъде прието като пресимптоматичен стадий на калпаинопатия, както е било наблюдавано при деца или млади хора с AP форма [Fanin и съавт., 2009а, Kyriakides и съавт., 2010]. Асимптомни пациенти с потвърдена генетично калпаинопатия могат да развият мускулна слабост на по- късен етап.

Първите клинични прояви на калпаинопатията обичайно са ходене на пръсти, затруднено тичане, криловидни лопатки. В ранните стадии на заболяването често се наблюдават клатушкаща се походка и леко изразена лумбална хиперлордоза, симетрична мускулна слабост [Matsubara и съавт., 2007] повече за проксималните, отколкото дисталните мускули на крайниците, торса и перискапуларната мускулатура.

M. gluteus maximus, аддукторната група и задната група мускули на крайниците са по-тежко засегнати [Fardeau и съавт., 1996, van der Kooi и съавт., 1996, Dinçer и съавт., 1997, Topaloglu и съавт., 1997, Urtasun и съавт., 1998], а лицевите и шийните мускули обикновено са съхранени. Наблюдават се криловидни лопатки, набелязана отпуснатост на коремните мускули, [Bushby и съавт., 1999, Pollitt и съавт., 2001] ранни контрактури на Ахилесовите сухожилия и сколиоза.

Вариращи симптоми:

- Мускулни болки;
- Нетолерантност към физически натоварвания;

- Повишено образуване на лактат, наподобяващо това при псевдометаболитна миопатия [Rénilsson-Besnier и съавт., 1998, Pollitt и съавт., 2001];
- Еозинофилен миозит като ранна и преходна находка, с повишени стойности на КФК, която не се открива при по-възрастните индивиди [Brown & Amato 2006, Krahn и съавт., 2006b, Krahn и съавт., 2011];
- Значителна атрофия на мускулите на подбедриците или по-рядко хипертрофия на подбедриците;
- Рабдомиолиза (с или без миоглобинурия), предизвикана от физическо натоварване, често наблюдавана при асимптомни пациенти или такива с леко мускулно засягане [Lahoria & Milone 2016].

В напредналите стадии на заболяването често се наблюдават невъзможност за изкачване на стълби, изправяне от седнало положение, вдигане на тежести с ръцете или вдигането им от пода, ставни контрактури (на ТБС, колена, лакти, пръсти). По-рядко са описани ригиден гръбначен стълб [Pollitt и съавт., 2001], нарушена дорзална флексия на стъпалото с „foot drop” [Burke и съавт., 2010], дихателна недостатъчност с намален белодробен витален капацитет до 30-50% поради слабост на диафрагмата, гръдните и коремните мускули и сколиоза [Fardeau и съавт., 1996, Urtasun и съавт., 1998]. Нарушена дихателна функция се наблюдава при 11% от хората, с форсиран витален (ФВК) капацитет под 50% [Richard и съавт., 2016]. Пациентите с установена тежка респираторна недостатъчност изискват дихателно подпомагане [Mori-Yoshimura и съавт., 2017]. Рядко се наблюдава сърдечно засягане. При повечето индивиди сърдечни симптоми, предшестващи сърдечната патология (включително болка в гърдите, оток на долните крайници, сърцебиене) не са наблюдавани. Quick и колектив правят системна оценка на сърдечното засягане при група пациенти с калпаинопатия, използвайки сърдечно-съдова магнитно-резонансна томография (МРТ). Това проучване не установява сърдечно засягане при това заболяване, дори при лица с напреднала възраст и по-голяма тежест на клиничната картина [Quick и съавт., 2015]. Има описани единични пациента със сърдечна патология, нестрашаваща живота [Richard и съавт., 2016], предсърдно мъждене или вариабилно засягане на левокамерната функция [Groen и съавт., 2007, Okere и съавт., 2013, Mori-Yoshimura и съавт., 2017].

Асимптомният стадий може да бъде относително дълъг при някои засегнати пациенти, особено от женски пол. Началото или влошаването на клиничните прояви може да бъде повлияно от външни фактори на средата, включително инфекциозни заболявания, тежки физически упражнения, медикаментозно лечение, травматично събитие или бременност [Sáenz и съавт., 2005]. Заболяването е непременно прогресиращо, като загубата на самостоятелна походка се наблюдава средно 10 до 30 години след началото на симптомите (между 10 и 48 години) [Richard и съавт., 1999, Zatz и съавт., 2003, Sáenz и съавт., 2005, Angelini и съавт., 2010, Gallardo и съавт., 2011, Richard и съавт., 2016]. Като цяло загубата на самостоятелна подвижност се проявява по-рано при пациенти с начало в детска възраст [Gallardo и съавт., 2011]. По-бърза прогресия на заболяването е наблюдавана при мъжете, отколкото при жените [de Paula и съавт., 2002, Zatz и съавт., 2003, Piluso и съавт., 2005, Richard и съавт., 2016]. В клинично проучване на естествения ход на заболяването при засегнати лица, по-висок дял от жените са запазили самостоятелна походка в сравнение с мъжете (72% срещу 48% при мъжете) [Richard и съавт., 2016]. Мъжете са по-податливи на мускулна атрофия от жените и са по-засегнати от последващата мускулна слабост и клинично увреждане [Fanin и съавт., 2014]. Съобщава се за вътрешнофамилна вариабилност на клиничния фенотип: при братя с един и същ патогенен вариант, възрастта на началото и клиничното протичане могат да варират значително [Schessl и съавт., 2008], което предполага влиянието на генетичния фон и факторите на околната среда при определяне хода на болестта.

Няма данни за строга корелация между генотип и фенотип при калпаинопатията, въпреки че нулевите хомозиготни варианти обикновено се свързват с тежък фенотип и липсващ протеин Калпаин-3 в мускулите [Richard и съавт., 1999]. Единичен хетерозиготен *in frame* c.643_663del21 патогенен вариант при *CAPN3* води до АД наследствена форма на калпаинопатия [Vissing и съавт., 2016].

Стойностите на серумната КФК винаги са повишени (5-80 пъти над нормалната) от ранна детска възраст, особено по време на активния стадий на заболяването. Серумната концентрация на КФК намалява с прогресията на заболяването, поради загубата на мускулна тъкан [Urtasun и съавт., 1998]. При доминантната форма на калпаинопатия серумната КФК може да е нормална [Vissing и съавт., 2016].

Електромиографията (ЕМГ) обикновено установява малки полифазни М-отговори, въпреки че нормална ЕМГ може да се наблюдава при предсимптомни индивиди. Липсва миотония и спонтанна активност [Angelini С и съавт., 2017].

МРТ на мускули: Проучване от Варр А. и сътр. през 2019г. потвърждава описвания преди това модел на мускулно засягане при калпаинопатията, с преобладаващо засягане на бедрените мускули на долните крайници и главно на адукторите (*m. adductor magnus*), някои от задната група мускули (*m. semitendinosus*, *m. semimembranosus* и дългата глава на *m. biceps femoris*) и *m. gluteus minimus*, заедно с относително запазване на *m. sartorius*, *m. gracilis*, *m. quadriceps*, късата глава на *m. biceps femoris* и *m. iliopsoas*. В подбедрицата се наблюдава преобладаващо засягане на *m. gastrocnemius medialis* [Vissing J и съавт., 2016] с по-малко ангажиране на латералната глава и относително запазване на мускулите, принадлежащи към преднолатералната група на подбедрицата (като *m. tibialis anterior* и *m. digitorum longus*) [Richard I и съавт., 2016, Feng X и съавт., 2018]. Мускулите на главата и шията са съхранени или много леко засегнати. Описано е значително ангажиране на флексорните мускули на ръката- *m. biceps brachii*, с относително запазване на абдукторите като *m. deltoideus* и *m. supraspinatus*. Ангажирането на мускулите принципно е симетрично, въпреки че са описани и случаи с асиметрични прояви при ПКМД 2А/R1 [Matsubara E и съавт., 2007].

Колективът Варр А. и съавт. описват находка, наречена „псевдоколагенов знак“, характеризиращ се с централна област с висок сигнал в мускулите, преди това описана като „централна сянка“ [Fardeau M и съавт., 1996], поради относително съхраненост на централната част на мускула, наблюдавана до преди това само при пациенти с Колаген VI свързани заболявания като Вродена миопатия тип Bethlem [Fardeau M. и съавт.. 1996, Quijano-Roy S и съавт., 2012]. По отношение на мускулите на гърба, повечето пациенти показват преобладаващо ангажиране на екстензорните мускули (*m. iliocostalis*, *m. longissimus dorsi* и *m. spinalis dorsi*), с относително запазване на ротаторните като *m. multifidus*. Това обяснява ниската честота на сколиоза и по-често наблюдаваната хиперлордоза при ПКМД R1/2А.

1.5.1.2. АД калпаинопатия, ПКМД D4- калпаин 3 асоциирана

Vissing и колектив описват през 2016г. 10 пробанда от различни семейства с произход от Дания, Великобритания, Норвегия и Швеция, хетерозиготни за 21-bp, in-frame делеция в *CAPN3* (c.643_663del21). Всички засегнати индивиди носят c.643_663del21 на един и същи хаплотип. Мутацията c.643_663del21 в *CAPN3* първоначално е описана от Richard и колектив (1997), но до сега не ѝ е приписвана самостоятелна патогенна роля. Мутацията е рядка, с честота на алелите от 0,006% сред индивиди от европейски произход и не е открита в други популации (<http://exac.broadinstitute.org/>).

Клиничният фенотип при пациентите АД калпаинопатия има същата вариабилност, както при AP форми, вариращ от почти асимптомна до загуба на самостоятелна походка. Описана е и интрафамилна вариабилност. Моделът на засягане на мускулите също наподобява този, наблюдаван при AP форма, като най-засегнатите мускули са параспиналните, глутеалните, бедрените и медиалния *m. gastrocnemius*. Фенотипът обикновено е по-лек, отколкото при ПКМД 2A, като началото на заболяването е средно на 34 г.в, с преобладаващи начални симптоми като миалгия и болки в гърба, които присъстват при около половината от носителите на мутацията. От проведена образна диагностика на мускулите, при почти всички пациенти се наблюдава значително мускулно заместване на мускулната тъкан с мастна в една или няколко мускулни групи. По този начин МРТ разкрива тежко мускулно увреждане при индивиди, носители на мутациите, които иначе са имали минимални оплаквания и повишени нива на КФК. При един от пациентите повишената фракция на мастна тъкан в мускулите от МРТ и повишените нива на миоглобин са единствените лабораторни аномалии, но параспиналните мускули са почти напълно заместени с мастна тъкан. В съответствие с модела на мускулна слабост, най-засегнатите мускулни групи при изобразяване са параспиналните, глутеалните, задните бедрени и медиалния *m. gastrocnemius*.

Мускулната хистология показва миопатни промени с увеличен брой интернализирани ядра и вариация в размера на влакната. Понякога се наблюдават клетъчна некроза, пръстеновидни влакна и повишена фиброза сред интрафасцикуларните миоцити, но

като цяло дистрофичните промени не достигат нивото, наблюдавано при пациенти с АР ПКМД.

1.5.2. Саркогликанопатии

Терминът "саркогликанопатии" идентифицира подгрупа от АР ПКМД, дължащи се на мутации в гените, кодиращи един от четирите протеина, образуващи саркогликановия комплекс (СГК). Според класификацията (Таблица 1) различаваме γ -саркогликанопатия (ПКМД R5/2C), α -саркогликанопатия (ПКМД R3/2D), β -саркогликанопатия (ПКМД R4/2E), δ -саркогликанопатия (ПКМД R6/2F). Номенклатурата следва хронологичния ред, по който са картографирани различните локуси [Angelini С и съавт. 2016] (Таблица 3).

Таблица 3. Генетична класификация на саркогликанопатиите.

Име	MIM#	Глокус	Ген	Н. на екзони	Име на протеина	Н. на АК	Молекулна маса (kDa)
ПКМД 2C/R5	253700	13q12.12	SGCG	8	γ -sarcoglycan	291	35
ПКМД 2D/R3	608099	17q21.33	SGCA	10	α -sarcoglycan	387	50
ПКМД 2E/R4	604286	4q12	SGCB	6	β -sarcoglycan	318	43
ПКМД 2F/R6	601287	5q33.2-q33.3	SGCD	9	δ -sarcoglycan	290	35

Сред всички пациенти с ПКМД, първичните саркогликанопатии съставляват около 10-25% от случаите в повечето страни, с по-голяма честота сред инбредни популации (Таблица 4).

Таблица 4. Честота на саркогликанопатиите сред всички ПКМД

	Честота %	Националност
Общо ПКМД		
	10-15	Италия, САЩ (109)
	19-25	Италия (168,26)
	16-23	Холандия (169, 97)
	20	Бразилия (170)
	26	Индия (81)
	15	САЩ (171)
	11	Северна Англия (28)
	40	Турция (70)
Тежки форми ПКМД		
	68	Бразилия (172)
	27	Великобритания (173)
	22	САЩ (109)
	48	Италия (26)
	69	Холандия (174)
ПКМД с късно начало		
	4-6	САЩ (109)
	8	Италия (26)

ПКМД R3/2D е най-честата форма на саркогликанопатия в повечето страни, следвана от ПКМД R5/2C (която обаче е най-честата форма в Магреб, Индия и сред европейските роми) и ПКМД R4/ 2E и ПКМД R6/2F (Таблица 4). Сред пациентите с тежкия фенотип на SCARMД (severe childhood aurosomal recessive muscular dystrophy), честотата на саркогликанопатиите варира в различни популации между 22 до 69% от случаите (Таблица 4), докато при ПКМД с начален стадий в напреднала възраст е едва 4-8% [Angelini и съавт., 2016].

Таблица 5. Относителна честота на подтиповете на саркогликанопатиите

Забеляване	Честота сред СГпатните %	Националност
ПКМД2С	10-50	Магреб (42,43,46,61,175)
	44	Индия (81)
	8	Италия, САЩ (109)
	26	Франция (132)
	33	Турция (70)

	16-23	Бразилия (110,170)
	2	САЩ (171)
	18-26	Италия (26,68,71,168)
	12	Великобритания (148)
ПКМД2D	34	Италия, САЩ (109)
	40-47	Бразилия (110,170)
	56	Франция (132)
	13	Турция (70)
	22	Индия (81)
	35	САЩ (171)
	41-57	Италия (26,68,71,168)
	54	Великобритания (148)
ПКМД2E	16-23	Бразилия (110,170)
	16	Италия, САЩ (109)
	17	Франция (132)
	1	Индия (81)
	47	Турция (70)
	38	САЩ (171)
	29	Великобритания (148)
	6-24	Италия (26,68,71,168)
ПКМД2F	4	Италия, САЩ (109)
	14-21	Бразилия (110,170)
	27	Индия (81)
	6	Турция (70)
	4	Великобритания (148)
	6	САЩ (171)
	1-3	Италия (26,71)

Няколко генетични епидемиологични проучвания са оценили честотата саркогликанопатиите на около 1: 178 000 [Fanin M и съавт., 1997] и 1: 370 000 жители [Norwood F и съавт., 2009].

Първото клинично описание на саркогликанопатиите е от Ben Hamida и съавт. през 1980 и през 1983г. [Ben Hamida M и съавт, 1980, Ben Hamida M и съавт., 1983].

Саркогликановият комплекс (СГК) се състои от четири трансмембранни гликопротеина- α -SG (или 50 DAG / A2, или адхалин), β -SG (или 43 DAG / A3b), γ -SG (или 35 DAG / A4) и δ -SG, които са свързани с тясно физическо взаимодействие, така че да функционират като уникална структура [Ervasti J и съавт., 1991, Lim L и съавт.,

1998, Petrof B и съавт., 1998, Straub V и съавт., 1997, Ozawa E и съавт., 1998]. СГК представлява странична връзка с дистрогликана. Тези протеини са N-гликозилирани от олиго-захарил-трансферази върху техните големи извънклетъчни домени. СГ протеини, които не са правилно гликозилирани, са неправилно сгънати, неправилно локализирани и агрегират в ендоплазмения ретикулум [Niglo V и съавт., 2015]. След това целият СГК се свързва с ДГК и саркоспана и се доставя до мембраната чрез везикуларен транспорт по микротрубовата мрежа [Niglo V и съавт., 2015, Hack A и съавт., 2000].

α -СГ, β -СГ, γ -СГ и δ -СГ се експресират само или предимно в напречно набраздените мускули, а в гладката мускулатура β -СГ и δ -СГ се експресират съвместно с два алтернативни СГ протеина (т.е. ϵ -СГ вместо α -СГ и ζ -СГ вместо γ -СГ, чиито генни дефекти не причиняват мускулно заболяване. В сърдечния мускул СГК съдържа и двата типа компоненти. Въпреки че ϵ -СГ е широко експесиран, по-високи нива се установяват в кръвоносните съдове и нервите, отколкото в мускулите [Ettinger A J и съавт., 1997]. Саркогликаните нямат хомология с други познати протеини (което предполага важната им роля по време на еволюцията), но те споделят някои прилики помежду си. Имат уникален трансмембранен домейн, един малък вътреклетъчен домейн, един голям извънклетъчен домен и молекулна маса от около 35 -50 kDa, и се различават според локализацията на C- края, който при α -СГ е екстрацелуларно, а при β -, γ - и δ -СГ е локализиран интрацелуларно [Crosbie H и съавт., 1999].

Като се има предвид централната роля на ДГ в молекулярната организация на ДГК и стриктното взаимодействие на ДГ и СГ, се смята, че основната функционална роля на СГК е укрепването на стабилността на ДГК. Целостта на СГК е от решаващо значение за нормалното физиологично действие на мускулите. Освен ролята за осигуряване на мембранна стабилност, се предполага, че СГК може да участва в двупосочна сигнална трансдукция с интегрини, свързва филамин-2 в цитоскелетната сигнализация и осигурява закрепване за невроналния синтез на азотен оксид (nNOS) чрез дистробревин и синтрофин [Angelini и съавт., 2016]. Сглобяването на СГ-комплекс протича като стъпаловиден процес, при който β -СГ играе начална роля и неговата връзка с δ -СГ е от съществено значение за правилното локализиране на комплекса към мембраната и за износ от ендоплазмения ретикулум [Hack A и съавт., 2000, Draviam A и съавт., 2006]. Включването на α -СГ става на последния етап

чрез взаимодействие с γ -СГ [Shi W и съавт. 2004]. β -СГ и δ -СГ имат силна връзка и образуват стегнат основен комплекс [Kirschner J и съавт., 2011].

Тъй като четирите СГ субединици взаимодействат и функционират като съвкупност, генетичен дефект в който и да е от гените, кодиращи четирите СГ компоненти, води до нестабилност или загуба на целия комплекс [Mizuno Y и съавт., 1994], въпреки наличието на останалите [Holt KH и съавт., 1998]. СГК не участва пряко във връзката между цитоскелета и извънклетъчния матрикс, загубата му определя дестабилизацията на ДГК и увреждането на сарколемата [Straub V и съавт., 1997, Mizuno Y и съавт., 1994, Matsumura K и съавт., 1993], която става податлива на лезии, причинени от механичен стрес, генериран по време на мускулни контракции [Petrof VJ и съавт., 1998]. Подобно на това, което се случва при дистрофинопатии, дестабилизацията на ДГК причинява неконтролиран цитоплазмен приток на Ca^{++} йони, които предизвикват каскада от събития, завършващи с клетъчна смърт [Straub V и съавт., 1997, Matsumura K и съавт., 1993, Ozawa E и съавт., 1995]. Общото съгласие за патогенетичния механизъм, което е резултат от дисфункция на СГ, е, че мутантните СГ нито са в състояние правилно да се прикачат към ДГК, нито са правилно насочени от ендоплазмения ретикулум към сарколемата [Mizuno Y и съавт., 1994] и поради това бързо се разграждат в цитоплазмата. Това вероятно се дължи на изискването всички СГ да са свързани в комплекс, преди да настъпи съзряване и насочване към сарколемата [Holt H и съавт., 1998].

Загубата на СГК в гладката мускулатура на коронарните артерии се предполага, че е важен фактор за кардиомиопатията, свързана с първичен дефицит на β -SG и δ -SG [Coral-Vasquez R и съавт., 1999, Araishi K и съавт., 1999, Durbeej M и съавт., 2000]. Дефицитът на СГ в съдовата гладка мускулатура може да доведе или до структурни промени, или до нарушаване на метаболитните и сигнални пътища, участващи в микросъдовата дисфункция [Heydemann A и съавт., 2004].

Фенотипът на саркогликанопатите е сходен с тези на дистрофинопатиите, с изключение на липсата на когнитивен дефицит [Ozawa E и съавт., 1998] и по-честата поява на криловидни лопатки. Най-честият фенотип е ДМД подобен, с поява на слабост в детска възраст (особено при ПКМД R5/2C, ПКМД R4/2E, ПКМД R6/2F). Протичането е по-тежко и бързо-прогресиращо отколкото при други форми. Често в ранна детска възраст, още преди появата на мускулна слабост се наблюдава ходене на

пръсти. Начало в по-късна възраст е описана при ПКМД R3/2D и ПКМД R5/2C [Angelini и съавт., 2016]. Изправянето от клекнало положение (с положителен симптом на Gowers), бягането, скачането, могат да бъдат засегнати в детството, но могат да бъдат съхранени до средна възраст. Наблюдава се често мускулна псевдохипертрофия на прасците и езика (макроглосия). Повечето пациенти имат дихателно засягане с различна тежест [Politano L и съавт., 2001], което е особено важно в напредналия стадий на заболяването [Kirschner J и съавт., 2011] и понякога води до дихателна недостатъчност, докато пациентите все още не са загубили самостоятелна походка. Дилатативна кардиомиопатия може да се прояви във всички форми, но тя е честа и тежка (поякога фатална) при ПКМД R4/2E и ПКМД R6/2F [Politano L и съавт., 2001, Barresi R и съавт., 2000, Fanin M и съавт., 2003, Calvo F и съавт., 2000, Fayssol A и съавт., 2016], докато при ПКМД R5/2C и ПКМД R3/2D е лека и много рядка [Melacini P и съавт., 1999, Meznaric-Petrusa M и съавт., 2009]. Субклинична кардиомиопатия (44% от случаите) и начална кардиомиопатия (19% от случаите) са чести [Politano L и съавт., 2001, Melacini P и съавт., 1999], както и аритмиите и дилатативната кардиомиопатия. Признаци на хипоксично увреждане на миокарда могат да се появят при ПКМД R4/2E, ПКМД R6/2F, ПКМД R5/2C [Politano L и съавт., 2001]. Предполага се, че абнормната функция на гладката мускулатура на коронарните съдове участва в развитието на кардиомиопатия при ПКМД R4/2E, ПКМД R6/2F [Gnecchi-Ruscione T и съавт., 1999], тъй като β -СГ и δ -СГ се експресират и в коронарните артерии.

Клинична вариабилност на фенотипа и тежестта на протичане е наблюдавана между несвързани пациенти с една и съща мутация [Kefi M и съавт., 2003] и дори между пациенти, принадлежащи към едно и също семейство [McNally EM и съавт., 1996, Takano A и съавт., 2000, Angelini C и съавт., 1998], което предполага, че различни фактори- от генетични (например интрагенни полиморфизми, модулиращи гени) и негенетични (напр. хранене, спортна активност, индекс на телесна маса, лекарства, инфекции, възпалителен процес) могат да имат роля за определяне на клиничния фенотип и прогресията на заболяването. При повечето пациенти заболяването има тежък и бърз ход, което води до загуба на способност за самостоятелна походка преди 30-40 годишна възраст. Обичайно колкото по-рано е

началото, толкова по-бърза е прогресията, но в някои случаи прогресията не е линейна.

1.5.2.1. ПКМД 2С, γ -саркогликанопатия

През 1983 г. Бен Хамида [Ben Hamida M и съавт., 1983] описва пациенти, принадлежащи към тунизийски инбредни семейства с тежка форма на мускулна дистрофия, с начало в детството и ранна загуба на самостоятелна походка (на възраст 20-30 години). През 1992 г. генът, сегрегиран в тунизийски, марокански, алжирски, египетски семейства със SCARMMD, е картографиран в хромозомна област 13q12 [Ben Othmane K и съавт., 1992, Ben Othmane K и съавт., 1995, El Kerch F и съавт., 1994, Azibi K и съавт., 1993]. През същата година дефицитът на 50 DAG (сега наричан α -SG) е установен в мускули при 13q12-свързани пациенти със SCARMMD, което първоначално предполага, че дефектът на този протеин е основната причина за заболяването [Matsumura K и съавт., 1992, McNally EM и съавт., 1996, Jung D и съавт., 1996]. През 1993 г. Roberts и сътр. предлага 50 DAG протеинът да се назове с термина „адхалин“ от арабската дума за мускул и следователно заболяването, произхождащо от този дефицит на протеин, първоначално се нарича ”Адхалинопатия”. Това заболяване се счита за типично за Северна Африка, Арабския полуостров и страните от Близкия Изток, въпреки че подобни случаи има в Япония, Европа и САЩ [Angelini и съавт., 2016].

През 1995 г. Noguchi открива, че проблеми в генът, водещ до SCARMMD от Магреб е този, кодиращ γ -СГ, и съобщава за първите мутации в него, въвеждайки термина „саркогликанопатии“, за да се отнесе към тази група заболявания. Същата мутация, която се повтаря при пациенти с SCARMMD на Магреб с променлива клинична тежест [Kefi M и съавт., 2003], е установена и при бразилски пациенти с негроиден произход, проявяващи се с по-лек фенотип [McNally E и съавт., 1996]. Променлива клинична тежест (леки и тежки форми) също е наблюдавана във връзка с мутация p.E263K, повтаряща се в Пуерто Рико [Al-Zaidy S и съавт., 2015, Duncan D и съавт., 2006, DiCarua D и съавт., 2014] и с мутация p.C283Y, установена сред европейските роми [Piccolo F и съавт. 1996, Merlini L и съавт., 2000]. Предполага се, че променливата тежест на фенотипа зависи от променливите нива на другите компоненти на SG, които могат да бъдат частично експресирани [Jung D и съавт., 1996, Vonnemann C и съавт., 2002], дори ако има пълен дефект на γ -SG.

В Източна Европа И. Търнев за първи път идентифицира гама-саркогликанопатия през 1997 г. сред мюсюлмани роми - милет в Североизточна България, а Л. Калайджиева първа верифицира генетично заболяването [Tournev I и съавт., 1998], А. Тодорова и сътр. [Todorova A и съавт., 1999] въвеждат рутинно молекулярно-генетичния анализ за наличие на С283У мутацията в България.

Основни клинични характеристики: В повечето случаи на ранно начало фенотипът е тежък, подобен на Мускулна дистрофия тип Дюшен [Angelini С и съавт., 1999, Ben Hamida М и съавт., 1996, Dincer Р и съавт., 2000] с начало в детска възраст, лумбална хиперлордоза и кифосколиоза, криловидни лопатки, псевдохипертрофия на подбедриците, ставни контрактури. Понякога присъства макроглия [Ben Hamida М и съавт., 1996]. Рестриктивният тип дихателна недостатъчност е често срещана, докато кардиомиопатия може да се наблюдава при някои пациенти или може да е субклинична [Politano L и съавт., 2001, Calvo F и съавт., 2000, Melacini Р и съавт., 1999, Voito С и съавт., 2003]. ПКМД фенотип с лека или средна тежест се съобщава при някои пациенти с нулеви или безсмислени мутации [Kefi М и съавт., 2003 Van der Kooi А и съавт., 1998, Ferreira В и съавт., 2011], но се наблюдава клинична хетерогенност и между роднини [Takano А и съавт., 2000, Vermeer S и съавт., 2004] или несвързани пациенти, споделящи същата хомозиготна мутация [Meznaric-Petrusa М и съавт., 2009, Al-Zaidy S и съавт., 2015]. При някои от пациентите се наблюдава миоглобинурия [Pena L и съавт., 2010] или болка в мускулите, имитиращи миозит, с възпалителни промени при мускулна биопсия [Baumeister S и съавт., 2009].

Повтарящи се мутации: Мутацията с.645-649delТ (също идентифицирана като с.521delТ или с.525delТ) представлява голям дял от мутантни алели в инбредни семейства от региона на Магреб [Kefi М и съавт., 2003, Ben Othmane К и съавт., 1995, El Kerch F и съавт., 1994, Noguchi S и съавт., 1995, Van der Kooi AJ и съавт., 1998], при бразилски пациенти от Африка, [McNally E и съавт., 1996, Noguchi S и съавт., 1995, Leal G и съавт., 1999], в Испания [Eiris-Punal J и съавт., 2002, Vorgerd M и съавт., 2001], Индия [Khadilkar S V и съавт., 2009], Португалия [Leal G и съавт., 1999].

Мутацията с ефект на родоначалника р.С283У се открива сред ромите от различни европейски страни (Франция, Италия, Испания, Португалия, Германия, Гърция, България) [Calvo F и съавт., 2000, Piccolo F и съавт., 1996, Merlini L и съавт., 2000, Lasa A и съавт., 1998, Todorova A и съавт., 1999, Georgieva B и съавт., 2004, Garcia-

García D и съавт., 1998, Spengos K и съавт., 2010]. Ромите са мигрирали от Северо-Западна Индия в Европа, което вероятно е довело до тази типична мутация с доказан ефект на прародителя [Piccolo F и съавт., 1996, De Pablo R и съавт., 1992].

Повечето мутации са точкови мутации, често локализиращи в дисталната част на гена, съответстващи на извънклетъчния домен на протеина. Големите делеции в гена *SGCG*, простиращи се от екзон 2 до екзон 8 [Bonnemann C и съавт., 2002], изтривайки целия ген [Nowak KJ и съавт., 2000] или включвайки целия екзон 7 или 6 [White S и съавт., 2005, Takano A и съавт., 2000], са свързани с тежък фенотип.

ПКМД 2C/R5 е най-честата форма на саркогликанопатия сред арабите в Северна Африка и в Индия, поради честата практика на инбридинг в тези популации (Таблица 2). ПКМД 2C/R5 обаче е втората по честота форма на всички саркогликанопатии след ПКМД 2D/R3 в повечето европейски и южноамерикански страни (Таблица 4)

1.5.2.2. ПКМД 2D, α -саркогликанопатия.

През 1993 г. локустът на ПКМД 2D/R3 е картиран в хромозомната област 17q21 [Roberds S и съавт., 1993, McNally E и съавт., 1994, Roberds S и съавт., 1994] и първите мутации в гена, кодиращ α -СГ, са идентифицирани при френски пациенти [Roberds S и съавт., 1994].

Клинични характеристики: Фенотипът е най-променливият сред саркогликанопатиите [Angelini C и съавт., 1999], вариращ от тежки Дюшен-подобни [Kawai H и съавт., 1995, Ljunggren A и съавт., 1995] до по-леки форми на ПКМД [Passos-Bueno MR и съавт., 1995, Piccolo F и съавт., 1996], и дори безсимптомни пациенти само с повишени стойности на КФК [Angelini C и съавт., 1998], като често се наблюдават тези с ранно начало и тежко протичане. Мускулната слабост включва предимно тазовия пояс, но много пациенти имат криловидни лопатки. Ходенето на пръсти е ранна клинична характеристика при повечето пациенти и хипотрофията на прасците е много честа находка. Сърдечната функция обикновено е запазена, но понякога се наблюдава намалена ФИ на лявата камера или дилатативна кардиомиопатия [Politano L и съавт., 2001, Faysoil A и съавт., 2016, Melacini P и съавт., 1999, Ginjaar H и съавт., 2000]. Описани са единични пациенти с фатална кардиомиопатия. [Politano L и съавт., 2001, Meznaric-Petrusa M и съавт., 2009].

Дефицитът на α -СГ се компенсира частично от ε -СГ, който може да е в състояние да намали кардиомиопатията. [Lancioni Аи съавт., 1998]. С напредването на заболяването възниква дихателна слабост (понякога изискваща дихателно подпомагане) [Walter М и съавт., 2004]) и се развиват сколиоза и ставни контрактури. Колкото по-ранно е началото, толкова по-бърза е прогресията: случаите с ранно начало загубват самостоятелна походка средно на 15-20 годишна възраст, докато случаите с късно начало могат да продължат да ходят самостоятелно през целия си живот. [Angelini С и съавт., 1999]. Някои пациенти проявяват нетолерантност към упражнения и миоглобинурия като първоначални симптоми [Ceravolo F и съавт., 2014, Mongini Т и съавт., 2002, Tarnopolski М и съавт., 2015, Krishnaiah В и съавт., 2016]. При по-голямата част от пациентите пълното отсъствие на α -SG протеин е свързано с по-тежък фенотип от този, наблюдаван при пациенти с остатъчно количество функционален протеин. [Angelini С и съавт., 1999, Piccolo F и съавт., 1995, Vainzof М и съавт., 2000, Diniz G и съавт., 2014].

Повтарящи се мутации. Мутациите, включващи аминокиселини 77, 98, 284, се повтарят в различни неродствени популации, представляващи мутационни горещи точки [Carriè А и съавт., 2007]. Мутацията p.R77C е най-често срещаният мутантен алел в различни световни популации [Angelini С и съавт., 1999, Passos-Bueno М и съавт., 1995, Duggan DJ и съавт., 1997, Moreira ES и съавт., 2003] и особено в Европа, където тя представлява 24-32% от мутациите. Тя е свързана с променлива тежест и корелира с остатъчното количество протеин. [Piccolo F и съавт., 1995, Carriè А и съавт., 1997]. Тази мутация се повтаря с често срещан хаплотип (ефект на родоначалника) във Финландия (1: 150 носеща честота) [Hackman Р и съавт., 2005] и на островите Магдалина (1:22 носеща честота) [Tetreault М и съавт., 2011]. Мутацията p.R34L се повтаря в Тайван и тежко засегнатите пациенти споделят общ хаплотип (мутация с ефект на родоначалника) [Liang W и съавт., 2016]. Мутацията p.R192X се повтаря в Египет вероятно поради ефект на родоначалника. [Reddy Н и съавт., 2016]. Повечето мутации са безсмислени (около 75% от алелите), което вероятно обяснява тенденцията към по-доброкачествен фенотип на ПКМД 2D в сравнение с другите саркогликанопатии. [Piccolo F и съавт., 1995]. Мутациите, включващи най-дисталната част на гена (напр. Р.R284С, р.V247М), са свързани с по-лека форма на заболяването. [Mongini Т и съавт., 2002, Tarnopolski М и съавт., 2015, Carriè А и съавт., 1997, Duggan

D и съавт., 1997 Moreira E и съавт., 2003, Morandi L и съавт., 1996]. Ролята на неизвестни епигенетични фактори и различната експресия на α -СГ и другите компоненти на СГК могат да бъдат възможно обяснение за подчертаната интерфамилна вариабилност на фенотипа. [Angelini C и съавт., 1998].

ПКМД2D е най-често срещаната форма на всички саркогликанопатии в много страни (Таблица 4, Таблица 5).

1.5.2.3. ПКМД 2E, β -саркогликанопатия

Използвайки линкидж анализ при пациенти със SCARMD от инbredна популация Амиши в Северна Америка, е картографиран нов локус на хромозома 4q21. Вторичният дефект на α -СГ протеин, открит в мускул от такива пациенти, позволява както идентифицирането на гена, кодиращ β -СГ, така и първите мутации при пациенти с амиши [Lim LE и съавт., 1995] и един италиански пациент [Bonnemann CG и съавт., 1995]. ПКМД 2E представлява около 16-29% от всички саркогликанопатии в повечето страни, с по-висока честота в инbredни популации (Таблица 3, Таблица 4).

Клинични характеристики: Клиничният фенотип при по-голямата част от пациентите е свързан с тежко протичане с ранно начало, бърза загуба на самостоятелна походка, тежка, понякога фатална дилатативна кардиомиопатия [Barresi R и съавт., 2001, Fanin M и съавт., 2003, Gneschi-Ruscione T и съавт., 1999, Ginjaar H и съавт., 2000, Semplicini C и съавт., 2015]. Често се наблюдава пълна загуба на СГК [Bonnemann C и съавт., 1995, Bonnemann C и съавт., 1996]. Делецията, премахваща целия *SGCB* ген, причинява тежка форма на ПКМД, свързана с тежка или фатална кардиомиопатия. Има описани по-леки форми с начало в юношеството или при възрастни сред популацията на Амишите, дължаща се на безсмислена мутация. [Lim L и съавт., 1995]. Други хомозиготни безсмислени мутации са описани при пациенти с тежък фенотип на ПКМД, понякога свързан с дилатативна кардиомиопатия. [Bonnemann C и съавт., 1996, Bonnemann C и съавт., 1998, Duclos F и съавт., 1998, Rivas E и съавт., 2004, Cottrell C и съавт., 2012]. Тези мутации (p.R91L, p.M100K, p.T151R) са свързани с пълна загуба на СГК и са групирани в непосредствения извънклетъчен домен на протеина, регион, критичен за взаимодействието в рамките на СГК [Bonnemann C и съавт., 1998]. Пълната загуба на

СГК е установена и в сърдечния мускул на пациенти с ПКМД2Е [Barresi R и съавт., 2000]. Често са наблюдавани макроглия, хипертрофия на подбедриците, скъсяване на сухожилията, криловидни лопатки и сколиоза, дихателна недостатъчност, изискваща понякога механична вентилация [Angelini C и съавт., 1999, Semplicini C и съавт., 2015]. Малка част от пациентите са с по-лек или междинен ПКМД фенотип, с начало в младежка или средна възраст, при загуба на самостоятелна походка с или без кардиомиопатия. В такива случаи, както нулевите, така и безсмислените мутации са свързани с остатъчно количество от СГК [Fanin M и съавт., 2009, Dincer P и съавт., 2000, Boito C и съавт., 2003, Dos Santos M и съавт., 1997, Balci B и съавт., 2004, Wong-Kisiel L и съавт., 2010], което води до възможност да прогнозиране на хода на заболяването. [Angelini и съавт., 1999, Semplicini C и съавт., 2015].

Повтарящи се мутации: Безсмислената мутация p.T151R се повтаря сред Амишите от Южна Индиана, което е инбредно население, произхождащо от швейцарския кантон Берн през XVIII век [Lim L и съавт., 1995, Duclos F и съавт., 1998], и в наши дни поддържа религиозна и културна изолация. Дупликацията c.377-384dupl се повтаря при несвързани пациенти от планински регион на Северна Италия [Barresi R 2000, Fanin M и съавт., 2003, Duggan DJ и съавт., 1997, Semplicini C и съавт., 2015], където географска изолация е довела до инбридинг и ефект на родоначалника на мутацията [Fanin M и съавт., 2000].

1.5.2.4. ПКМД 2F, δ -саркогликанопатия

През 1996 г. е установен нов локус върху хромозома 5q33-34 при бразилски пациенти с тежък фенотип на ПКМД [Passos-Bueno MR и съавт., 1996]. Генът кодиращ δ -СГ, е идентифициран след установяване на вторичен дефект на α -СГ в мускулите [Nigro V и съавт., 1996]. Първата мутация на гена *SGCD* (c.656delC) е идентифицирана в несвързани бразилски семейства с тежък ПКМД фенотип и кардиомиопатия [Nigro V и съавт., 1996, Moreira E и съавт., 1998], която е свързана с пълна загуба на СГК. Същата хомозиготна c.656delC мутация е докладвана при един пациент, при който относително лекият фенотип се приписва на тежък, но частичен дефицит на δ -СГ протеин със задържане на останалите СГ на сарколемата [Gouveia T и съавт., 2007]. В последствие пациенти са докладвани с тежък фенотип с начало в детска възраст с кардиомиопатия, дължащи се на безсмислени (p.W30X, p.R165X, p.E93X) [Duggan D

J и съавт., 1997, Dincer P и съавт., 2000] или хомозиготни погрешносмислени мутации (p.E262K, p.R198P) [Boito C и съавт., 2003, Moreira ES и съавт., 1998]. Обратно, хетерозиготни безсмислени мутации са свързани или с дилатативна кардиомиопатия без мускулна дистрофия (p.S151A, p.R71T) [Tsubata S и съавт., 2000, Karkkainen S и съавт., 2003], или с проксимална миопатия (p.N211Y) [Nigro V и съавт., 1996], което предполага възможността за доминантен отрицателен ефект на специфични мутации. [Campbell M и съавт., 2016]. Предполага се, че мутациите, локализирани в извънклетъчния домейн на протеина, причиняват дилатативна кардиомиопатия със или без проявена мускулна дистрофия. [Karkkainen S и съавт., 2003].

Клинични характеристики: В повечето случаи фенотипът е тежък ПКМД фенотип с ранно начало, асоцииран с дилатативна кардиомиопатия [Politano L и съавт., 2001, Moreira ES и съавт., 2003]. Често се наблюдава пълна загуба на СГК.

Повтарящи се мутации. Мутацията c.656delC се повтаря при несвързани пациенти от Бразилия [Nigro V и съавт., 1996, Moreira S и съавт., 1998] и Европа [Gouveia F и съавт., 2007] с доказан ефект на родоначалника [Nigro V и съавт., 1996].

ПКМД 2F е рядко заболяване, което представлява около 1-6% от саркогликанопатиите в повечето страни, с по-висока честота при инбредни популации (Таблица 4). КФК обикновено е силно или умерено повишена- 5-10 пъти над горната граница на нормата. ЕМГ изследването обикновено показва миогенна увреда.

Образна диагностика на мускули: МРТ проучванията показват по-изразени промени в сигнала в предния, а не задния отдел на бедрената мускулатура със запазване на m. gracilis и m. sartorius [Wattjes M и съавт., 2010] и леко засягане в долната част на крака. Установяват се е фибро-мастни промени в m. soleus, m. tibialis anterior и m. peroneus, докато m. gastrocnemius и m. tibialis posterior са по-малко засегнати [Lodi R и съавт., 1997, Straub V и съавт., 2012]. Мускулите на ръцете са запазени, докато мускулите на раменния пояс са засегнати [Straub V и съавт., 2012].

Мускулна биопсия и анализ на протеини. Повечето мускули на саркогликанопатия показват неспецифични дистрофични характеристики (увеличена вариабилност на размера на влакната, увеличени централни ядра, ендомизиална фиброза, некроза, регенерация) и / или миопатични промени (преобладаване на влакна тип 1, разцепване на влакна, навити влакна). Степента на тези промени е променлива и не винаги корелира с тежестта на заболяването.

Имунохистохимичното оцветяване или имуноблотинг с използване на множество антитела срещу СГ протеини често показват един или повече протеини с необичайно маркиране [Anderson L и съавт., 1999], усложняващо идентифицирането на първичния генетичен дефект. Въпреки че нито един имунооцветяващ модел не се счита за специфичен за който и да е дефект на гена СГ [Kirschner J и съавт., 2011, Klinge L и съавт., 2008], анализът на СГ протеини е много чувствителен инструмент за откриване на първични саркогликанопатии [Voito C и съавт., 2003, Duggan D и съавт., 1997], но не е специфичен, тъй като вторично намаляване на експресията на СГ може да се наблюдава при други нарушения (напр. дистрофинопатии).

Генетичен анализ и фенотип-генотип корелации: Секвенирането на целия СГ ген от геномна ДНК е най-добрата диагностична стъпка. NGS е полезен диагностичен инструмент [Nigro V и съавт., 2011], за идентифициране на неустановени мутации. [Giugliano T и съавт., 2016]. Екзонните делеции са чести в гените на *SGCB* и *SGCG* и има гореща точка на дупликации в *SGCB* [Trabelsi M и съавт., 2008]. Картографирането на хомозиготността е полезен подход за картографиране на гени за диагностициране на саркогликанопатии в инбредни семейства [Mojbafan M и съавт., 2016]. Генотип - фенотип корелациите показват, че нулевите мутации често се свързват с отсъстващ протеин и тежък фенотип, докато безсмислените мутациите са по-често свързани с намалени нива на протеин и по-лек фенотип. Идентичните мутации обаче могат да доведат до различни клинични прояви, вероятно причинени от ефекта на гени- модификатори и епигенетични фактори, водещи до променлива стабилност и функционалност на СГК. [Ginjaar HB и съавт., 2000].

1.5.3. Z-диск протеинопатии:

1.5.3.1. ПКМД2J/R10 - титин-асоцирана.

Титинът, най-големият известен протеин, е кодиран от гена *TTN* (OMIM #188840). Той е най-големият протеин при хората и е основен компонент на мускулния саркомер. Две молекули титин от-край-до-край обхващат цялата дължина на саркомера, от един Z-диск до друг, служейки като „котва“ за контрактилните филаменти. Той се експресира както в сърдечните, така и в скелетните мускули на

много биологични видове. Обхваща цялото разстояние от Z-диска до M-лентата и взаимодействия с различни протеини. [Bang M и съавт., 2001]. Генът *TTN* се състои от 364 екзона (първият некодиращ екзон и 363 кодиращи екзона) и традиционно има три основни категории изоформи на титин – N2A, N2B и N2BA. [Freiburg A и съавт., 2000]. Изоформите на N2A (основно експресирани в скелетните мускули) съдържат елемента N2A, но не и елемента N2B. N2B изоформите съдържат само елемента N2B, докато изоформите N2BA (главно експресирани в сърцето) съдържат както N2A, така и N2B елементите [Savarese M и съавт., 2018]. *TTN* е разположен на хромозома 2q31, и транскрибира иРНК с дължина над 100 kb, която хипотетично може да произведе около 38 138 остатъка и 4200 kDa протеини [Hackman P и съавт., 2002]. Протеинът титин е организиран в четири структурно и функционално различни области, които корелират с мускулния саркомер [Labeit S и съавт., 1992, Miller G и съавт., 2003, Tskhovrebova L и съавт., 2003]. Тези региони, разположени в аминокрая към карбокси края на протеина, включват Z-диск, I-лента, A-лента и M-линия. [Tskhovrebova L и съавт., 2003, Meyer L и съавт., 2013, Trinick J и съавт., 1994]. *TTN* има множество ключови роли във всички напречно-набраздени мускулни клетки, една от най-важните от които е да служи като „архитектурен“ протеин и осигурява специфично прикрепване към множество основни протеини. [Trinick J и съавт., 1994]. Мутациите на *TTN* са описани за първи път при финландски пациенти с тибиялна мускулна дистрофия с късно начало. [Hackman P и съавт., 2002]. Общо 346 патогенни мутации на *TTN* (259 погрешносмислени/безсмислени, 23 сплайсинг, 13 малки инсерции, 47 малки делеции и 2 груби делеции) са докладвани в базата данни за човешки генни мутации (HGMD) с най-малко 10 различни заболявания, включително изолирани кардиомиопатии, чисто скелетно-мускулни фенотипове и вродени мускулни дистрофии, засягащи и двата типа напречнонабраздени мускули [Neiva-Sousa M и съавт., 2015, Younus M и съавт., 2019]. Както доминантните, така и рецесивните *TTN* мутации причиняват широк спектър от сърдечни и скелетно-мускулни заболявания. Доминантните титинопатии включват Наследствена миопатия с ранна респираторна недостатъчност (HMERF), причинена от мутации в екзон 344 и Тибиялна мускулна дистрофия с късно начало (ТМД). [Palmio J и съавт., 2014, Hackman P и съавт., 2002]. Рецесивните титинопатии включват Пояс-крайник мускулна дистрофия R10/2J, Дистална титинопатия с начало в ранна или юношеска възраст, Emery-Dreifuss-

подобна миопатия без кардиомиопатия и Вродена миопатия с или без сърдечно засягане. [Chauveau C и съавт., 2014, Seyhan-Birsoy и съавт., 2013, Carmignac V и съавт., 2007, Nigro V и съавт., 2014, De Cid R и съавт., 2015, Oates C и съавт., 2018].

ТМД е описана за първи път при финландски пациенти и доминантната мутация с ефект на родоначалника (FINmaj). [Hackman P и съавт., 2016]. Същата „финландска“ мутация FINmaj в хетерозиготно състояние причинява напълно различен фенотип на ПКМД- ПКМД 2J, като е установена първоначално само при петима пациенти от кръвнородствен брак в едно голямо финландско семейство. Това е заболяване с начало в юношеска възраст, което причинява слабост на проксималните мускули през първото или второто десетилетие със затруднение на качване на стълби и прогресия до приковаване към инвалидна количка на 25 до 40 г.в.

В последствие Penisson и съавт. описват френска безсмислена мутация (Q33396X), разположена в Мех6, която причинява по-лек фенотип от типичната FINmaj мутация [Penisson-Besnier I и съавт., 2010]. Началото на слабостта е по-късно, започва от горните крайници, а в долните крайници да едновременно засегнати проксимални и дистални мускули. Описана е и изразена интрафамилна вариабилност, като бащата на пробанда е с по-тежко генерализирано мускулно засягане. Същият авторски колектив описва и друга мутация при пациент с финландски произход, който е с вродена мускулна слабост, включително при хранене и деформитети на краката в ранна детска възраст с прогресираща проксимална мускулна слабост. На молекулярно ниво мутацията води до загуба на самия С-терминален край на титин и до вторичен дефицит на калпаин-3. В последствие е доказано, че калпаин-3 дефицитът участва в патогенезата на заболяването. [Hackman P и съавт., 2016]. CAPN3 свързва М-лентовия титин при *is7* в областта, засегната от ПКМД 2J мутациите и показва вторичен дефицит в мускулите на пациенти с ПКМД 2J. [Sagaranta J и съавт., 2010]. Взаимодействията с титин могат да защитят CAPN3 от автолитично активиране и отстраняването на CAPN3 протеазата може да намали миопатологията на титина [Charton K и съавт., 2010]. Загубата на калпаин-3 е вторичен ефект надолу по веригата на дефектен протеин титин и води до фенотипно припокриване с ПКМД 2А, причинен от първични мутация в CAPN3. Хомозиготи с ПКМД 2J, дължаща се на С-терминално мутирал титин, могат да бъдат идентифицирани чрез имунохистохимия в мускулна биопсия, като се използва специфично С-терминално титиново антитяло. Тъй като

тези антитела не са налични в търговската мрежа, този метод не може лесно да се приложи за диагностични цели. [Penisson-Besnier I и съав., 2010].

Поради огромния размер на гена, NGS секвенирането е единственият възможен начин за изследването му. Големият брой варианти и полиморфизми обаче може да имат объркващ ефект върху диагнозата.

1.5.3.2. ПКМД2Q/R17 плектин- асоциирана

Плектинът е протеин с молекулно тегло 500 kDa, част от семейство плакени, който свързва различни елементи от клетъчния цитоскелет. [Wiche G и съавт., 1998, Rezniczek и съавт., 2010]. Плектинът е силно експресиран в мускулите и в многослойния и плосък епител, включително в кожата и стомашно-чревния тракт [Rezniczek и съавт., 2010]. В кожата плектинът е локализиран във вътрешната плака на хемидесмосомите, на място на взаимодействие с междинните нишки. [Smith и съавт., 1996]. Плектинът свързва междинните нишки на кератин на базалните клетки с трансмембрания колаген XVII [Koster J и съавт., 2004] и бета-4 интегрина субединица на алфа-6-бета-4 интегрин, разположена в хемидесмосомата. [Koster J и съавт., 2004, Litjens H и съавт., 2005]. Плектинът в различните клетки и тъкани има способността да взаимодейства с множество свързващи агенти, включително междинни филаменти (кератин, десмин и виментин), актинови микрофиламенти, микротруболи и специализирани молекули в специфични връзки като винкулин и бета-1 интегрин в страната на напречно-набразденото мускулно костамерно прикрепяне [Hijikata T и съавт., 2003, Schroder R и съавт., 1997, Schroder R и съавт., 2002, Tanaka H и съавт., 2001, Osmanagic-Myers S и съавт., 2004, Sevcik J и съавт., 2004]. Плектинът има уникална структура, подобна на дъмбел с централен домейн и N- и C-крайни глобуларни домейни [Wiche и съавт., 1991]. Има съобщения за различни видове транскрипти от плектин, включително такива без род-домейн, които не кодират централен домейн [Elliott и съавт., 1997].

Множество изоформи на плектина се експресират по специфичен за тъканите начин в клетки на бозайници и тъкани, кодирани от един ген- *PLEC1*. [Elliot C и съавт., 1997, Fuchs P и съавт., 1999, Rezniczek GA и съавт., 2003]. Първите случаи на пациенти с БЕС-МД са публикувани през 1988 г. от Niemi, като по това време генетичните основи

не са били известни. [Niemi K и съавт., 1988]. Засегнатият ген е описан през 1996 г. от екип, състоящ се от Mc Lean и Smith [McLean W и съавт., 1996]. Булозната епидермолиза (БЕ) включва група от хетерогенни вродени нарушения, характеризиращи се с разделяне на дермално- епидермалната връзка. Досега мутациите в 14 различни гена са идентифицирани като основни БЕ подтипове [Fine и съавт., 2008, Groves, и съавт., 2010]. Сред тях мутациите в гена, кодиращ плектин- *PLEC* са известни като причинители за два подтипа на автозомно-рецесивен БЕС- БЕС с мускулна дистрофия (БЕС-МД) и БЕ с пилорна атрезия (БЕС-ПА) и за един подтип на АД БЕС (БЕС-Ogna) [Fine и съавт., 2008].

Мутациите на *PLEC* са свързани с Булозна епидермолиза симплекс с мускулна дистрофия, която е автозомно-рецесивно заболяване, характеризиращо се с мехури по кожата и прогресивна мускулна дистрофия с късно начало. [Uitto J и съавт., 1996].

Предишни изследвания разкриват дефектна експресия на плектин в кожни проби от БЕС-МД [Gache и съавт., 1996, Shimizu и съавт., 1999a., Shimizu и съавт., 1999b] и мутации в *PLEC* при пациенти с БЕС-МД [McLean и съавт., 1996, Pulkkinen и съавт., 1996, Smith и съавт., 1996, Takizawa и съавт., 1999]. Мутациите на *PLEC*, открити при пациенти с БЕС-МД, са главно в рамките на екзон 31, който кодира голям род-домейн на плектин. [Natsuga и съавт., 2010, Pfindner и съавт., 2005, Sawamura и съавт. 2007].

За разлика от пациентите с БЕС-МД, тези с БЕС-ПА, обикновено развиват по-тежък фенотип, който включва по-генерализирани мехури и пилорна атрезия (ПА) [Nakamura и съавт., 2005]. Прогнозата на БЕС-ПА е много лоша и засегнатите пациенти обикновено умират в рамките на месеци след раждането [Nakamura и съавт., 2005, Pfindner и съавт., 2005, Pfindner и Uitto, 2005]. *PLEC* мутациите на БЕС-ПА са предимно локализирани извън екзон 31. [Natsuga и съавт., 2010].

Въпреки че и БЕС-МД и БЕС-ПА са автозомно- рецесивни заболявания, причинени от *PLEC* мутации, патомеханизмите, разграничаващи двата подтипа не са ясни. Koster и съавт. и Natsuga и съавт. доказват, че при пациентите с БЕС-МД обикновено се експресира безформена плектинова изоформа, въпреки че липсва пълноверижен плектин. [Koster и съавт., 2004, Natsuga и съавт., 2010]. За разлика от това, пълноверижните изоформите на плектин и без род-домейни са дефицитни при пациенти с БЕС-ПА, което води до по-тежък фенотип на заболяването [Natsuga и съавт., 2010]. В светлината на тези открития е поставено предположението, че

пациентите с БЕС-ПА могат да развият мускулна дистрофия (МД), ако оцелеят по-дълго. Natsuga и съавт. през 2010 г. съобщават за първия пациент с БЕС, развил както ПА, така и МД. И двете мутации, идентифицирани при пациента, са били в последния екзон (екзон 32) на *PLEC* гена. Имунофлуоресценцията и имуноблотният анализ потвърждават намалената и прекъсната експресия на плектин, използвайки няколко антитела срещу различни домейни на плектина [Natsuga K и съавт., 2010]

Алтернативен промоторен регион и алтернативно цис-сплайсинг на *PLEC* могат да обяснят тъканно- или клетъчно- специфична експресия, въпреки че не е известен механизъм за разбиране на клетъчно-тъканната специфика на гена. В резултат на различни секвенции от първи екзон са идентифицирани общо осем изоформи на плектина (плектини 1, 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f и 1g) с различни N- терминални участъци и специфични функции. Сред тях плектин 1a се свързва с междинните нишки на кератина в базалните кератиноцити, които поддържат асоциирането на комплексни дефицит с кожни нарушения. [Andra K и съавт., 2004]. Изоформите 1, 1b, 1d и 1f също са значително експресирани в мускулната тъкан. [Rezniczek G и съавт., 2007].

Плектиновият дефицит също води до миастенен синдром, комбиниран с миопатия с късно начало и БЕ или Вродена мускулна дистрофия с миастеноподобни симптоми с късно начало с БЕ, което потвърждава съществената му роля върху нервно- мускулния синапс. [Banwell B и съавт., 1999, Forrest K и съавт., 2010]. През 1998г. Fine и съавт. описват прогресираща миопатия или миастеноподобни прояви при пациенти от семейство с БЕ. Тогава все още не е бил установен дефекта в невромускулното предаване. Въпреки това, установената мутация в *PLEC* се свързва с мускулна дистрофия без кожно заболяване. В допълнение към това, не се съобщава за мутация в алтернативни на първи екзон на *PLEC*, съответстващи на плектинови изоформи. Gundesli и съавт. през 2010г. описват за първи път чиста форма на АР ПКМД, дължаща се на хомозиготна делеция в екзон 1f в *PLEC* гена. Общият клиничен фенотип на пациентите демонстрира предимно проксимална генерализирана мускулна слабост без миастеноподобни прояви или кожно ангажиране. Този ПКМД 2 фенотип се проявява в ранна детска възраст с бавна прогресия или късно юношество с бързо прогресиране с напредване на възрастта. [Gundesli и съавт., 2010]. Volling и съавт. също през 2010г. описват пациент с мускулна дистрофия с БЕ, двойно хетерозиготна мутация в *PLEC1* гена с бивентрикуларна дилатативна кардиомиопатия с късно

начало. [Bolling M и съавт., 2010]. Kyrova и съавт. в последствие описват клиничен случай на пациент с БЕС-МД с психиатрични усложнения, дължащи се на нови мутации в *PLEC1* гена. [Kyrova и съавт., 2016]. Експресията на плектин и неговите свързващи частици в кожата, скелетните мускули и миокарда в последствие са доказани чрез анализ с имунофлуоресцентна микроскопия. [Bolling M и съавт., 2010]. Плектинът е жизненоважен за свързването на множество протеини на различни места в мускулните влакна с цитоскелета. Дефицитът на плектин в мускулите има сериозни негативни ефекти върху предаването на контрактилните сили от съседните саркомери през цитоскелета на десмина към плазмената мембрана и води до прогресивни патологични промени [McMillan J R и съавт., 2006].

1.5.3.3. ПКМД2G/R7- телетонин асоциирана

Moreira и колектив съобщават за относително лека форма на автозомно-рецесивна ПКМД в три взаимосвързани бразилски семейства и картографират тази форма върху хромозома 17q11-12. [Moreira E и съавт., 1997, Moreira E и съавт., 2000]. Впоследствие те откриват мутация в саркомерния протеин телетонин [Moreira ES и съавт., 2000] и демонстрират дефицит на телетонин в мускулите на засегнатите пациенти [Vazinov M и съавт., 2002]. Телетонинът е 19-kDa протеин, експресиран изключително в скелетния и сърдечния мускул на възрастни [Valle G и съавт., 1997, Mason P и съавт., 1999]. Разположен в Z-диска, телетонинът осигурява места за свързване на титин и други свързани с Z-диска протеини по време на сглобяването на саркомера. Последните изследвания на взаимодействието на протеини показват, че N-терминалната област на титин взаимодейства с N-терминалната област на телетонин (остатъци 1-53), което прави тази част от телетонин критично важна за правилното образуване в Z-диските структури. [Mues A и съавт., 1999, Zou P и съавт., 2006]. Телетонинът е кодиран от *TCAP* гена, който обхваща два екзона и кодира 167 аминокиселини. Той е субстрат на титин, който участва в сглобяването на саркомера чрез осигуряване на пространствено определени места на свързване за други саркомерни протеини. [Gregorio C и съавт., 1999]. След активиране чрез фосфорилиране и свързване на калций/калмодулин, е доказано, че титинът фосфорилира карбокси-терминалния домен на телетонин в ранно диференциращи се

миоцити. [Mayans O и съавт., 1998]. Мутациите в гена за телетонин са отговорни за ПКМД тип 2G [Moreira E и съавт., 1997, Moreira E и съавт., 2000, Vazinov M и съавт., 2002] и малка подгрупа от хипертрофични и дилатативни кардиомиопатии [Knoll R и съавт., 2002, Hayashi и съавт., 2004, Vos M и съавт., 2006]. В последствие се съобщава за мутация на *TSP* при пациент, страдащ от чревна псевдообструкция. [Mazzone A и съавт., 2008]. Мутациите в гена за телетонин, докладвани от Moreira, причиняват разрушаване на функционално важен домейн на телетонин, карбокси-терминалната област и могат да доведат до промяна в саркомерната структура. [Moreira и съавт., 2000]. Няма значителни разлики във фенотипа и морфологията между хомозиготни и двойно хетерозиготни пациенти описвани до сега. [Vazinov V и съавт., 2002].

Olive и колектив са идентифицирали първия европейски пациент с ПКМД 2G, свързан с нова мутация на телетонин- Trp25X, сред населението на Молдова, със слабост на проксималните мускули на долни крайници и изразена хипертрофия на прасеца наблюдавана около 15-годишна възраст. Установено е разпределение на засягането на скелетните мускули като тежко отслабване на седалищните и бедрените мускули в предните и задните части, селективна атрофия на предния тибиялен мускул и леко засягане на мускулите на раменен и тазов пояс- модел, който обикновено се различава от този наблюдавани при други форми на ПКМД [Bönnemann C и съавт., 2004, Fisher D и съавт., 2005] и дистални миопатии [Udd B и съавт., 2007].

Клиничните прояви на ПКМД 2G/R7, свързана с телетонин, се характеризират с появата на симптоми между 2 и 22 г. (средно $9,1 \pm 2,4$) години, включващи преобладаваща проксимална мускулна слабост в долни крайници и *m. tibialis anterior*, хипертрофия на прасците. Засягането на *m. tibialis anterior* може да последва проксималната мускулна слабост, а може и да започне успоредно с нея. [Moreira и съавт., 2000]. Постепенно се засягат мускулите на раменния пояс и с прогресия на заболяването способността за автономно придвижване се губи до третото или четвъртото десетилетие. [Moreira и съавт., 1997]. В единични случаи се развива кардиомиопатия. При пациентите се наблюдава изразена връзка между ранното начало и контрактурите на Ахилесовите сухожилия. [Waddel M и съавт., 2012, Baresi R и съавт., 2015, De Fuenmayor-Fernandez de la Hoz C и съавт., 2014, Francis A и съавт., 2014, Ikenberg E и съавт., 2017, Negaо L и съавт., 2010]. Всички докладвани пациенти с ПКМД 2G/R7 имат повишени стойности на КФК. Моделът на мускулно засягане от

МРТ има следните характеристики- тежка мастна дегенерация в предните и задните части на бедрената мускулатура, миоедем в задния тибиален мускул и *m. gastrocnemius*. [Chen и съавт., 2019]. От изследване на **мускулна биопсия** се наблюдават леки дистрофични промени, атрофия на фибри тип I и пълен дефицит на телетонин. Описани са случаи на пациенти с „rimmed“ вакуоли, макар и в малка част от влакната, което може да доведе до погрешна диагноза с дистална миопатия с “rimmed“ вакуоли. [Vazinov M и съавт., 2002]. Показателно е, че се откриват голям брой лобулирани влакна- находка, често наблюдавана при други форми на мускулна дистрофия, особено при ПКМД 2А и ПКМД2В. [Fisher D и съавт., 2005]. При пациенти, при които се развива мускулна слабост в ранна възраст, придружаващите вътрешни ядра, видими в мускулните влакна, често могат да бъдат погрешно диагностицирани като „центрунклеарна миопатия“. [Cassandrini D и съавт., 2017]. Costamagna D и колектив наблюдават моноцитни инфилтрации и некроза на мускулни влакна при техни пациенти. Въпреки че основните механизми в тези случаи не са напълно изяснени, има все повече доказателства в подкрепа на това, че възпалението допринася за етиологията на мускулна атрофия и мускулна некроза. [Costamagna D и съавт., 2015].

През 2017г. Чамова и колектив описват голяма кохорта от пациенти с ПКМД 2G и повишено носителство - 2% на Tgr25X мутация при българомохамедани, населяващи Смолянска област. [Chamova T и съавт., 2018].

Клиничните и миопатологични характеристики на ПКМД 2G се припокриват с други форми на рецесивни ПКМД. Преобладаващото засягане на мускулите на тазовия пояс с хипертрофия на прасеца, наблюдавана при ПКМД 2G, наподобява фенотипа на някои пациенти с ПКМД 2I. Липсата на респираторно или сърдечно засягане, което често се наблюдава при ПКМД 2I, и тежката атрофия на квадрицепсите и предните тибиални мускули, наблюдавани при ПКМД 2G, помагат да се разграничат двете форми. [Bönnemann C и съавт., 2004, Fisher D и съавт., 2005]. Изразеното засягане на квадрицепсите и *m. tibialis anterior* и леките криловидни лопатки отличават ПКМД 2G от пациентите с ПКМД 2А. Липсата на участие на задните мускули на прасеца разграничава ПКМД 2G от дисталната предна миопатия, дължаща се на дефицит на дисферлин. [Bönnemann и съавт., C 2004]. Дори и с всички

тези отличителни признаци, окончателната диагноза на ПКМД 2G не може да се основава само на клинични белези.

Механизмът, чрез който дефицитът на телетонин причинява ПКМД 2G за момента не е напълно известен. Мутацията в *TCAP*- Trp25X, описана при европейски пациенти, вероятно предотвратява взаимодействието на телетонин с титин и други протеини, участващи в развитието и поддържането на саркомерната структура, както и вътреклетъчни сигнални процеси. [Lo H и съавт., 2008, Markett C и съавт., 2008].

В светлината на широкия спектър от междуфамилна и вътрешнофамилна клинична вариабилност, слабо разгаданите генетични характеристики и ограничения брой известни пациенти с ПКМД R7/2G, в момента няма ясни корелации между генотип и фенотип. [Chen и съавт., 2019].

1.5.3.4. ПКМД 1D – *DNAJB6* свързана

ПКМД 1D първоначално е картографирана до 9-сМ регион на хромозома 7q36 в две големи американски семейства [Speeg и съавт., 1999] и по-късно прецизирана до 3,4-Mb регион в пет финландски семейства с автозомно-доминантна ПКМД 1D. [Hackman и съавт., 2011, Sandel и съавт., 2010].

Автозомно-доминантна ПКМД тип 1D (OMIM 603511), причинена от *DNAJB6* мутации [Sarparanta J и съавт., 2012, Harms MB и съавт., 2012], досега е идентифицирана в Европа [Sarparanta J и съавт., 2012, Palmio J и съавт., 2015, Ruggieri A и съавт., 2015], Азия [Nam TS и съавт., 2015, Sato T и съавт., 2013, Monies D и съавт., 2016, L Tsai PC и съавт., 2017] и САЩ [Sarparanta J и съавт., 2012, Harms MB и съавт., 2012, Suarez-Cedeno G и съавт., 2014, Couthouis J и съавт., 2014]. Всички съобщени мутации засягат G/F-домейна на *DNAJB6*, кодиран от екзон 5.

DNAJB6 принадлежи към J-протеините (известен също като семейството на Hsp40), клас ко-шаперони, характеризира се с J-домейн. Тези ко-шаперони взаимодействат с шапероните от семейството HSPA (Hsp70), увеличавайки и модулирайки тяхната активност. [Kampinga H и съавт., 2010].

DNAJB6 се състои от съхранен N-краен J-домейн, G/F-домейн, богат на глицинови и фенилаланинови остатъци и C-терминален домен, съдържащ богат на серин („SSF-SST“) регион. [Hageman J и съавт., 2010, Chuang JZ и съавт., 2002]

Човешкият DNAJB6 има две известни изоформи, характеризиращи се с алтернативни С- краища. [Hanaï R и съавт., 2003]. Дългата изоформа DNAJB6a (36 kDa) се локализира в ядрото, докато късата DNAJB6b (27 kDa) е цитоплазмена. [Hanaï R и съавт., 2003, Mitra A и съавт., 2008]. DNAJB6 потиска агрегацията и токсичността на протеини, склонни към агрегация, като полиглутамин-съдържащ хънтингтин и α -синуклеин. [Hageman J и съавт., 2010, Chuang J и съавт., 2002, Durrenberger P и съавт., 2009] и участва в автофагичния и протеазомален обмен на протеини и органели [Watson E и съавт., 2007, Rose J и съавт., 2011], както и в регулирането на генната експресия [Dai Y и съавт., 2005] и клетъчния цикъл [Zhang Y и съавт., 2008].

DNAJB6 се експресира във всички тъкани [Seki N и съавт., 1999] с най-висока експресия в мозъка. [Chuang J и съавт., 2002]. В следствие е установена неговата значима експресия и локализация в скелетните мускули. Въпреки че мутациите се експресират, както в ядрената, така и в цитоплазмената DNAJB6, те предизвикват мускулна патология изключително чрез цитоплазмената изоформа. [Sarparanta и съавт., 2012].

Класическият ПКМД 1D фенотип е с късно начало с бавна прогресия и повечето пациенти запазват самостоятелната си походка до късна възраст. Началото на проксималната слабост на долните крайници варира от 20 до 60 г.в. Първият симптом е затруднение при ходене и изкачване на стълби. При всички пациенти слабостта е по-изразена в тазовия пояс, отколкото на раменния пояс, като е възможно раменния пояс да не бъде засегнат изобщо при начало в по-късна възраст [Sandell S и съавт., 2010]. Моделът на мускулна слабост демонстрира ангажиране на флексията и екстензията в тазобедрената става, както и флексията и екстензията в коляното. Описани са затруднения в плантарна и дорзалната флексия в глезенна става. Слабостта в раменния пояс ангажира абдукцията в раменната става, бицепса и в по-малка степен трицепса [Sandell S и съавт., 2010]. Серумната КФК е леко повишена и ЕМГ изследването е с данни за миогенна увреда. Изследването на мускулни биопсии показва миопатни/дистрофични признаци, рядко влакна с „rimmed” вакуоли, влакна с нишковидни включвания при електронна микроскопия и влакна с незначителни цитоплазмени протеинови агрегати при имунохистохимия. [Sandell S и съавт., 2010]. Мускулно изображение от КТ и МРТ сканиране демонстрира мастна дегенерация и заместване на мускулната с мастна тъкан в засегнатите мускули. Първоначално в

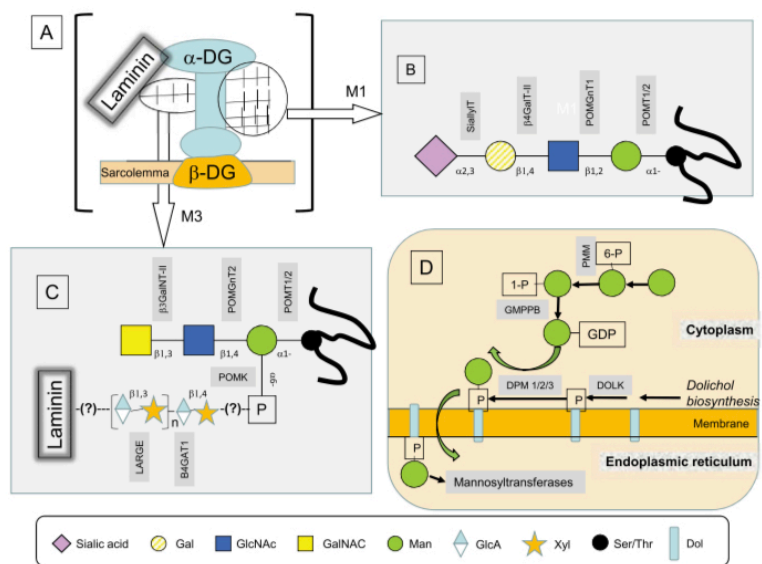
бедрата се засягат *m. semimembranosus* и големите аддукторни мускули, а в подбедриците - медиалният *m. gastrocnemius* и мускулите на стъпалото. В по-късните етапи се наблюдава заместване на мускулната тъкан с мастна във всички мускули на бедрото, с изключение на *m. rectus femoris* и *m. sartorius*, както и в *m. gastrocnemius*, *m. soleus*, *m. flexor digitorum brevis*. [Sandell S и съавт., 2010].

В последствие са описани *DNAJB6* мутации, които причиняват ПКМД с много по-ранно начало и тежка прогресия [Palmio J и съавт., 2015, Nam T и съавт., 2015], а някои могат да се представят с по-дистален фенотип. Не е наблюдавано сърдечно засягане, но тежките мутации на p.Phe91Ile и p.Phe91Leu водят до дихателна недостатъчност. [Palmio J и съавт., 2015].

1.5.4. Алфадистрогликанопатии:

α -дистрогликанопатиите представляват група от генетични заболявания с дефекти в гликозилирането на специфичен гликопротеин, α -дистрогликан (α -ДГ), характеризиращи се с редуцирано или отсъстващо гликозилиране на α -дистрогликанна имунореактивност в мускулна биопсия. α -дистрогликанът е силно гликозилиран сарколемен гликопротеин, който играе важна роля в поддържането на сарколемната цялост чрез свързване на дистрофин-асоциирания гликопротеинов комплекс към екстрацелуларния матрикс. [Henry M и съавт., 1996, Bouchet-Seraphin C и съавт., 2015]. Тази група заболявания споделят общата характеристика на наличие на хипогликозилирана форма на α -дистрогликан при биопсия на скелетните мускули [Muntoni и съавт., 2002], което е довело до термина дистрогликанопатия. [Toda и съавт., 2003, Brockington и Muntoni, 2005, Mercuri и съавт., 2006]. В скелетните мускули се състои от 156 kDa извънклетъчна субединица (α -дистрогликан) и 43 kDa трансмембранна субединица (β -дистрогликан). [Ibraghimov-Beskrovnaia O и съавт., 1992]. Алфа- и бета-дистрогликанът са получени от един и същ прекурсорен пептид и са основни компоненти на дистрофин-асоциирания гликопротеинов комплекс (ДГК), който образува връзка между актин-свързания цитоскелет и извънклетъчния матрикс (Фигура 2). α -ДГ е силно гликозилиран периферен мембранен протеин, който свързва много от структурите в извънклетъчния матрикс чрез своите въглехидратни участъци. При дистрогликанопатиите тези участъци или липсват, или

са намалени, което води до намалено свързване на неговите лиганди като ламинин-2, агрин и перлекан в скелетните мускули и неврексин в мозъка. [Barresi и Campbell, 2006].

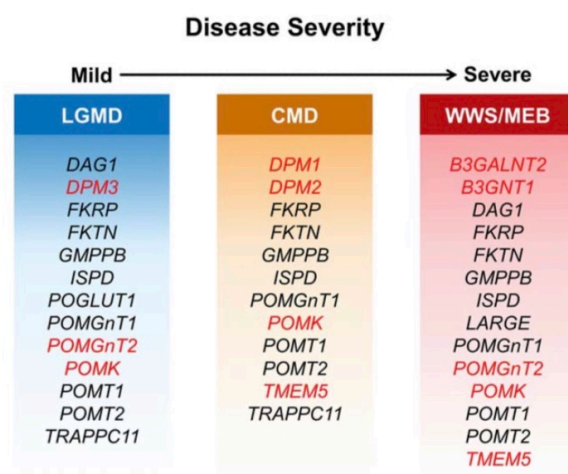


Фигура 2. Алфа-дистрогликан О-манозилиране. А: Дистрофин-гликопротеинов комплекс. В и С: О-манозилирани гликанови структури на алфа-дистрогликан, показващи въглехидратни остатъци .

По този начин той играе важна роля за стабилизацията на сарколемата и базалната мембрана, невронната миграция, както и за извършването на други предполагаеми функции. [Martin T и съвт., 2003]. Дистрогликанът е широко експресиран и силно гликозилиран [Durbeej M и съвт., 1998], а намалената способност на абнормно гликозилиран α -ДГ да свързва ламинин е свързана с аномална миграция на неврони и мускулно увреждане. [Michele D E и съвт., 2002].

Мутации в гените, отговорни за α -ДГ гликозилиране водят до невромускулни заболявания, наречени дистрогликанопатии- клинично и генетично хетерогенна подгрупа [Santavuori P и съвт., 1998]. α -дистрогликанопатиите могат да се дължат на мутации в самия α -дистрогликан-кодиращ ген (*DAG1*) [Ibraghimov-Beskrovnaya O. и съвт., 1993] или могат да бъдат вторични при мутации в гените, кодиращи други протеини, участващи в α -дистрогликанното гликозилиране. [Liewluck T и съвт., 2018]. Споделят широк спектър от мускулни, очни и мозъчни увреждания, които варират от тежко протичащото заболяване Мускул-око-мозък синдром, Синдром на Walker–Warburg, до умерено тежки форми като при Вродена мускулна дистрофия с

дефекти в невронната миграция, или леки форми на AP ПКМД с или без интелектуален дефицит и леко изразени мозъчни аномалии (Фигура 3). Обхващат 10 различни AP подтипове на ПКМД. [Bouchet-Seraphin C и съавт., 2015, Liang C и съавт., 2017, Fee DB и съавт., 2017]. След ревизията на класификацията на ПКМД на последния консорциум на Европейския невромускулен център [Straub V и съавт., 2018], към нея е добавена като последна форма и *POMGNT2* -асоцираната ПКМД [Endo Y и съавт., 2015].



Фигура 3. Фенотипният спектър на α -дистрогликанопатиите и свързаните с тях гени.

Мутациите в тези гени засягат гликозилирането на дистрогликан и причиняват вродени мускулни дистрофии, мускулно-очно-мозъчно заболяване или синдром на Walker-Warburg. Въпреки това някои хипоморфни алели са свързани с ПКМД. [Brockington M и съавт., 2001, Godfrey C и съавт., 2011]. Най-честият ПКМД ген в тази група е *FKRP*, който причинява ПКМД 2I/R9 [Van Rieuwijk J и съавт., 2010]. В някои страни (Англия, Дания, Норвегия), ПКМД 2I е по-честа от ПКМД2A, с висока честота на носителство на L276I алел (1 : 116), докладван 377 пъти базата данни на Leiden. [Stensland E и съавт., 2011]. ПКМД 2I с два алела L276I е с по-лек фенотип, отколкото двойните хетерозиготи. [Porre M и съавт., 2003]. Клиничното протичане е сходно с ПМД тип Бекер с начало в късна детска възраст, хипертрофия на подбедриците, високи стойности на КФК, понякога с дихателно и сърдечно засягане [Margeta M и съавт., 2009, Murakami T и съавт., 2006]. Леко когнитивно нарушение със засягане на екзекутивните функции и зрително-пространствено планиране с

неспецифични МРТ промени също да описани. [Palmieri A и съавт., 2011]. Чести са миоглобулинурия и миоглия след физическо натоварване. [Mathews K и съавт., 2011]. Основният диагностичен метод е имунофенотипизирането на материал от мускулна биопсия, което разкрива значително намален сигнал с антитела, разпознаващи гликозилираните епитопи на алфадистрогликан. Има връзка между намаленото оцветяване с алфа- дистрогликан и клиничното протичане при индивиди с мутации в *POMT1*, *POMT2* и *POMGNT1*, но това не винаги е така при *FKTN* и *FKRP* мутации. [Jimenez-Mallebrera C и съавт., 2009].

1.5.4.1. ПКМД 2I/ R9 FKRP- асоциирана

Генът *FKRP*, локализиран върху хромозома 19q13.3 кодира фукутин- свързан протеин, който е необходим за посттранслационно гликозилиране на алфа-ДГ. *FKRP* свързаните заболявания се появяват като резултат от засягането на пътя на О-манозил гликозилирането на алфадистрогликана. [Okazaki T и съавт., 2020].

Fukutin – свързаният протеин (Fukitin-related protein; FKRP) е експресиран в човешките тъкани с най-високи нива в скелетните мускули, сърдечния мускул и плацентата. Демонстрира сходства с протеини, участващи в модифицирането на гликопротеини и гликолипиди на клетъчната повърхност. Мутациите в *FKRP* са отговорни за няколко фенотипа - Вродена мускулна дистрофия (MDC1C), по-леко протичаща форма на ПКМД 2I/R9 с по-късно начало, повтаряща се миоглобинурия, асимптоматично повишаване на КФК и изолирана дилатативна кардиомиопатия. [Brockington M и съавт., 2001, Brockington M и съавт., 2001, Mathews K и съавт., 2011, Lindberg C и съавт., 2012, Hanisch F и съавт., 2010]. Идентифицирани са приблизително 100 варианта на *FKRP*, от които 60 причиняват ПКМД 2I/R9. [Alhamidi M и съавт., 2017]. ПКМД 2I/R9 е AP заболяване и се характеризира клинично с прогресираща мускулна слабост с предимно засягане на проксималните мускули, повишени стойности на КФК, сърдечна и дихателна недостатъчност. Вариантът с.826C>A (p.Leu276Ile) е най-често срещан сред пациентите с ПКМД 2I/R9, чийто фенотип е подобен на този на Прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен [Alhamidi M и съавт., 2017].

Началото на оплакванията варира от 1 до 50 години, средно през второто десетилетие от живота. В някои случаи са описани забавено двигателно развитие и леки симптоми

по време на ранно детство (трудности при бягане и изкачване на стълби, чести падания или нестабилност). [Harel T и съавт., 2004]. В северноевропейските центрове по невромускулни заболявания ПКМД2I/R9 представлява една от най-често срещаните форми, обхващайки 20% до 40% от пациентите. [Sveen M и съавт., 2006, Stensland E и съавт., 2011]. Разпространението в Южна Европа е приблизително 5%, а в Северна Америка 10% до 15%. [Wicklund M и съавт., 2013, Fanin M и съавт., 2009, Kang P и съавт., 2007]. Изразена сърдечна и дихателна дисфункция може да настъпи рано в клиничния ход и може да не корелира със степента на засягане на скелетните мускули. [Porre M и съавт., 2003, Wahbi K и съавт., 2008]. Възможно е да настъпи етап на стабилизиране на мускулната сила, след което отново слабостта да прогресира. Самостоятелната походка е запазена често доста след четвъртото десетилетие. Първоначалната слабост на тазовия пояс и бедрената мускулатура прогресира към дисталните отдели на долни крайници и проксималните на горните крайници. Почти при всички пациенти се наблюдава хипертрофия на прасците и лумбална хиперлордоза, което понякога води до погрешна диагноза с Прогресивна мускулна дистрофия тип Бекер. Описани са случаи с криловидни лопатки, макроглия, когнитивна дисфункция. [Bourteel H и съавт., 2009, Palmieri A и съавт., 2011]. Всички пациенти се оплакват от болки в гърба или скованост като един от водещите симптоми. Лумбална хиперлордоза и кифосколиоза се откриват при всички засегнати индивиди. Лицевите мускули и автономните функции са в норма [Harel T и съавт., 2004].

Серумната КФК варира от 3 до 50 пъти над нормата, но почти винаги е повече от 10 пъти над горната граница. Миоглобинурия е често срещана при пациенти с много високи нива на КФК. [Mathews K и съавт., 2011] От ехокардиографското (ЕхоКГ) изследване често се описва дилатативна кардиомиопатия. [Wahbi K и съавт., 2008]. Форсираният витален капацитет (ФВК) е намален при изследване на белодробната функция при 30% до 50% от пациентите, а 20% до 30% от пациентите се нуждаят от BiPAP или асистирана вентилация. [Sveen M и съавт., 2006, Stensland E и съавт., 2011]. От МРТ на мускули на таз и бедра често се наблюдава непропорционална промяна на сигнала, отразяваща фиброза и мастна инфилтрация в m. iliopsoas и адукторните мускули на бедрото. [Fischer D и съавт., 2005]. Описана е първоначална мастна инфилтрация на задните мускули на бедрото с постепенна прогресия напред,

независимо от вида на мутация във *FKRP*. [Xie Z и съавт., 2018]. Мускулната биопсия демонстрира дистрофични промени (променливост в размера на влакната, вътрешните ядра, дегенерация и регенерация с мастна и фиброзна замяна) без отличителни белези като („rimmed“ вакуоли, възпаление, или включвания). [Matthew P и съавт., 2014].

1.5.4.2. ПКМД 2К/ R11 *POMT1*-асоциирана

POMT1 гена, кодира протеина O-манозилтрансфераза 1, който е ключов ензим в гликозилирането на α -дистрогликана. *POMT1*– свързаните заболявания се характеризират с подчертано проксимална мускулна дистрофия със структурно или функционално ангажиране на мозъка и/ или очите. [Geis T и съавт., 2019].

През 2002 г. са описани хомозиготни мутации в *POMT1*, водещи до хипогликозилиране на α -ДГ в засегнатата мускулна тъкан, които се свързват със Синдрома на Walker-Warburg. WWS синдромът е считан за най-тежко протичащата форма на дистрогликанопатиите. Клинично се появява с тежки мозъчни малформации, водещи до лисенцефалия II тип, малкомозъчна и понтинна хипоплазия, хидроцефалия. Такива пациенти рядко преживяват след първата си година поради мултиорганно засягане. [de Beltrán-Valero B и съавт., 2002].

Geis и съавт. през 2019г. описват кохорта от пациенти с ПКМД, като клиничната картина включва мускулна хипотония, проксимална мускулна слабост, забавени белези на двигателно развитие с начало на оплакванията от 1 м. до 3 г.в. Наблюдавани са контрактури на Ахилесовите сухожилия, ригиден гръбнак, хипертрофия на подбедриците. Всички пациенти са със засягане на когнитивните функции (IQ между 50 и 68). Често е описвана микроцефалия. При всички пациенти има значително повишени стойности на КФК с максимални стойности, вариращи от 10 до 55 пъти над горната граница. От извършена мускулна биопсия се установява намалена експресия на α -ДГ. Nalioglu и съавт през 2006г. описват AP ПКМД с микроцефалия, леко умствено изоставане, силно редуцирано гликозилиране на алфа- дистрогликана в скелетните мускули. В подгрупа от тези пациенти този фенотип е резултат от обща мутация A200P в *POMT1* гена. Клинично са изследвани 15 пациенти с ПКМД от 15 семейства между 4 и 20 годишна възраст, лека микроцефалия и умствено изоставане.

Общата находка от мускулната биопсия е силна редукция на гликозилираната част на а- ДГ в имунохистохимичното изследване. Коефициентът на интелигентност на представителите на кохортата варира между 50 и 70. Серумните нива на КФК са повишени 5 до 20 пъти над нормата. С невроизобразяващи изследвания са изключени структурни промени в мозъка. [Haliloglu G и съавт., 2006], а Bello и съавт. през 2012 описват кардиологично засягане за първи път при *POMT1* асоциирани МД.

1.5.4.3. ПКМД 2М/ R13 фукутин- асоциирана

ПКМД 2М/R13 се причинява от хомозиготни или двойно хетерозиготни мутации в гена за fukutin (*FKTN*; MIM #607440), разположен на хромозома 9q31.2. ПКМД2М/R13 е клинично лека форма от фукутин свързаните мускулни дистрофии без умствено изоставане. Тя е рядка в световен мащаб и описвана предимно в пациенти с не-японски произход, за разлика от останалите фукутин свързани МД. [Godfrey C и съавт., 2007, Vuillaumier-Barrot S и съавт., 2009, Saredi S и съавт., 2009, Puckett R и съавт., 2009]. Мутациите в гена *FKTN* причиняват широк клиничен спектър от миопатии – от тежки вродени мускулни дистрофии с допълнителни симптоми, до по-леки форми на ПКМД 2М/R13, които обичайно не се асоциират с когнитивно засягане. [Godfrey C и съавт., 2007], като се разграничават според началото на мускулната слабост. На практика пациентите могат да демонстрират фенотип, който е граничен между ВМД и ПКМД. [Godfrey C и съавт., 2007 Ceyhan-Birsoy O и съавт., 2015].

Генът *FKTN* се намира на хромозома 9q31, открит през 1998 от Kobayashi и съавт. [Kobayashi K и съавт., 1998]. Мутация от ретро-транспонсонна инсерция-нетранслиран регион от гена, с ефект на предшественика, е отговорна за сравнително високото разпространение на заболяването в Япония. [Kobayashi K и съавт., 1998]. Сред първите случаи на *FKTN*- асоциирана дистрогликанопатия, съобщени извън Япония, са двама турски пациенти и двамата с хомозиготни за нулеви мутации, които са с тежък WWS-подобен фенотип с ранна смъртност. [Silan F и съавт., 2003, de Bernabe B и съавт., 2003].

В последствие са описани по-леки фенотипове на мускулни заболявания, асоциирани с мутации в този ген в японски и не-японски популации. През 2006г. Murakami и съавт.

описват шестима японски пациенти, двойни хетерозиготи за мутация с ефект на родоначалника във *FKTN* гена и точкови мутации в същия ген, с леко изразена мускулна слабост, нормално умствено развитие и дилатативна кардиомиопатия. [Murakami T и съавт., 2007]. Други следващи публикации от Godfrey и съавт. докладват за пет неяпонски деца от три семейства с нормален интелект и пояс-крайник фенотип, причинени от хетерозиготна точкова мутация във *FKTN* гена. [Godfrey C и съавт., 2006, Godfrey C и съавт., 2007]. В последствие се разширява генотипния спектър на *FKTN* свързаните ПКМД. Puckett и съавт. описват двама братя с недокладвана досега мутация във *FKTN* гена с ПКМД фенотип [Puckett L.R и съавт., 2009].

1.5.4.4. ПКМД 2N/ R14 POMT2-асоциирана

POMT2 генът кодира протеинът O-mannosyl-transferase 2, който е с дължина 750 АК, интегрален мембранен протеин от ендоплазмения ретикулум, който образува комплекс с O-манозил-трансфераза 1 (*POMT1*), отговорен за катализирането на първата стъпка на O-манозил гликановата синтеза. [Willer T и съавт., 2002, Akasaka-Manya K и съавт., 2006, Manya H и съавт., 2010].

Мутации в този ген са идентифицирани при пациенти с вродени мускулни дистрофии с мозъчно засягане, описани или като Walker–Warburg, Мускул-око-мозък фенотип [van Reeuwijk J и съавт., 2005, E. Mercuri и съавт., 2006] или с микроцефалия, умствено изоставане, малкомозъчна хипоплазия. [Manzini C и съавт., 2007]. R. Biancheri и съавт. описват през 2007 г. пациент с хомозиготна мутация в *POMT2* гена с ПКМД фенотип и възпалителни промени в мускулите с тежка редукция на а-ДГ от мускулната биопсия, без мозъчно засягане. [Biancheri R и съавт., 2007]. S. Saredi и съавт. описват през 2014 г. пациент с лека форма на ПКМД, асоциирана с нормален образ на МРТ изследване на мозък, прогресивно лицево засягане и лека редукция на а-ДГ гликозилирането, с установени 2 мутации в *POMT2* гена. [Saredi S и съавт. 2014]. В последствие Østergaard и съавт. през 2017 г. описват кохорта от пациенти с по-лек фенотип на ПКМД 2N, ангажиращо бедрената, параспиналната и глутеалната мускулатура с когнитивно засягане. [Østergaard и съавт., 2017]. Сравнително проучване на Jimenez-Mallebrera установява, че въпреки че хипогликозилирането на

а-ДГ не корелира праволинейно с клиничната тежест, при пациенти с мутации в *POMT1*, *POMT2* и *POMGnT1* се наблюдава добра корелация между намаленото оцветяване с а-ДГ и клиничния ход.

1.5.4.5. ПКМД 2М/ R15 *POMGnT1*-асоцирана

Мутациите на *POMGnT1* гена, кодиращ протеин- O- маноза бета- 1,2-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 1 (*POMGnT1*) са открити за първи път през 2001 г. при пациенти с типичен фенотип на Мускул-око-мозък синдром [Yoshida A и съавт., 2001].

POMGnT1 е гликозилтрансферазен ген, участващ в гликозилирането на а-ДГ и е отговорен за трансфера на N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) към маноза. [Yoshida A и съавт., 2001, Мануа Н и съавт., 2003]. Количественото определяне на патологичните последици, свързани с *POMGnT1* мутации, е улеснено от развитието на функционален анализ на *POMGnT1* ензимна активност. В последствие Clement M и колект. съобщават за хомозиготна *POMGnT1* мутация при пациент с форма на ПКМД без умствена изостаналост, разширявайки спектъра от заболявания, дължащи се на мутации на този ген. Тази мутация води до фина аномалия в *POMGnT1* ензимната активност, нетипична за тази, наблюдавана в МЕВ. Clement E и съавт. след това през 2008 описват пациент с дистрогликанопатия, носещ мутация в промоторната област на *POMGnT1*. Пациентът с проксимална мускулна слабост в долни крайници с начало на 12 г.в, с трудност при изправяне от седнало положение и изкачване на стълби. С преморбидно нормално двигателно развитие. Слабостта прогресира бързо и до 14-годишна възраст е изразена за проксималните мускули на краката, със засягане на мускулите на шията и раменния пояс. Описана е хипертрофия на прасците и *m. quadriceps femoris*, скъсени Ахилесови сухожилия, хипотрофия на бедрените мускули и *mm. deltoidei*, лумбална хиперлордоза, със загуба на самостоятелна походка на 19 г.в. Интелектът остава запазен. Серумната КФК е повишена между 5000 и 12 000 UL, с електромиографски данни за дистрофичен процес. [Clement E и съавт., 2008].

1.5.4.6. ПКМД 2Р/ R16 *DAG1* (α-дистрогликан) асоцирана

ПКМД 2P/R16 се причинява от хомозиготна мутация в гена, кодиращ алфа-дистрогликан (DAG1; 128239) на хромозома 3p21. Мутации в *DAG1* гена могат също да причинят по-тежка форма на вродена мускулна дистрофия - дистрогликанопатия с мозъчни и очни аномалии (тип A9, MDDGA9; 616538).

Dincer и колектив през 2003 г. съобщават за 16 г. дете с AP ПКМД и тежко умствено изоставане, забавено моторно развитие, с прохождение на 3 г.в. с нестабилна походка, трудности при изкачване на стълби, прогресираща към клатушкаща се походка и положителен феномен на Гауърс. Описани са леки хипертрофии на подбедриците, глезенни контрактури, лумбална хиперлордоза. На 16 г.в пациентът съставял изречения от 2 думи, с установен IQ 50. От лабораторните изследвания с увеличена КФК, нормален МРТ на главен мозък. Биопсията на скелетната мускулатура показва дистрофични промени и намалено маркиране на гликозилиран алфа-дистрогликан.

Dong и съавт. през 2015г. описват случай на 7-годишно момче, родено от некръвнородствен брак на родители с японски произход, с много лека форма на мускулна дистрофия, проявяваща се само с асимптомно повишена серумна КФК. Липсва мускулна слабост, описана е само псевдохипертрофия на прасците. Скелетната мускулна биопсия показва характеристики на мускулна дистрофия, включващи регенериращи влакна, вътрешни ядра и лека ендомизиална фиброза, с отрицателно оцветяване с антитела за гликоепитопа на *DAG1* и Western blot анализът показва намалено гликозилиране на алфа-дистрогликан в сравнение с контролите.

Kamble и съавт. описват безсмислена мутация в гена на дистрогликана при пациент с ПКМД с когнитивно увреждане. [Hara Y и съавт., 2011]. Тази мутация засяга прякото свързване на α -дистрогликана с ламинин. Това откритие нарушава смятаното за правило до тогава, че дистрогликанопатиите се дължат на мутации в гени, участващи в пътя на гликозилиране на дистрогликана, при нормален дистрогликанов ген. [Hara Y и съавт., 2011, Nigro V и съавт., 2014].

1.5.4.7. ПКМД2 S/ R18- TRAPPC11- асоциирана

TRAPPC11 е компонент на комплекса за свързване на множество субединици TRAPP, участващ във вътрешноклетъчния трафик на везикули. [Scrivens и съавт.

2011]. TRAPP (transport protein particle/ транспортна протеинова частица) е мултипротеинов комплекс, участващ в пренасянето от ендоплазмения ретикулум към апарата на Голджи. [Kim YG и съавт., 2006]. Субединицата TRAPPC11 (C11) е TRAPP компонент, който е важен за целостта на комплекса и антерограден мембранен транспорт от ендоплазмения ретикулум до апарата на Голджи в клетките при бозайници. [Scrivens и съавт., 2011]. Той е повсеместно експресиран при хората, отразявайки важната му роля в основните клетъчни функции. Предполага се, че промененият мембранен трафик е основният молекулен механизъм на този спектър на заболяването, а в последствие TRAPPC11 също е свързан с гликозилирането на протеини. [Wang и съавт., 2016, Matalonga L и съавт., 2017, DeRossi C и съавт., 2016].

Bögershausen N и съавт. през 2013г. представят форма на автозомно-рецесивна, бавно прогресираща ПКМД с начало в детството и висока КФК, както и синдром, състоящ се от миопатия, умствено изоставане, хиперкинетични движения и атаксия, причинени от хомозиготни мутации в TRAPPC11, установени чрез пълно геномно секвениране, комбинирано с линкидж анализ. И двете мутации водят до редица молекулярни дефекти, включително променен състав на TRAPP комплекса, нарушена морфология на Голджи и променен протеинов транспорт по секреторния път. Тези резултати предполагат, че промененият мембранен трафик е основният молекулен механизъм на този спектър на заболяването.

Wang и колектив по-късно описват двама пациенти с AP ПКМД фенотип и установени с WES двойно хетерозиготни мутации в *TRAPPC11* гена. Клиничната картина се характеризира с ранно начало (2 и 3 г.в.), прогресираща проксимална мускулна слабост, по-изразена в долни крайници, но ангажираща и раменен пояс. Не са засегнати други органи и системи, установени са силно повишени стойности на КФК - 100 пъти над нормата.

В последствие Liang и колектив съобщават за момиче с китайски произход, носещо двойно хетерозиготни мутации с.2938G > A/с.661-1G > T в *TRAPPC11*, с фенотип на вродена мускулна дистрофия, чернодробна стеатоза и инфантилна катаракта, разширявайки спектъра от патологични фенотипове, произтичащи от *TRAPPC11* мутация при хора. [Liang W и съавт., 2015].

1.5.4.8. ПКМД 2Т/ R19- GMPPB – асоциирана

GMPPB е протеин, кодиращ гуанозин-дифосфат-маноза-пирофосфорилаза В, който играе важна роля в гликозилирането на протеини и липиди. [Maeda Y и съавт., 2008], включително α -ДГ. Мутациите в *GMPPB* причиняват хипогликозилиран α -ДГ с фенотип, вариращ от ВМД с мозъчни и очни аномалии, тежък интелектуален упадък и епилепсия до случаи, наподобяващи ПКМД с леко когнитивно увреждане. [Bharucha-Goebel D и съавт., 2015, Carss K и съавт., 2013, Raphael A и съавт., 2014, Carss K и съавт., 2013]. Първите съобщени случаи са имали ранно начало в детството и типично тежко протичане със засягане на централната нервна система. По-късно е описана GMPPB- свързана форма на ПКМД с начало в юношеска или напреднала възраст с или без интелектуален дефицит. [Cabrera-Serrano M и съавт., 2015, Oestergaard S и съавт., 2016]. В последствие с мутации в *GMPPB* гена се свързват и вродени миастенни синдроми. [Belaya K и съавт., 2015, Rodríguez Cruz P и съавт., 2016, Balcin H и съавт., 2017].

Мутациите на *GMPPB* за първи път са идентифицирани при осем различни несвързани пациенти с тежки мускулни дистрофии с много ранно начало, обичайно с ангажиране на ЦНС. [Carss K и съавт., 2013]. След няколко предходни доклада, [Cabrera-Serrano M и съавт., 2015, Jensen BS и съавт., 2015, Oestergaard S T и съавт., 2016], Balchin H и сътр. потвърждават по-лека форма на ПКМД при възрастни без участие на ЦНС, причинена от двойно хетерозиготни мутации в *GMPPB* гена. Както при другите дистрогликанопатии, първичните мутации водят до гликозилиращ дефект на α -ДГ.

Установена е изразена фенотипна вариабилност при пациенти с идентични мутации-от ПКМД с лек фенотип, ВМД с мозъчно засягане до вродени миастенни синдроми. [Cabrera-Serrano M и съавт., 2015, Jensen B и съавт., 2015, Oestergaard S и съавт., 2016, Jensen B и съавт., 2015, Belaya K и съавт., 2015], поради което е трудно да бъдат направени генотип-фенотип корелации. [Bharucha-Goebel D и съавт., 2015]. Въпреки това има потвърждения, че по-лек фенотип на ПКМД се определя от мутация с.79G> С р.Д27Н поради по-лек и частичен гликозилиращ дефект на α -DG. [Balcin H и съавт., 2017]. Клиничната картина включва начало на заболяването от 5 до 30-годишна възраст с първи симптоми свързани с трудности при бягане и изкачване на стълби. Описани са случаи на умора и влошаване на двигателния дефицит след тренировка.

Най-засегнат е *m. erector spinae*, последван от задната група мускули на бедрата, които са по-ангажирани от предните мускули на бедрата, наподобяващ модела на засягане на мускулите като при ПКМД 2А. При някои случаи е описана асиметрия, рядко с хипертрофия на прасците. Не е описано очно или булбарно засягане, при един пациент има леко намалена фракция на изтласкване от ЕхоКГ. [Oestergaard S и съавт., 2017].

1.5.4.9. ПКМД 2U/ R20 – ISPD- асоциирана

Генът *ISPD*, разположен на хромозома 7p21, кодира протеина, съдържащ изопреноид-синтаза домен и е замесен в началния етап на О-манозилирането на алфа-дистрогликан. Мутации в този ген са идентифицирани за първи път в рамките на най-тежкия спектър от дистрогликанопатии при случаи на WWS и М-О-М [Roscioli T и съавт., 2012, Willer T и съавт., 2012], а в последствие се свързват с по-леки фенотипове [Tasca G и съавт., 2013, Cirak S и съавт., 2013]. В педиатрична група от дистрогликанопатии с британски и турски произход е установено, че *ISPD* мутации причиняват ПКМД с нормално когнитивно развитие, както и ПКМД с умствена изостаналост, но без структурни мозъчни аномалии. [Tasca G и съавт., 2013]. Има описани и *ISPD* мутации при две италиански семейства с ПКМД с начало през първите две десетилетия от живота, късно двигателно увреждане и без функционално или структурно засягане на мозъка. [Tasca G и съавт., 2013].

Clement и съавт. през 2008 описват пациенти с ПКМД фенотип със структурно засягане на малкия мозък, което не е докладвано до тогава при нито една от останалите дистрогликанопатии, а по-скоро напомня за свързана с *ISPD* мускулна дистрофия. Затова предлагат въвеждане на термин „ПКМД с със засягане на малкия мозък“ за да опишат тези пациенти. [Cirak S и съавт., 2013] Както при други дистрогликанопатии, заболяването, свързано с *ISPD*, е прогресивно, като повечето случаи с ПКМД губят самостоятелна походка в ранните тийнейджърски години, като поради това наподобяват хода на мускулна дистрофия тип Дюшен. При някои пациенти има описана мускулна псевдохипертрофия, включително и на езика. Дихателните и сърдечните функции се засягат в хода на заболяването. От МРТ на мускули се описва заместване с мастна и съединителна тъкан в долните крайници със запазване на *m. semimembranosus*, *m. gracilis* и *m. tibialis anterior*. [Bourteel и съавт., 2009].

Мускулната биопсия показва дистрофични промени и редукция на α -ДГ при имунохистохимично изследване. [Tasca G и съавт., 2013, Cirak S и съавт., 2013]. Наблюдавана е и вътрешнофамилна вариабилност. [Baranello G и съавт., 2015].

1.5.4.10. ПКМД 2Z / R21- POGLUT1 асоциирана

В семейство с автозомно рецесивна ПКМД с късно начало Servian-Morilla и колектив през 2016 г. идентифицират безсмислена биалелна мутация в *POGLUT1* гена, кодиращ ензим протеин О-глюкозилтрансфераза 1, участващ в посттранслационната модификация и функция на Notch сигнализацията.

Активността на протеин О-глюкозилтрансфераза 1 (*POGLUT1*) има критична роля в Notch сигналния път, като един от основните ензими, отговорни за гликозилизацията на екстрацелуларния домейн на Notch рецепторите. [Fernandez-Valdivia R и съавт., 2011, Rana A и съавт., 2011]. Регенерацията на скелетните мускули от мускулни сателитни клетки е физиологичен механизъм, активиран при мускулно увреждане и регулиран от Notch сигналните пътища. Гликозилирането на извънклетъчния домен на рецепторите на Notch е от съществено значение за сигналния път на Notch, който контролира съдбата на клетките по време на процесите на развитие в множество тъкани, включително скелетните мускули. [Harvey M и съавт., 2018, Varshney S и съавт., 2018, Yu H и съавт., 2019]. Сателитните клетки са мускулно специфични зрели стволови клетки, които допринасят основно за растежа и възстановяването на скелетните мускули. Въпреки непрекъснатата регенерация, запасът от СК се поддържа в здрави мускули чрез асиметрични клетъчни деления, които поражда както самообновяване на СК, така и ангажирани миогенни предшественици. [Kuang S и съавт., 2007, Sacco A и съавт., 2008]. В този процес, пътят на Notch е ключов за поддържане стабилността на СК и за насочване на миобласти, получени от СК. Не са установени първични дефекти на СК или Notch при мускулни заболявания при човека. [Bjornson C и съавт., 2012, Brohl D и съавт., 2012]. Мутацията p.D233E, която е установена при пациентите, драстично намалява активността на О-глюкозилтрансферазата, което води до нарушена сигнализация на Notch, дефекти в пролиферацията и диференциацията на СК и изчерпване на СК пул като основна причина за тази форма на ПКМД. [Servian-Morilla E и съавт., 2016]. От мускулната

биопсия се установява мускулно-специфично хипогликозилиране на α -дистрогликан и намалено свързване с ламинин, но нормално свързване с агрин и нормална структура на базалната мембрана. Освен това, за разлика от други дистрогликанопатии, фибробластите на пациентите показват нормално α -дистрогликаново гликозилиране и свързване с ламинин. [Servian-Morilla E и съавт., 2016]

В последствие С. Paradas и колектив съобщават за кохорта от 15 пациенти с ПКМД с различни мутации в *POGLUT1*. Пациентите показват клиничен спектър на заболяването със силно променлива възраст на начало и общ фенотип на ПКМД. Един от пациентите е с начало от раждането, двама пациенти с начало преди 3-годишна възраст и 12 пациенти с начало при възрастни (от 2 до 5 декада). Слабостта засяга предимно проксималните мускули с ясен превес в долните крайници и бавна прогресия. Пациентите с начало в юношеска възраст са загубили самостоятелна походка между третото и петото десетилетие. При повечето пациенти има криловидни лопатки. При пациентът с клиника още след раждането, симптоматиката се изразява в хипотония с проксимална слабост на долни крайници след прохождение и по-нататъшна прогресия с лека слабост, хипотрофии и контрактури на горните крайници. Описана е лека лицева слабост, птоза и носов говор. Леко до тежко респираторно засягане е налице при 1/3 от пациентите след средата на 40-та декада, независимо от възрастта на началото. Не са открити значими булбарни, сърдечни или други системни прояви. Нивото на серумната КФК е нормално, с изключение на четирима пациенти, при които се наблюдава леко повишение.

Мускулният МРТ или КТ образ изобразява характерен модел на мастна дегенерация „отвътре-навън“ при всички пациенти. Този специфичен модел на частична дегенерация на мускулите, започвайки от вътрешните сегменти, ангажира *m. vastus lateralis*, *medialis* и *intermedius*, задната част на бедрото и *m. gastrocnemius*. Тези рентгенографски промени са по-видими в началните етапи на заболяването, но се наблюдават и в напредналите етапи на заболяването в *m. vastus lateralis*. Мускулите на подбедриците са по-добре запазени от мускулите на бедрото, дори когато вторите демонстрират напреднал дегенеративен процес.

Имунофлуоресцентно оцветяване с антитела срещу гликозилиран α -дистрогликан разкрива редукция на гликозилираната форма на α -дистрогликан при сарколемата във всички мускулни биопсии, за разлика от нормалното оцветяване от антитела срещу α -

дистрогликановата сърцевина. Western blot анализът показва намаляване на гликозилирането на α -дистрогликан и малко намаляване на молекулното тегло на гликозилиран α -дистрогликан в скелетните мускули, заедно с намалена ламинин-свързваща активност в теста за наслагване на лиганда. Western blot анализът показва също, че нивото на NOTCH1 вътреклетъчният домен в скелетната мускулатура е намалено при пациенти в сравнение с контролите, което подкрепя хипотезата, че мутациите засягат Notch активността, както е демонстрирано за p.D233E. В съответствие с критичната роля на сигнализирането на Notch в регулирането на поддържането на СК, се открива намален брой PAX7+ клетки в мускула на пациентите. [Paradas C и съавт., 2019].

1.5.4.11. ПКМД R24 POMGNT2-асоцирана

POMGNT2 е протеин в ендоплазмения ретикулум, който катализира втория етап от O- манозилното гликозилиране в муцин-подобния домен на α -ДГ за производство на функционални ламинин- свързващи гликани. [Yoshida-Moriguchi T и съавт., 2013., Yoshida-Moriguchi T и съавт., 2010].

Високите нива на експресия на човешки *POMGNT2* в мозъка, мускулите, сърцето и бъбреците в тъканите на плода, както и на възрастните, предполагат значението на този ген по време на развитието. [Manzini M и съавт., 2012]. Endo Y и съавт. докладват за пациенти с лека форма на ПКМД дължащи се на нови хомозиготни или двойно хетерозиготни погрешносмислени мутации в *POMGNT2* гена. [Endo Y и съавт., 2012]. Клиничната картина е представена от ПКМД фенотип с умствена изостаналост с ранно начало, както и повишени стойности на КФК, хипертрофия на подбедриците без мускулна слабост с или без интелектуално засягане.

1.5.5. ПКМД с дефекти в мембранната репарация:

1.5.5.1. ПКМД 2B /R2 дисферлин асоцирана

Първичните дисферлинопатии са хетерогенна група автозомно-рецесивни мускулни дистрофии, причинени от мутации в човешкия ген *DYSF*, разположен на хромозома 2p13, кодиращ протеинът дисферлин (*DYSF*) [Liu J I и съавт., 1998]. (*DYSF*,

MIM# 603009). Дефицитът на дисферлин води до два основни фенотипа: ПКМД 2B/R2 и Miyoshi миопатия (ММ). [Liu и съавт., 1998, Bashir R и съавт., 1998], а в последствие са описани и още няколко - миопатия на дисталния преден компартмент [Illa I и съавт., 2001], повишени стойности на КФК без миопатия, проксимо-дистален модел и псевдометаболитно заболяване. [Nguyen K и съавт., 2007]. Дисферлинът е 230 kDa трансмембранен протеин, който участва в процеса на възстановяване на мембраната, диференциация на миобластите, T- тубулогенеза и мускулна регенерация, най-вероятно чрез механизми на мембранна организация [Klinge L и съавт., 2009]. Намира се върху плазмената мембрана на скелетните мускули и е дефицитен при пациенти с ММ и ПКМД2B/R2 [Anderson V и съавт., 1999, Matsuda C и съавт., 1999]. Въпреки това, възниква атипично имунооцветяване при изследване на мускули от пациенти с мутации в дисферлиновия ген [Saito A и съавт., 2002, Tagawa K и съавт., 2003] и експресията на дисферлин не е нормална при саркогликанопатия, дистрофинопатия, [Piccolo и съавт., 2002] кавеинопатия, [Matsuda C и съавт., 2001, Tateyama M и съавт., 2002] и калпаинопатия. [Tagawa K и съавт., 2003]. Следователно окончателната диагноза на първична дисферлинопатия може да бъде установена само чрез липсата на оцветяване с дисферлин при Western blotting и / или наличието на два мутирални алела в генния анализ. [Kesper и съавт., 2009].

Дисферлинът е хомолог на гена *Caenorhabditis elegans fer-1*, който медира сливането на везикули с плазмената мембрана в сперматидите. [Strogatz H и съавт., 2001]. Bansal и съавт. през 2003 описват, че мишки с нулев дисферлин поддържат функционален дистрофин-гликопротеинов комплекс, но въпреки това развиват прогресивна мускулна дистрофия. Откритията им показват, че нарушаването на механизма на възстановяване на мускулната мембрана е отговорно за мускулната дегенерация при заболяванията с дефицит на дисферлин и подчертават важността на този основен клетъчен механизъм за повторно запечатване на мембраната при мускули дистрофии при хора. Възстановяването на мембраната е активен процес във влакната на скелетните мускули и дисферлинът играе съществена роля в този процес.

Не са установени мутационни „горещи точки“ и идентични мутации могат да са свързани с различни фенотипове дори при пациенти от едно и също семейство [Illarioshkin N и съавт., 2000, Weiler T и съавт., 1999, Aoki M и съавт., 2001], като причината за тази клинична хетерогенност остава неясна. [Argov Z и съавт., 2000,

Vilchez J и съавт., 2005]. Пациенти с ранно начало на заболяването или в предсимптоматичен стадий са идентифицирани чрез асимптомно повишаване на КФК или МРТ промени. [Brummer D и съавт., 2005, Leshinsky-Silver E и съавт., 2007].

ПКМД 2В/Р2 се характеризира със засягане на проксималните мускули, а пациентите, засегнати от ММ, се проявяват с дистална мускулна слабост в началото. По време на хода на заболяването фенотиповете показват значително припокриване, така че слабостта може да ангажира от проксималните към дисталните мускулни групи и обратно. Факторите, отговорни за тези различни модели на засягане са неизвестни. [Klinge L и съавт., 2009].

Откритие в спектъра на мускулните дистрофии е, че по-голямата част от пациентите с дефицит на дисферлин имат добра мускулна сила преди появата на симптомите, което води до добро представяне в спорта или до способността да се справят добре с физическо натоварване, въпреки че това се предполага от главно непотвърдени доказателства. Това наблюдение противоречи на клиничния ход на други мускулни дистрофии, при които повечето пациенти описват прояви на нарушена мускулна функция преди появата на явна слабост. Този аспект все още не е официално оценен, но може да бъде отличителна черта на пациентите с дефицит на дисферлин. [Klinge L и съавт., 2009]

Началото на заболяването обикновено е в зряла възраст и прогресията е бавна. [Nguyen K и съавт., 2007, Ueyama H и съавт., 2002, Linssen H и съавт., 1997]. Средната възраст на начало е 20 години (диапазон 7-73 години) и по-голямата част от пациентите са се появили в ранна зряла възраст (между 19 и 27 години). Въпреки това, има не малко случаи, които са станали симптоматични преди 13-годишна възраст [Klinge L и съавт., 2009]. Този широк диапазон на възрастта на началото е допълнително подкрепен от скорошен доклад за двама братя и сестри с дефицит на дисферлин, проявяващ се с начало след раждането. [Paradas C и съавт., 2009]. В другия край на спектъра, една пациентка е описана с прояви в осмото десетилетие с мускулна скованост, а не със слабост. [Klinge L и съавт., 2008]. Има описани случаи, при които три жени са придобили симптоми на заболяването скоро след забременяване (две с ПКМД и 1 с ММ), протичащи с по-остър ход на заболяването, което маркира бременността като възможен тригер на началото на заболяването [Klinge L и съавт., 2009]. Налице е проксимална слабост на долните крайници във фенотипа ПКМД 2В и

затруднено ходене на пръсти при ММ. Плантарната флексия, аддукцията и екстензията в тазобедрената става са най-затруднените движения. Мускулите на ръцете са сравнително добре запазени, а криловидни лопатки и контрактурите не са често срещани особености. Асиметрично мускулно засягане е описано при пациенти с ММ, но не и при ПКМД2В/Р2. Силно статистически значима находка е по-изразено засягане на долните крайници в сравнение с горните крайници. С напредване на заболяването в крайните етапи, някои от пациентите загубват самостоятелна походка, като няма значителна разлика в това от кой първоначален фенотип е започнало на заболяването. [Klinge L и съавт., 2009]. Нивата на КФК са повишени при всички пациенти - около 7000 iU/l (като варират от 300 до 19000). [Klinge L и съавт., 2009]. Изявена сърдечна патология не се наблюдава често, но има установени единични случаи с дилатативна кардиомиопатия. [Wenzel K и съавт., 2007, Guglieri и съавт., 2008]. Респираторната функция е запазена при всички пациенти, въпреки че някои от пациентите съобщават за симптоми, съвместими с нощна хиповентилация. При повечето пациенти се наблюдава с проксимално или дистално начало, много рядко проксимално и дистално засягане едновременно, въпреки че с прогресията на заболяването разликите се размиват.

Kesper I и колектив през 2009 г. описват МРТ данни за леки до умерени промени в тазовите мускули и умерено до тежко засягане както на предната, така и на задната част на бедрото при характерно запазване на *mm. sartorius* и *gracilis*. При подбедриците задният компартмент е по-засегнат с относително запазване на медиалните глави на *m. gastrocnemius*. Това обаче не е безспорно, тъй като други автори описват по-изявено засягане на задната в сравнение с предната част на бедрото при първични дисферлинопатии. [Brummer D и съавт., 2005, Cupler E и съавт., 1998]. Преобладаващите промени в сигнала в задната част на подбедрицата са общи характеристики във всички изследвания с МРТ при първични дисферлинопатии. [Brummer D и съавт., 2005, Cupler E и съавт., 1998, Illa I и съавт., 2007, Fischer D и съавт., 2005]. Описват и запазването на *m. gracilis* и *m. sartorius* и изразените промени в сигнала в латералната, а не в медиалната глава на *m. gastrocnemius* при пациентите с ММ, които не са наблюдавани преди това.

1.5.5.2. ПКМД 2L/ R12- anoctamin 5 асоциирана

ПКМД 2L/R12 фенотипът е описан за първи път през 2007 г. при 14 пациенти с френско-канадски произход, демонстрирайки атрофия и слабост на мускулите *m. quadriceps* и *m. biceps brachii*. [Jarry J и съавт. 2007]. През 2010 г. е установен и първия асоцииран ген- *ANO5* [Bolduc V и съавт., 2010]. След това е обявена като третата най-честа форма на ПКМД в Северна Европа. [Hicks D и съавт., 2010, Witting N и съавт., 2013].

ANO5 кодира предполагаем калций-активиран хлорен канал, познат като аноктамин 5, който играе роля във възстановяването и транспорта през мускулно клетъчната мембрана. [Hartzell C и съавт., 2009, Griffin A и съавт., 2016]. Рецесивни мутации в *ANO5* причиняват ПКМД 2L/R12, Мийоши- подобна дистална миопатия тип 3 (MMD3), асимптомно повишаване на КФК, миалгия с вариалбилна нетолерантност към физическо натоварване. [Bolduc V и съавт., 2010, Hicks D и съавт., 2011, Schessl J и съавт., 2012, Papadopoulos C и съавт., 2017].

ПКМД 2L/R12 е асоциирана с мутации в аноктамин-5 гена (*ANO5*). *ANO5* е локализиран в Хр 11p14.3, с дължина 90,192 bp и съдържа 22 екзона. Този ген кодира аноктамин-5 (*ANO5*), белтък с тегло ~100-kDa, съставен от 913 аминокиселини, съдържащи осем трансмембранни домейна. [Kato M и съавт., 2004, Hicks D и съавт., 2011]. Този белтък принадлежи към семейството на 10 белтъка (*ANO1-10*), включени в множество клетъчни функции като йонен транспорт, фосфолипидно кодиране, регулация на други трансмембранни протеини. [Pedemonte N и съавт., 2014, Tian Y и съавт., 2012]. Докато при *ANO1*, *ANO2*, *ANO6*, *ANO8* и *ANO9* е установено, че кодират калций- активиран хлорен канал, точната функция на *ANO5* все още остава неизяснена. За момента се смята, че *ANO5* е ангажиран с процес, отнасящ се за възстановяването на мускулната мембрана и йонен транспорт. [Pedemonte N и съавт., 2014, Tian Y и съавт., 2012]. *ANO5* е разположен в ендоплазмения ретикулум (ER), където е позициониран да действа като вътреклетъчен канал. [Tsutsumi S и съавт., 2004]. В допълнение *ANO5* е високо експресиран в сърдечните и скелетните мускули, както и в хондроцитите и остеобластите, което предполага важна роля в мускуло-скелетната система. [Mizuta K и съавт., 2007].

Постоянно разширяващият се спектър от *ANO5*-свързани клинични фенотипове е много разнообразен. Мнозинството от познатите мутации са рецесивни

и водят до мускулно заболяване, но има и редки доминантни мутации, които водят до различна нозологична единица- гнатодиафизна дисплазия [Tsutsumi S и съавт., 2004, Mizuta K и съавт., 2007, Jin L и съавт., 2017]. Мускулният фенотип варира от асимптомно повишаване на КФК, миалгии предизвикани от физическо натоварване до проксимална или дистална слабост. Най- типичният фенотип е ПКМД 2L/R12, която в световен мащаб и в Северна Европа е една от най-честите, представляваща 10-20 % от случаите на ПКМД. [Savarese M и съавт., 2015, Nigro V и съавт., 2014, Witting N и съавт., 2013].

Досега има установени множество мутации в *ANO5* и много от тях са локализирани в екзоните, кодиращи цитоплазмено разположени домейни, предимно в дългия 229 аминокиселини N-терминален сегмент. [Savarese M и съавт., 2015, Penttilä S и съавт., 2012]. Първата открита и най-честа мутация описана досега е с.191dupA (р.Asn64LysfsTer15) в екзон 5, като причина за това се смята защото е вероятно с ефект на родоначалника. [Savarese M и съавт., 2015, Andreeva V и съавт., 2016, Papadopoulos C и съавт., 2017, Sarkozy A и съавт., 2013].

Клинично ПКМД 2L/R12 се характеризира с асиметрично мускулно засягане с атрофия на *m. quadriceps femoris* и *biceps brachii*. Началото на заболяването е в зряла възраст и пациентите обикновено не загубват самостоятелна походка. [Nigro V и съавт., 2014]. Отличителни черти на ПКМД 2L/R12 спрямо другите форми на ПКМД, са наличието на полово обусловени разлики в протичането- жените са по-рядко, но по-тежко засегнати от мъжете [Sarkozy A и съавт. 2013], асиметричното ангажиране на мускулите [Mercuri E и съавт., 2013], болка след и интолеранс към физическо натоварване, характерни за метаболитни или възпалителни миопатии [Milone M и съавт., 2011].

Всички досегашни проучвания са доказали изразена хетерогенност на наблюдаваните фенотипове, включително асиметричната атрофия и слабост, засягащи първоначално квадрицепса, тазовите мускули и бицепса, късното начало и бавната прогресия. [Bolduc V и съавт., 2010, Hicks D и съавт., 2011, Sarkozy A и съавт., 2013, Magri F и съавт., 2011, Penttilä S и съавт., 2012]. Слабостта на проксималните и дисталните мускули на долни крайници, нетолерантността към физическо натоварване, т.нар. „псевдометаболитен“ фенотип и амилоидните депозити в мускулите [Milone M и съавт., 2011, Liewluck T и съавт., 2013] са характеристики,

представени при пациенти с аноктаминопатия или дисферлинопатия. [Cacciottolo M и съавт., 2011]. Обичайно сърдечната и дихателната функция са запазени. Редките сърдечни промени могат да включват кардиомиопатия и/или левокамерна дисфункция. [Hicks D и съавт., 2011].

Пациентите с ПКМД 2L/R12 показват хомогенен модел на мускулно засягане от МРТ на мускулите. При по-голямата част от пациентите се наблюдава хомогенно участие на седалищните мускули, проксимални и дистални мускули на долните крайници, основно засягане на мускулите на задните отдели на бедрата и прасците и неравномерно засягане на предната част на бедрото. Най-засегнатите мускули на бедрата са *m. semimembranosus*, дългата глава на *m. biceps femoris*, аддукторната група, докато *m. vastus lateralis, medialis* и *intermedius*, *m. rectus femoris*, късата глава на *m. biceps femoris*, *m. semitendinosus*, *m. gracilis*, *m. sartorius* са значително по-малко ангажирани. В подбедриците най-засегнатите мускули са *m. gastrocnemius* (особено медиалната глава) и *m. soleus*, докато тибиялните и фибуларните мускули обикновено са запазени. *M. iliopsoas* е запазен при всички наблюдавани пациенти. При обратното изследване на мускулите на горните крайници, най-засегнатите мускули са *m. biceps brachii*, *m. triceps brachii* и *deltoideus*. При някои от пациенти е описано средно към тежко засягане на спиналната мускулатура, а при някои и леко към умерено засягане на коремната. За повечето пациенти има МРТ данни за категорично асиметрично засягане на мускулите, както и различна степен на тежест и модел на засягане. Описана е и МРТ фенотипна вариабилност на тежестта и мускулното засягане между членовете на едно семейство.

При някои пациенти са открити STIR аномалии в нормално появяващ се *m. gastrocnemius*, което предполага, че възпалителните промени могат да представляват пресимптомни мускулни находки. Интересното е, че по-възрастните асимптомни пациенти, съответно на възраст 21 г., 37 г. и 53 г., показват умерено до тежко участие на мускулите на долните крайници при изобразяване на мускулите, с модел на патология, подобен на този, който е имал са наблюдавани при симптоматични пациенти, което предполага, че потенциално скоро могат да развият клинични симптоми. [Sarkozy и съавт., 2012].

Асиметрията, която често се наблюдава клинично при пациенти с ПКМД 2L/R12, се отразява от подобен модел на мускулната МРТ, като пациентите показват леко

засягане от едната страна и тежки промени от другата. При изследване на цяло тяло се наблюдава умерено до тежко засягане на екстензорите на гръбнака, демонстриращо се с аксиална слабост при по-възрастните пациенти. Като допълнение при пациенти е описан градиент на засягането на дисталната части на квадрицепса, отколкото в проксималната, с по-изразено заместване на мускулна с мастна тъкан, както и се наблюдава белег, описан като „ундулираща фасция“, представляващ нагъната фасция между тежко атрофичните и мастно-инфилтрираните *vastus intermedius* и *vastus lateralis*. Въпреки модела на унаследяване (AR), който предполага еднакво засягане при половете, от МРТ изследванията се описва фенотипни разлики в тежестта на засягане на мускулите. И при ПКМД 2L/R12 мъжете са по-често засегнати от жените. [Sarkozy и съавт., 2013].

От хистологичните изследвания биопсиите демонстрират миопатни или дистрофични промени с промяна в размера на влакната, централните ядра, разделяне на влакната, дегенерацията на мускулните влакна и увеличаването на междуфасцикуларната и интрафасцикуларната съединителна тъкан. Регенериращи влакна са открити в диапазона от 2% до 40% от влакната, което е показано чрез оцветяване на тежката верига на новородения миозин. Hicks и съавт. описват случаи с при които са установени разпръснати влакна с възпалителни инфилтрати, и пациент с повишени възпалителни маркери [Hicks D и съавт., 2011].

1.5.6. ПКМД R23- ламинин $\alpha 2$ асоциирана

Ламинин-2 (наричан също мерозин), хетеротримерен протеин, съставен от три различни субединици ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), е основен компонент на базалната мембрана на скелетните мускулни влакна, Швановите клетки в периферните нерви, мозъчните капиляри и субмандибуларните жлези [Hohenester E и съавт., 2013]. Той принадлежи към голямо семейство от гликопротеини, участващи в архитектурата на извънклетъчния матрикс, клетъчната адхезия и диференциация и медира прикрепването, миграцията и организацията на клетките в тъканите по време на ембрионалното развитие чрез взаимодействие с други компоненти на извънклетъчния матрикс [Hohenester E и съавт., 2013, Yurchenco PD 2011]. Мутациите в гена *LAMA2* (хромозома 6q22.33), който кодира алфа 2 веригата, досега са идентифицирани като

причина за два различни клинични фенотипа: ранна вродена мускулна дистрофия (ВМД), известна също като ВМД1А (вродена мускулна дистрофия 1А).

Наскоро мутациите на *LAMA2* са признати за отговорни за ПКМД R23, въпреки че са докладвани само няколко случая с бавно прогресиращо начало при възрастни и частичен дефицит на мерозин. [Straub V и съавт., 2017]. В последствие Magri F и съавт. описват 5 независими италиански пациенти с прогресивна мускулна слабост тип пояскрайник, аномалии на бялото мозъчно вещество, дефицит на мерозин и *LAMA2* генни мутации. Всички пациенти показват нормално психомоторно развитие и бавно прогресираща слабост с начало, обхващащо периода от детството до четиридесетте години. Нивата на креатинкиназата са умерено повишени. МРТ на мозъка показва типична широко разпространена хиперинтензност на бялото вещество в T2-секвенциите. Мускулната биопсия често, но не непременно, разкрива дистрофични характеристики. Western-blot обикновено е по-точен от имунохистохимичния анализ при откриване на дефицит на мерозин.

Описанието на тези случаи допълнително разширява клиничния спектър на свързаните с *LAMA2* разстройства. Освен това той поддържа включването на ПКМД R23 в новата класификация на ПКМД. Засягането на централната нервна система е от основно значение за поставяне на диагнозата и трябва да бъде включено в диагностичната преценка на недиагностицирани пациенти, суспектни за ПКМД. [Magri F и съавт., 2020].

1.5.7. Автозомно-доминантни форми

1.5.7.1. ПКМД 1D/D1 DNAJB6 асоциирана

Описана е подробно към група Z-диск протеинопатии.

1.5.7.2. TNPO3 D2/1F TNPO3- асоциирана

ПКМД 1F или ПКМД D2 TNPO3- асоциирана (OMIM #608423) е идентифицирана за първи път в италиано-испанско семейство с проксимална и аксиална мускулна слабост. [Gamez J и съавт., 2001]. Тя се отнася към групата на заболяванията на ядрената мембрана по патогенетичен механизъм. Генът *TNPO3* кодира транспортин-3 (TNPO3) протеин, който принадлежи към семейството

импортин-бета и участва пряко в преместването на протеин от цитоплазмата към ядрото. [Maertens N и съавт., 2014]. TNPO3 свързва и транспортира протеини, богати на серин/аргининови домени (SR) и няколко от тези SR протеини включват протеини, участващи в сплайсинга и метаболизма на иРНК. [Lai M и съавт., 2000, Lai M и съавт., 2001]. Ролята на TNPO3 в мускулите е неизвестна и не е ясно как мутациите в *TNPO3* води до клиничните характеристики на заболяването ПКМД D2. Като се има предвид централната роля на TNPO3 в ядрения внос на фактори и протеини, участващи в сплайсинга и метаболизма на РНК, може да се направи широк спектър от хипотези за патомеханизма на ПКМД D2. [Casta и съавт., 2020].

Gamez и колектив през 2001 г. описват клиничната характеристика и мускулна хистология на форма на АД- ПКМД в голямо испанско семейство, като са картографирали локуса на заболяването върху 3,68 Mb регион на хромозома 7q32.1-32.2. Пациентите са развили проксимална мускулна слабост с различна възраст на начало, варираща от по-малко от 1 година до 58 години. Възрастта в началото на третото до петото поколение е значително по-ниска от предходните, което предполага антиципация. Идентифицирани са две групи въз основа на възрастта на началото и клиничната прогресия: юношеска група с ранна възраст на начало (преди 15 години) и бърза прогресия и група възрастни, обикновено започваща през третото или четвъртото десетилетие с относително бавна прогресия. Симптомите на мускулна слабост на тазовия пояс се наблюдават в началото при повечето пациенти. Често засегнатите мускули са *m. iliopsoas*, седалищният мускул, аддукторите на тазобедрената става, *m. deltoideus*, *m. biceps brachii*, параспиналните мускули и флексорите на врата. Увреждането на тазовия пояс е по-тежко и настъпва по-рано, отколкото в раменния пояс. Проксималната мускулна слабост е със симетрично разпределение. Дисталната слабост се появява късно в хода на заболяването или придружава първоначалните симптоми при тежко засегнати пациенти с ювенилно начало, като често засяга *m. extensor digitorum*, *m. tibialis anterior* и екстензорния мускул на пръстите на краката. При някои пациенти са описани криловидни лопатки. Някои пациенти с ювенилно начало показват лека слабост на лицевата мускулатура 10 години след началото. Пациентите с ранно начало са имали генерализирано мускулно отслабване, включващо предимно *m. quadriceps*, *mm glutei*, *m. deltoideus*, *m. biceps brachii*, *m. infraspinatus*, *m. supraspinatus*. Контрактури и сколиоза се наблюдават

в края на заболяването при пациенти от групата с ювенилно начало. Дихателните мускули са клинично засегнати при някои с ювенилна форма. Нивата на серумната креатинфосфокиназа варират от нормални до почти 20 пъти над горната граница на нормата. Клиничните и хистологични характеристики на пациентите с тази форма на АД ПКМД не са достатъчно характерни, за да предложат специфична етиологична категория. ЕМГ показва миогенни промени с АП с кратка продължителност, полифазия и нискоамплитудни потенциали, които са по-изразени в проксималните мускули. Не се наблюдават сърдечни и мозъчни увреждания. [Gamez и съавт., 2001]. Paterle и колектив през 2013 г. добавят дисфагията като възможен белег на заболяването, наблюдаван при 27% от случаите, както и арахнодактилия със или без контрактури на пръстите при 21% от изследваните от тях пациенти. При някои пациенти са описани дизартрия и хипертрофия на прасците.

При ПКМД 1F/D2 МРТ на мускулите демонстрира проксимално засягане на раменния и тазовия пояс с фибро-мастно заместване на мускули и активни промени в мускулна биопсия. Цитоплазмените включвания и миофибриларните десмин-миотилин положителни агрегати в мускулните влакна споделят прилики с морфологичните находки, наблюдавани при миофибриларните миопатии. Промените, които се наблюдават в биопсии от мускулите на четириглавия бедрен мускул, съответстват на различната степен на засягане, наблюдавана чрез изобразяване на мускулите.

1.5.7.3. ПКМД D3/1G HNRNPDL- асоциирана

ПКМД свързана с *HNRNPDL* (MIM#609115), е ПКМД 1G/D3, представлява изключително рядка автозомно- доминантна миопатия с начало в зряла възраст, съобщавана досега при по-малко от 30 случая от едно китайско, четири латиноамерикански и едно италианско семейство. [Vieira M и съавт., 2014, Sun Y и съавт., 2019, Berardo A и съавт., 2019, Malfatti E и съавт., 2020]. Всички пациенти са имали мутации, засягащи един и същ остатък, разположен в прион-подобния протеинов домейн. hnRNPDL действа като регулатор на пре-mRNA сплайсинга и ядрения износ. Смята се, че мутациите на *HNRNPDL* причиняват дефекти в биогенезата и метаболизма на иРНК. Доказано е, че този ДНК/РНК-свързващ протеин

се локализира в цитоплазмата и в ядрото. Данни от проучване на Vieira и съавт. от 2014г., предполагат, че транслокацията на протеина от цитоплазмата към ядрото може да бъде нарушена от р.(Asp378Asn) мутацията. Това може да попречи на протеина да достигне до ядрото, за да изпълни своята функция при узряване преди иРНК. *HNRNPDL* мутации са свързани с различни заболявания поради решаващата им роля в регулирането на генната експресия [Berardo и съавт., 2019].

Общи характеристики на свързаната с *HNRNPDL* мускулна дистрофия са типичния клиничен фенотип с късна поява на слабост тип пояс-крайник и дистална слабост на горните и долните крайници. Наблюдавани са също асиметрични криловидни лопатки, дистална атрофия. От МРТ на бедрената мускулатура се наблюдава наличието на общ патогномоничен модел на мускулно засягане със запазване на *m. rectus femoris* и *m. adductor longus* дори в напреднал стадий на заболяването. *Vastus muscles* се засягат ранно и в изразена степен и вероятно могат да корелират с ранните падания на пациентите. В горните крайници се наблюдава заместване на мускулната тъкан с мастна в делтоидния мускул двустранно и гръдните, флексорно-екстензорните мускули на лакътя, свързано с намаляване на мускулния обем. Описано е засягане на дихателните мускули със слабост на диафрагмата, налагаща неинвазивна вентилация, при италианското семейство. [Malfatti E и съавт., 2020]. Честа находка е двустранната катаракта. [Li RZ и съавт., 2018]. Серумните нива на КФК са в норма или леко повишени. Няма данни за сърдечно засягане/ [Berardo и съавт., 2019].

Мускулна хистология е налична за един пациент и е описана като „миопатен модел“ с променливост на размера на влакната, некротични влакна, групи от атрофични влакна и „rimmed“ вакуоли. Електронната микроскопия демонстрира автофагични промени с множество вакуоли, съдържащи мембранни остатъци, миелоидни тела, цитоплазмени тела и някои нишковидни материали [Berardo и съавт., 2019].

1.5.7.4. ПКМД D4 Калпаин-3 асоциирана

Описана е подробно към групата на калпаинопатиите (виж т. 1.2.1.2).

1.5.8. COLL6 свързани ПКМД

Колаген VI свързаните заболявания са автозомно-доминантни или рецесивни заболявания с фенотипове, вариращи от тежка вродена мускулна дистрофия до по-леки форми с начало в зряла възраст и обикновено са придружени от различна степен на ставни контрактури [Jokela M и съавт., 2019] Мускулните колагенопатии се причиняват от мутации в гени *COL6A1*, *COL6A2* или *COL6A3*, които кодират различни алфа-субединици на секретирани от фибробласти фибрили на колаген VI, отложени в екстрацелуларния матрикс. Колаген VI е необходим за физическата цялост и сцеплението на мускулната тъкан, както и за сигналните функции. [Fichna J P и съавт., 2018]. ПКМД-тип колагенопатия без контрактури е описвана рядко и според новата класификация на Европейския невромускулен център се обозначена като ПКМД D5 (доминантна) или ПКМД R22 (рецесивна). [Fichna J и съавт., 2018].

1.6. Диагностициране на пациенти с ПКМД:

Основните етапи при поставяне на диагнозата включват:

- Определяне на характеристиките на мускулно засягане
- Определяне на типа на унаследяване
- Изясняване на принадлежността към етнически или религиозни малцинства
- Изследване на КФК в серум
- Провеждане на електрофизиологична оценка- ЕМГ
- Оценка на сърдечния статус - ЕК, ЕхоКГ
- Оценка на вентилаторните показатели
- Оценка на допълнителни прояви, свързани с мускулното заболяване
- МРТ на мускули
- Мускулна биопсия
- Молекулярно-генетично изследване - за търсене на мутации в конкретен ген, секвениране на екзома или генома.

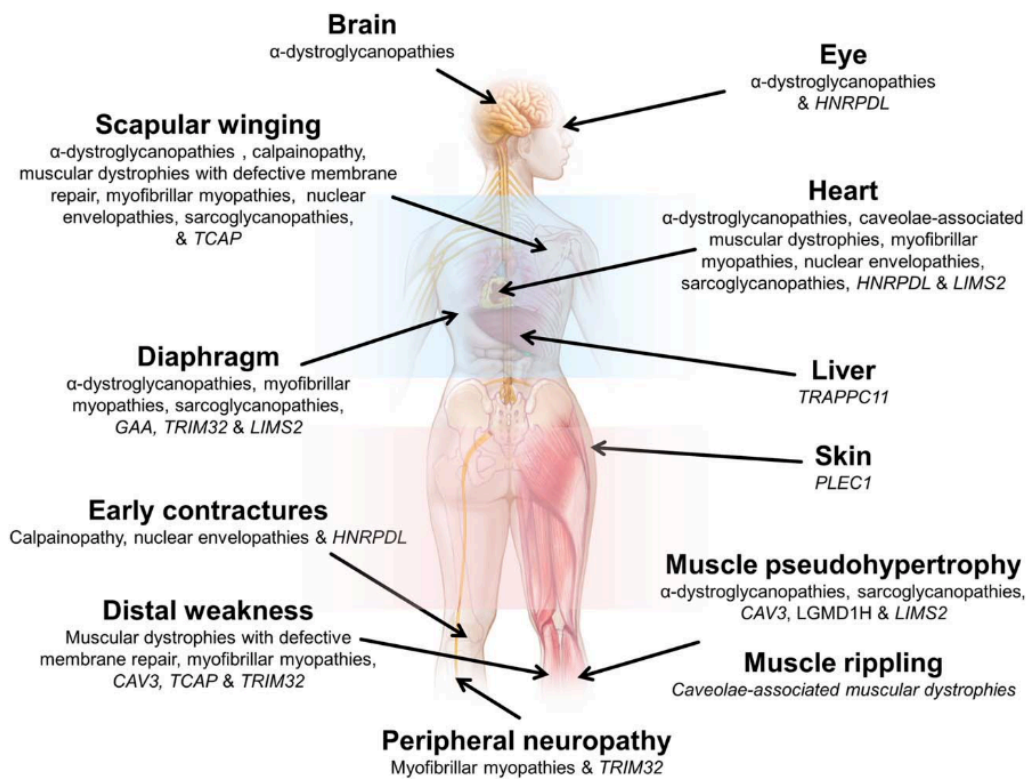
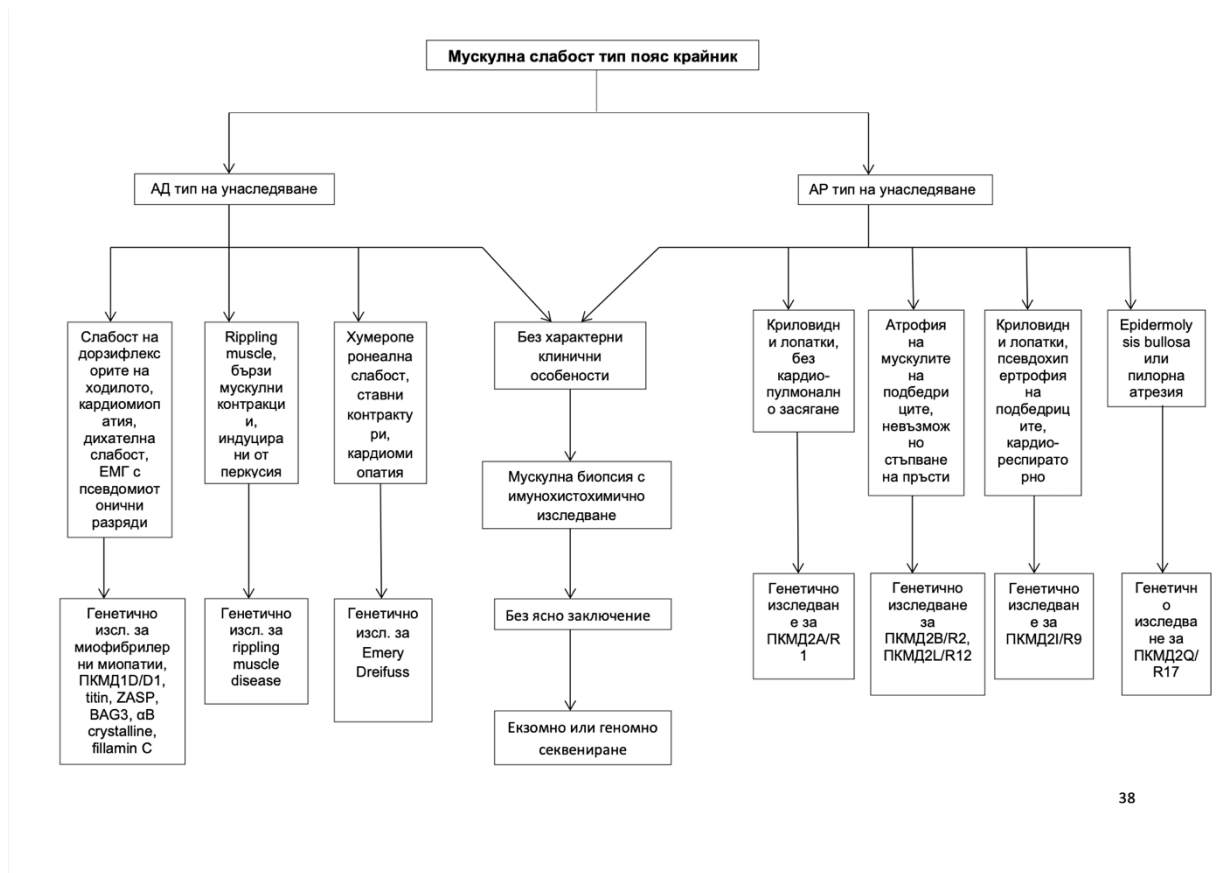


FIGURE 3. Muscular and extramuscular manifestations as the diagnostic clues for LGMD subtypes.

Фигура 5. Мускулни и извънмускулни клинични прояви като диагностична насока за различните форми на ПКМД.

В **Национален консенсус за диагностика, лечение и профилактика на наследствените невромускулни заболявания** е представен диагностичен алгоритъм за изследване на пациенти с мускулна слабост тип пояс- крайник (Фигура 6).

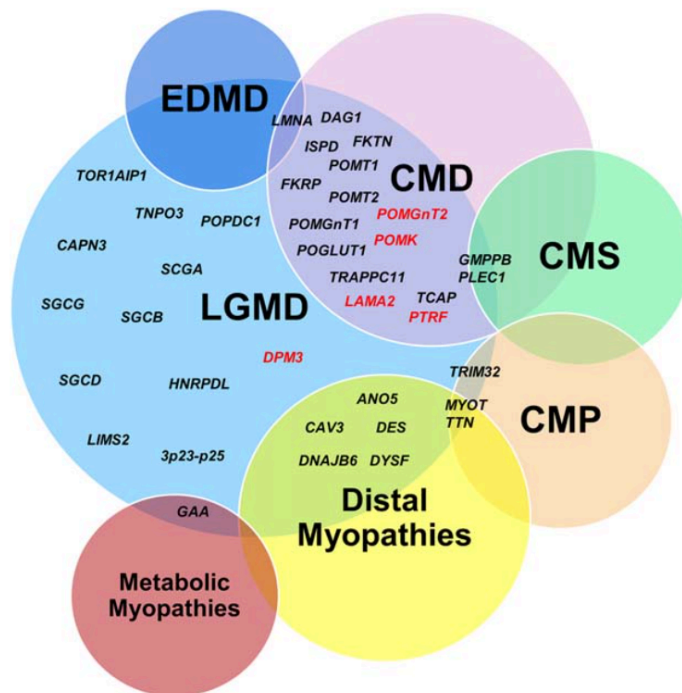


38

Фигура 6. Алгоритъм за изследване на пациенти, суспектни за ПКМД.

1.7. Диференциална диагноза на ПКМД:

Проксималната мускулна слабост, която е в основата на клиничната характеристика на ПКМД е неспецифичен симптом, наблюдаван в комбинация с други прояви, в много други заболявания - генетични и придобити (Фигура 4).



Фигура 4. Припокриващи се фенотипове между гени, причиняващи ПКМД и гени, отговорни за Вродена мускулна дистрофия, Вродени миопатии, Вродени миастенни синдроми, Emery-Dreifuss мускулни дистрофии и метаболитни миопатии; с червено са отбелязани гени, причиняващи ВМД, които също са докладвани с ПКМД фенотип.

В диференциално-диагностичен план е уместно да се имат предвид следните заболявания, при диагностициране на пациент с пояс-крайник тип мускула слабост:

- 1. Дистрофинопатии** са спектър от мускулни заболявания, причинени от мутации на мутациите на DMD гена, разположен на X хромозомата. Включва мускулни заболявания, известни като Прогресивна мускулна дистрофия тип Дюшен и Прогресивна мускулна дистрофия тип Бекер. Мускулната дистрофия тип Дюшен е най-разпространената форма на детска мускулна дистрофия. Заболяването обикновено се разпознава на възраст от три до шест години и има относително бърз, прогресиращ ход. Мускулната дистрофия тип Дюшен първоначално се характеризира с мускулна слабост и отслабване (атрофия) в областта на тазовия пояс, което може да бъде последвано от засягане на раменните мускули. С напредването на заболяването мускулната слабост и атрофията се разпространяват и постепенно прогресират, за да обхванат

повечето основни мускули на тялото. Мускулната дистрофия на Бекер обикновено започва през второто или третото десетилетие от живота. Това бавно прогресиращо заболяване засяга почти изключително мъжете. Мускулите на бедрата и раменете са отслабени, променя се походката. Наблюдава се тежко сърдечно и дихателно засягане, по-изразени при ПМД тип Дюшен. Както мускулната дистрофия тип Дюшен, така и мускулната дистрофия на Бекер се унаследяват Х-рецесивно. Дистрофинопатията е често срещана от всяка форма на ПКМД и също трябва да се има предвид при всеки пациент с пояс-крайник тип слабост. Диагнозата трябва да се има предвид и при жени, тъй като носителите на дистрофинопатия в някои случаи могат да имат мускулни симптоми.

2. **Фациоскапулохумерална мускулна дистрофия (ФСХД)** е друго невромускулно разстройство, което може да се припокрива по симптоми с форми на ПКМД. Симптомите обикновено се проявяват в юношеска или ранна зряла възраст. По-рядко симптомите могат да станат видими още в ранна детска възраст. Заболяването обикновено първоначално се характеризира със слабост на мускулите на лицето, раменете и/или горната част на ръката. Свързаните аномалии могат да включват нарушена способност за пълно затваряне на очите, ограничени движения на устните и трудности при вдигане на ръцете над главата. Засегнатите индивиди в последствие развиват слабост и атрофия на мускулите на бедрата и подбедриците. Въпреки че протичането на заболяването може да варира, ФСХД най-често се характеризира с относително бавна прогресия. Специфичните симптоми също могат да варират по обхват и тежест, включително сред засегнатите членове на едно и също семейство. ФСХД се унаследява АД. Въпреки това, при приблизително 30 процента от засегнатите индивиди, няма видима фамилна анамнеза за заболяването. В някои от тези случаи ФСХД може да се дължи на нови генни мутации, които възникват спонтанно по неизвестни причини (спорадично).
3. **Мускулна дистрофия тип Emery-Dreifuss (ЕДМД)** е рядка, често бавно прогресираща форма на мускулна дистрофия, засягаща мускулите на ръцете, краката, лицето, шията, гръбначния стълб и сърцето. Заболяването включва слабост и атрофия на определени мускули (хумеро-перонеални мускулни

групи), ставни контрактури и аномалии, засягащи сърцето (кардиомиопатия, ритъмно-проводни нарушения. Основните симптоми могат да включват мускулна строфия и слабост, особено в горната част на краката и ръцете и контрактури на лактите, Ахилесовите сухожилия и мускулите на горната част на гърба. В повечето случаи мускулната слабост бавно прогресира. Сърдечните аномалии могат потенциално да доведат до животозастрашаващи усложнения. ЕДМД обикновено се унаследява Х-рецесивно, но може също да се унаследява АД и АР. Автозомно-доминантната мускулна дистрофия тип Emery-Dreifuss се причинява от мутации в ламин А/С, същия ген, участващ в ПКМД 1В и може да има значителни клинични припокривания.

4. **Спинална мускулна атрофия (СМА)**, причинена от делеция на гена *SMN1* върху хромозома 5, е наследствено прогресивно невромускулно заболяване характеризиращо се с дегенерация на алфа мотоневрони. Типичните симптоми са бавно прогресираща мускулна слабост и мускулна атрофия. Засегнатите лица имат слаб мускулен тонус, мускулна слабост без или с минимално участие на мускулите на лицето, потрепване на езика.
5. **Вродените миастенни синдроми (ВМС)** са генотипно и фенотипно хетерогенна група от невромускулни разстройства, които имат общо нарушение на нервно-мускулното предаване. Те имат раноогразна клинична изява, една от които е ПКМД фенотип. Описани са ВМС, дължищи се на мутации в *COLQ*, *DOK7*, *MUSK*, *GFPT1*, *ALG2*, *ALG14*, *DPAGT1* гените, които наподобяват ПКМД. ВМС трябва да се подозира, ако при пациентите се наблюдава лесна уморяемост или постоянна слабост, най-често в очните, лицевите, булбарните, аксиалните, дихателните мускули или мускулите на крайниците с начало от раждането до детството; често има положителна фамилната анамнеза за клинични прояви на ВМС; анамнезата и клиничният преглед предполагат миастения гравис, но когато тестовете за AchR-, MUSK- и LRP4-антитела са отрицателни. Установяват се типични ЕМГ промени, липсва подобрение при имunosупресивна терапия.
6. **Вродените миопатии** са група от генетични мускулни заболявания, характеризиращи се клинично с хипотония и слабост, обикновено от раждането, и статичен или бавно прогресиращ клиничен ход. В исторически

план вродените миопатии са класифицирани въз основа на основните морфологични характеристики, наблюдавани при мускулна биопсия. Различни гени са идентифицирани като свързани с различните фенотипни и хистологични изрази на тези заболявания. През последните години е установена значителна генетична и клинична хетерогенност, като са използвани съвременни генетични методи като екзомно секвениране. Началото обикновено настъпва в неонаталния период. Клиничният фенотип, сам по себе си, остава инсуфициентна основа за разграничаване на различните видове вродена миопатия, тъй като често е слабо специфичен, обикновено се състои от хипотония и слабост (присъстващи при раждането или появяващи се в ранна детска възраст) и статичен или бавно прогресиращ клиничен курс. Въпреки това се признава, че клиничният спектър варира от тежки неонатални форми с вродена артрогрипоза до леки форми с начало в детска възраст с непрогресираща мускулна слабост и намален мускулен тонус.

7. **Метаболитни миопатии** (като Болестта на Помпе). Преди ревизиране на класификацията болестта на Помпе е част от групата на ПКМД. Болестта на Помпе е лизозомно нарушение на натрупването, при което киселата алфа-глюкозидаза (GAA) е дефицитна или липсва. Дефицитът на този лизозомален ензим води до прогресивно запълване на лизозомите с гликоген в множество тъкани, като сърдечният и скелетният мускул са най-силно засегнати. Клиничният спектър варира от фатална хипертрофична кардиомиопатия и скелетно-мускулна миопатия при кърмачета до относително атенюирани форми, които се проявяват като прогресивна миопатия с пояс-крайник тип слабост без сърдечно засягане. Наличната в момента ензимна заместителна терапия (ERT) се оказва ефективна предимно на сърдечните, но не и в такава степен на скелетно-мускулните прояви.
8. **Възпалителни миопатии** като дерматомиозит или полимиозит. Идиопатичните възпалителни миопатии са група от хронични, аутоимунни състояния, засягащи предимно проксималните мускули. Най-често срещаните типове са дерматомиозит, полимиозит, некротизираща аутоимунна миопатия и спорадичен миозит на телца с включване. Пациентите обикновено се проявяват с подостро до хронично начало на проксимална слабост, проявяваща се с

трудност при ставане от стол, изкачване на стълби, повдигане на предмети и разресване на косата. Те се идентифицират чрез клиничното им представяне, състоящо се от мускулни и извънмускулни прояви. Лабораторните изследвания, включително повишена серумна креатинкиназа (КФК) и миозит специфични антитела (MSA), могат да помогнат за диференциране на клиничния фенотип и за потвърждаване на диагнозата. Мускулната биопсия обаче остава златен стандарт за диагностика. Тези нарушения са потенциално лечими с правилна диагноза и започване на терапия [Malik A и съавт., 2016].

9. Миозит, асоцииран с употреба на стероиди. Индуцираната от кортикостероиди миопатия е ятрогенна миопатия, причинена от хронична висока до умерена системна употреба на кортикостероиди. Това е често срещано състояние, което трябва да се диференцира от други ятрогенни и органични причини за миопатия. Диагнозата се основава на висока степен на клинично подозрение при пациенти на хронична терапия със стероиди. Тази токсична невъзпалителна миопатия обикновено има индолентно представяне и засяга предимно мускулите на тазовия пояс и е свързана с мускулна слабост, атрофия, без болка. Острата стероидно-индуцирана миопатия при грижи в интензивно отделение е с друга презентация. Обикновено се установява нормална КФК и никакви други признаци на възпалително заболяване, като ЕМГ изследванията са несигнификантни. Диагнозата се потвърждава, когато мускулната слабост се подобри след 3 до 4 седмици намаляване на стероидите, въпреки че подобрието може да отнеме месеци до година. Освен спиране на стероидите, други възможности за лечение включват преминаване от флуорирани към нефлуорирани глюкокортикоиди или алтерниращ прием. Състоянието обикновено се развива при дози, по-високи от 10 mg, еквивалента на преднизон/ден, използвани в продължение на четири седмици или повече. Въпреки това, 2 до 3 седмици по-високи дози (като 40 до 60 mg преднизон/ден) са свързани с по-остри прояви [Surmachevska N и съавт., 2022].

10. Хипертиреоидни и хипотиреоидни миопатии. Анормалната функция на щитовидната жлеза, повишена или понижена, може да причини миопатия. Нарушенията на щитовидната жлеза могат да доведат до невромускулни прояви, характеризиращи се с проксимална слабост, но асоциирани и с

множество други клинични прояви, асоциирани с хипо- или хиперфункцията на щитовидната жлеза. [Klein и съавт., 2000].

1.8. Проследяване, лечение и грижи за пациентите с ПКМД

Лечението на ПКМД е предимно поддържащо. На този етап няма налична терапия, модифицираща хода на заболяването. Целите на терапията включват поддържане на подвижност и функционална независимост, лекуване на свързаните усложнения и осигуряване на максимално добро качество на живот. Препоръчва се мултидисциплинарно лечение в центрове с опит в невромускулните заболявания, за да се осигури оптимална грижа.

- **Сърце, дишане и диета**

Сърцето може да бъде засегнато при няколко ПКМД, включително ПКМД 1В и ПКМД 2А-I, но това не се случва толкова често, колкото при някои други форми на мускулна дистрофия. Сърдечните проблеми могат да бъдат под две форми — слабост на сърдечния мускул (кардиомиопатия) и необичайно предаване на сигнали, които регулират сърдечния ритъм (ритъмно-проводни). Пациентите с ПКМД с известно кардиологично засягане и тези, при които липсва генетична верификация се насочват за кардиологична оценка - ЕКГ, ехоКГ. При тези с анамнеза за синкопи, аритмии се препоръчва провеждане на холтер ЕКГ. В зависимост от резултата кардиолог преценява необходимостта от поставяне на постоянен кардиостимулатор и приложението на АСЕ-инхибитори, бета-блокери и диуретици. Сърдечна трансплантация може да е необходима за тези, които са развили тежка застойна сърдечна недостатъчност.

Предвид факта, че пациентите с НМЗ може да нямат типичните симптоми на дихателна недостатъчност, като диспнея, при всички болни се препоръчва ежегодна оценка на вентилаторните показатели чрез спирометрия в изправено и легнало положение.

Респираторната функция може да бъде засегната с прогресия на заболяването. Някои форми ПКМД (напр. ПКМД 2I) са свързани със слабост на дихателните или орофарингеалните мускули и повишен риск от дихателна недостатъчност с прогресия на заболяването. При пациенти с ПКМД, които имат данни за респираторна

недостатъчност, сънливост през деня или симптоми на нарушено дишане при сън, пулмолог/анестезиолог преценява необходимостта от дихателно подпомагане чрез инвазивна или неинвазивна вентилация.

Дисфагия и слабост на ръцете, свързани с ПКМД, могат да доведат до недोхранване и загуба на тегло. Пациенти с неадекватен прием на храна, проблеми с преглъщането, аспирация (на храна, слюнка, течности или при повръщане), или загубата на тегло трябва да се оцени с изследвания на гълтането или да се насочи гастроентеролог за преценка на необходимостта от поставяне на гастро- или йеюностома. Такива пациенти могат да се възползват от техники за подобряване на преглъщането, като промяна на консистенцията на храната, използване на маньовър за прибиране на брадичката. Не са известни специални диетични ограничения или добавки, които да влияят пряко върху хода на ПКМД. Може да препоръча диета за намаляване или стабилизиране на теглото при някои пациенти, тъй като значителното наднормено тегло поставя по-голям стрес върху вече отслабените мускули.

- **Помощни устройства**

Прости устройства като бастун или канадка могат да улеснят ходенето и изпълнението на ежедневни дейности с напредването на слабостта. Електрическа инвалидна количка или скутер стават подходящи, когато слабостта в тазовия пояс и горната част на краката причинява чести падания. Хората, при които ПКМД е достигнала този етап, често откриват, че голяма част от тяхната независимост се връща и умората е значително намалена, когато започнат да използват този тип оборудване за придвижване.

- **Трудова терапия и рехабилитация**

Програмите за физическа и трудова терапия обикновено са част от лечението на ПКМД. Трудовата терапия се фокусира върху специфични дейности и функции, по-специално върху използването на ръцете, докато рехабилитацията набляга на мобилността и (където е възможно) укрепването на големи мускулни групи.

Основните цели на рехабилитацията са да позволи по-голямо движение в ставите и да предотврати контрактури. Тези проблеми могат да възникнат, когато движението е ограничено, така че е важно пациентите да продължат да се движат колкото могат повече.

Лекарите и терапевтите имат малко различни мнения относно относителната стойност или опасност от различни режими на упражнения при хора с мускулна дистрофия. При ПКМД някои видове упражнения, причиняващи стрес, могат да ускорят мускулното увреждане, уместно е да се избягват супрамаксимални упражнения с висока интензивност, както и тренировки до изтощение.

Някои експерти препоръчват плуването и водните упражнения като добър начин да поддържате мускулите възможно най-тонизирани, без да причинявате излишен стрес.

- **Ортопедични усложнения**

Пациентите с ПКМД са изложени на повишен риск от мускулно-скелетни деформации на гръбначния стълб, включително кифоза или сколиоза. При наличието на такава е необходимо проследяване чрез провеждане на рентгенографии. При необходимост пациентите се насочва за провеждане на ортопедични операции с цел да се поддържа позата, подвижността, да се поддържа кардиопулмоналната функция и да се подобри качеството на живот.

- **Бъдещи стратегии за лечение**

Лечението на ПКМД през годините не се е променило съществено. Освен наличието на ензимна заместителна терапия за болестта на Помпе, която вече е изключена от групата ПКМД, лечението на пациентите е симптоматично. Постоянно напредващите молекулярно-генетични терапевтични подходи демонстрират обещаващи нови възможности за лечение под формата на exone skipping и генна терапия. От съществено значение за това развитие е да имаме ясно разбиране за фенотипа и естествения ход на заболяването, съществуването на клинично значими маркери за изходни стойности при клинични проучвания, насоки за стандартни грижи, актуални регистри на пациенти и в идеалния случай биомаркери, които могат да помагат да се оцени тежестта на заболяването или лекарствения отговор.

Калпаинопатия

-Bartoli и колеги още през 2006г. оценяват безопасността и ефикасността на медиацията от адено-асоцииран вирус (AAV) калпаин-3 генен трансфер в миши модел на ПКМД 2A, използвайки rAAV2/1 псевдотипизирани вектори и мускулно-специфични промотори, за да се избегне клетъчната токсичност на калпаин 3. Те съобщават за ефективна и стабилна трансгенна експресия в мускула с възстановяване

на протеолитичната активност без видима токсичност, плюс калпаин 3 е правилно насочен към саркомера. През 2013 г. Roudaut et al. съобщават за връзката на летална сърдечна токсичност при мишки с дефицит на калпаин 3, на които е приложено системно инжектиране на AAV вектор, експресиращ калпаин 3. Това проучване на Roudaut et al. показва, че сърдечната токсичност от CAPN3 трансгенната експресия може да бъде успешно потисната. Освен това, неговата експресия в скелетните мускули е достатъчна, за да възстанови миопатологичните признаци на дефицит на калпаин-3.

- Инсулиноподобен растежен фактор-1 (IGF-1), който медира много от действията на хормона на растежа, е доказано, че подобрява мускулната функция и предотвратява мускулна дегенерация при модели с дистрофични мишки. През 2017 г. Phram et al. съобщават за своя опит с използване на ежедневни ниски дози инжекции с рекомбинантен човешки растежен хормон (соматропин) за стабилизиране или подобряване на мускулната сила и способността за ходене при пациент с АД калпаинопатия.

Гамасаркогликанопатия:

- Herson и колеги през 2012 г. съобщават за едно от първите клинични изпитвания за генна терапия в ПКМД 2 С с тяхното проучване фаза 1, включващо 9 неамбулаторни пациента с del525T хомозиготна мутация на γ -саркогликан ген и без γ -саркогликан имунооцветяване върху мускулна биопсия. Три увеличаващи се дози от AAV-1 вектор, експресиращ човешкия γ -саркогликанов ген под контрола на промотора на десмин, са използвани за 3 равни групи пациенти, получаващи интрамускулни инжекции в m. ext.carpī radialis. Не са настъпили сериозни неблагоприятни ефекти по време на 6-месечно проследяване. Всичките девет пациенти са станали AAV-1 серопозитивни и един е развил цитотоксичен отговор към AAV-1 капсида. Имунохистохимичният анализ на инжектирани проби от мускулна биопсия, извършен 30 дни по-късно, показва експресия на γ -саркогликан и при тримата пациенти, които са получили най-високата доза, докато rtPCR открива γ -саркогликанова информационна РНК. Те заключават, че експресията на γ -саркогликанов протеин може да бъде индуцирана при пациенти с ПКМД 2С чрез адено-асоцииран вирусен трансфер на ген от серотип 1, без сериозни неблагоприятни ефекти.

- Друга изследвана стратегия е използването на инструменти за exon skipping, подобни на тези, разработени за пациенти с ДМД. Антисенс олигонуклеотидите са проектирани да заобикалят преждевременните стоп кодони, насочени към нивото на пре-mRNA, позволявайки един или повече екзони да бъдат пропуснати, за да се възстанови нарушената рамка на четене, като по този начин се произвежда необходимият, макар и не скъсен протеин. Проучва се потенциалната роля на exon skipping, при саркогликанопатията, но първо трябва да се демонстрира доказателство, че скъсения саркогликан може да бъде функционален.

Алфасаркогликанопатия

- ПКМД 2D е най-честата форма на саркогликанопатия и една от най-широко проучените в клинични изпитвания. Доказано е, че интрамускулното инжектиране на rAAV1 възстановява мускулната хистология до нормална и мускулната сила се повишава до нива, надвишаващи контролните нокаут мишки, но не в същата степен като мишките от див тип. Използвайки подход на генна терапия, подобен на трансфера на AAV-мини-дистрофин за DMD, групата на Mendell работи върху генния трансфер в ПКМД 2D с цел постигане на дълготрайна генна експресия на α -саркогликан при пациенти.

- Малки молекули също могат да бъдат синтезирани за таргетно възстановяване на пътя на разграждане. По-голямата част от безсмислените мутациите в гена SGCA засягат нагъването и трафика на α -саркогликанов протеин. Този дефектен полипептид се разпознава като такъв от ендоплазмения ретикулум-QC, и се доставя за разграждане. Това нарушава мембранния комплекс и намалява стабилността на сарколемата по време на мускулна контракция. За да се насочи възстановяването на този път, могат да се използват малки молекули за улесняване на процеса на сгъване, за да се спаси протеинът и да се намали изхвърлянето на дефектен протеин. CFTR коректори (коректори на трансмембрания регулатор на кистозна фиброза) са разработени заради тяхната способност да коригират дефектно сгъване и трафик на мутанти тип II на хлоридния канал.

- Turan и колектив разработват начини за редактиране на гени с използване на индуцирани от пациента плурипотентни стволови клетки (iPSC), за коригиране на най-често срещаната мутация на α -саркогликан, missense c.229C>T; p.R77C.

Бетасаркогликанопатия

-Poszgai и колектив през 2017 публикуват резултатите от генната терапия върху SGCB нокаут миши модел на ПКМД2Е, проявяващ се с прогресивна мускулна слабост, дихателна недостатъчност и кардиомиопатия. Проучването изследва системния SGCB генен трансфер за лечение на скелетни и сърдечни мускулни дефицити, използвайки scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB (самодопълващ се AAVrh74 вектор, съдържащ кодон-оптимизиран човешки SGCB трансген, управляван от мускулно-специфичен промотор).

Алфадистрогликанопатии/ ПКМД2I FKRP

-През 2014 г. Qiao и колектив публикуват резултатите от проучване за генна заместителна терапия в ПКМД 2I. Те генерират и характеризират нов модел на мишки с късно начало и лека дистрофична мускулна патология, която много прилича на класическия фенотип с късно начало на пациенти с ПКМД 2I, както в скелетните, така и в сърдечните мускули. Тези хомозиготни нокаутни мишки (L276IKI) носят обичайната човешка мутация (L276I). Тяхната група тества системно доставяне на човешки FKRP ген чрез AAV9 вектор в L276IKI мишки, неонатално или на 9-месечна възраст. Те откриват, че свръхекспресията на FKRP, както в скелетните, така и в сърдечните мускули ефективно възстановява биохимичния дефицит и нормализира гликозилирането на α -ДГ, без забележима токсичност. Когато мишките са третирани в неонаталния период, развитието на дистрофична патология е предотвратено и е подобро при лечение в зряла възраст. Те отбелязват, че свръхекспресията на FKRP води до възстановяване на контрактилната функция на скелетните, както и на сърдечните мускули. Това е първият доклад, че системният трансфер на FKRP ген може да постигне експресия на FKRP ген в цялото тяло и напълно да възстанови гликозилирането на α -ДГ в миши модел ПКМД 2I.

-FKRP генът кодира гликозилтрансфераза. Негови мутации са свързани с аномално гликозилиране на α -дистрогликан, вторична редукция на рибитол-5-фосфат и намалена експресия на O-маноза-фосфат-свързани гликани, необходими за свързване на извънклетъчния матричен протеин. Фратини и колектив през 2017 предполагат, че FKRP може да циркулира като извънклетъчна гликозил-трансфераза и може да е в състояние да модифицира дисталните гликанови структури. За да демонстрират осъществимостта на трансдукция както на дистрофични кръвни CD133+ клетки, изолирани от MDC1C пациент с FKRP генни изменения, така и на сателитни клетки,

получени от FKRP L276IKI миши модел, те използват лентивирусен вектор, експресиращ дивия тип човешки FKRP ген. Те демонстрират, че трансдуцираните от FKRP клетки са били подтикнати да освобождават екзосоми, носещи FKRP. Това циркулира свободно и разпределението му определя възстановяването в мускулните тъкани. Има цялостно възстановяване на α -DG гликозилирането и подобрена мускулна сила, което предполага системно снабдяване с FKRP протеин, действащ като гликозилтрансфераза.

В исторически план ПКМД са се считали за нелечими невромускулни заболявания с тежка прогноза. Молекулярно- базирани подходи, използващи генен трансфер за заместване или осигуряване на сурогатни гени, малки молекули за прескачане на екзони и потискане на мутации, а напоследък редактиране на гени - всички те изглеждат много обещаващ напредък в науката и лечението на ПКМД. Тези нови терапевтични подходи предлагат потенциал за значително подобрение на заболяемостта, смъртността на пациентите и може би излекуване.

1.9. Изводи от литературния обзор:

Прогресивните мускулни дистрофии тип пояс- крайник са клинично и генетично хетерогенна група от заболявания на скелетната мускулатура, ангажиращи първоначално или предимно проксималната мускулатура на горни и долни крайници, унаследяващи се по автозомно- доминантен или автозомно- рецесивен начин. До момента са известни над 30 форми, които се характеризират с определена възраст на начало, клиничен ход, ангажиране и на други органи и системи и специфични особености от магнитно-резонансната томография на мускули. Честотата и разпределението на различните форми варира, като има описани форми с по-голяма честота в определени области или общности. Това най- често се дължи на мутации с ефект на родоначалника, които са поддържани в затворени общности, изолирани поради териториални, религиозни, етнически или културни причини. Обогащването на информацията за естествения ход на заболяването, фенотипа и генотипа на формите на ПКМД и тяхното разпространение, изработване на насоки за стандартни грижи, актуални регистри на пациенти дават основа за разработване на нови

терапевтични подходи, които имат потенциал за значително намаляване на заболяемостта, смъртността на пациентите и за потенциални бъдещи лечения.

В България не е провеждано проучване и систематизиране на всички установени форми на ПКМД, не е характеризирани фенотипът и генотипът на българските пациенти и не са съпоставени данните на тези пациенти с описанията в литературата до сега.

2. Цел и задачи

2.1. Цели на проучването:

1. Да се изяснят генетичните дефекти на всички пациенти с различни форми на ПКМД в България и корелиращите с тях клинични прояви и МРТ мускулни модели.
2. Да се съберат епидемиологични данни за пациентите с ПКМД.

2.2. Задачи на проучването:

За постигането на гореописаните цели са поставени следните задачи:

1. Събиране на кохорта от пациенти със следните клинични характеристики:
 - проксимална мускулна слабост, ангажираща долни и/или горни крайници, които отговарят на посочените в определението за ПКМД.
2. Извършване на генеалогичен анализ на семействата на тези пациенти.
3. Потвърждаване на диагнозата с необходимия ДНК анализ за определяне на генотипа на всички пациенти.
4. Провеждане на подробно клинично изследване на пациентите за прецизно определяне на фенотипа им и сравняване с характерния за заболяването фенотип.
5. Провеждане при възможност на невроизобразяващи изследвания на мускули при пациентите и сравняване на резултатите с описания в литературата модел на мускулно засягане при съответната форма на заболяването.
6. Проучване на епидемиологията на формите на заболяването с установени по-голям брой пациенти.

7. Информирание на пациентите относно стандартите на грижи и необходимостта и важноста от проследяване на сърдечната и дихателната функция.
8. Насочване на пациентите и техните семейства за провеждане на генетично консултиране и информирание за възможността за генетична профилактика в семейството.
9. Включване на пациентите в регистри, за да имат възможността да бъдат включени в бъдещи варианти за етиологично или патогенетично лечение.

3. Клиничен контингент и методи на изследване

3.1. Контингент

Контингентът от пациенти е събран чрез проведени теренни проучвания в цялата страна и диагностицирани пациенти в Експертния център по наследствени нервни и метаболитни заболявания към УМБАЛ „Александровска“.

В дисертационния труд са включени 130 генетично верифицирани пациенти, които имат следните форми на ПКМД:

- 73 пациенти с гама-саркогликанопия.
- 34 пациенти, като 32 са с AP форма, а двама представители са семейство баща и дъщеря, носители на мутация, отговорна за АД калпаинопатия;
- 19 пациенти с телетонинопатия
- 3 пациенти с POGlut1 свързана ПКМД 2Z/R21
- 1 пациент с аноктаминопатия.

7 от пациентите са диагностицирани чрез екзомно секвениране в The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, в Университета на Нюкасъл, Великобритания по международен научен проект Myo-Seq. Останалите 123 пациенти са диагностицирани в Центъра по молекулярна медицина на МУ-София, Националната генетична лаборатория на УСБАЛАГ „Майчин дом“ и в Медикодиагностичната лаборатория „Геника“.

3.2. Методи на изследване

При всички пациенти са проведени следните изследвания за тяхното клинично фенотипизиране:

- 1 Пълна анамнеза, включително фамилна;
- 2 Неврологично изследване;
- 3 Физиотерапевтична оценка- Физиотерапевтичната оценка като част от неврологичния преглед е проведена с цел да се установи обективно мускулната слабост по мускулни групи посредством скала MRC (Medical research council) (виж Приложение 1);
- 4 Биохимични- креатинфосфокиназа (КФК);
- 5 Електрофизиологично изследване- ЕМГ, ЕНГ; провеждани са в Клиниката по нервни болести в УМБАЛ „Александровска“ и на теренни проучвания с преносим електромиограф Dantec– Keypoint (Natus, Copenhagen, Denmark);
- 6 Изследване на дихателната функция с функционално изследване на дишането (ФИД);
- 7 Изследване на сърдечната функция с електрокардиограма (ЕКГ) и ехокардиография (ЕхоКГ);
- 8 Генетично изследване:

Предвид хетерогенната група на формите ПКМД, генетичните изследвания пациенти, генетичните изследвания са извършени с различна методология.

Генетичните изследвания на тези пациенти са извършени в Национална генетична лаборатория на УСБАЛАГ „Майчин дом“, Центъра по молекулярна мезицина на МУ-София, Медико-диагностична лаборатория „Геника“-София, MYO SEQ project - Newcastle Medical Research Council (MRC) Centre Biobank for Neuromuscular Diseases - Myo-Seq project.

-Генетичното изследване чрез секвениране на ген (*CAPN3*, *TCAP*) включва следните етапи:

Изолиране на високомолекуларна ДНК от венозна кръв - осъществява се посредством стандартна процедура с изсолване, което гарантира получаването на високомолекуларна ДНК, годна за съхранение в ДНК банка. По този начин се осигурява материал за бъдещи научни разработки.

Аналитична обработка на материала - дизайн на праймери за размножаване с полимеразна верижна реакция на всичките екзони и екзон-интронните граници на таргетните гени и оптимизиране на условията за провеждане на полимеразната верижна реакция за всеки един от фрагментите;

Оценката на качеството на получения PCR продукт се извършва чрез разделяне на пробите в 2-3% агарозен гел чрез хоризонтална подводна агарозна гел-електрофореза в присъствието на молекулен маркер, спрямо който се отчита дължината на размножения фрагмент.

Директно секвениране по Sanger на размножените фрагменти за търсене на молекулни дефекти в таргетните гени;

Процедура:

- Намножаване на желания ДНК фрагмент чрез PCR:

Извършва се при установените оптимални условия за съответния участък.

- Пречистване на размножения продукт:

Пречистването на амплификационния продукт премахва останалите в пробата дезоксинуклеотидтрифосфати и праймери, които биха повлияли върху по-нататъшните реакции. Използва се ензимно пречистване на продукта с екзонуклеаза и алкална фосфатаза I.

- Провеждане на секвенционна реакция:

За секвенционната реакция се използва кит за секвениране BigDye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, CA, USA), включващ Thermo Sequenase II ДНК-полимераза и флуоресцентно белязани нуклеотиди.

- Преутаяване на секвенционния продукт:

Секвенционните продукти се преутаяват чрез преципитация с етанол с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Сухата утайка може да се съхранява на тъмно на стайна температура за няколко дни.

- Разтваряне на секвенционния продукт:

Секвенционният продукт се разтваря в Hi-Di формаид. Така приготвената проба е готова за анализ и се подава на апарата за електрофоретично разделяне. Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извършва на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Sequence Genetic Analyzer.

- Визуализиране и отчитане на пробите:

Секвенционните данни се обработват автоматично от програмата ABI3130 Data Collection Software и се получават в готов вид под формата на електрофореграма в програма за секвенционен анализ Sequencing Analysis v.5.1.1.

-Пациентите с установена АД калпаинопатия са установени с директно секвениране на *CAPN3* гена, в последствие потвърдено с Next generation sequencing.

-17 пациенти с телетонинопатия. От всеки пациент са взети 10 ml. периферна кръв в K2EDTA епруветки. Процедурата на изсоляване е използвана за екстракция на ДНК от получените проби, концентрацията на ДНК е оценена на спектрофотометър nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc). За PCR амплификация са използвани два комплекта праймери за екзон 1 (FORWARD праймер 5'-CCCCATTAGTGAGTCTTGGC- 3', REVERSE праймер 5'-GCTCAGTGAGGGTGCTCTG- 3') и екзон 2 (FORWARD праймер 5'-AGAGAGCAACAGCTCCCAGG- 3', REVERSE праймер 5'-CACAGTCCTAGCCAGGAAGG-3') на *TCAP* ген. Тези праймери генерират ампликони съответно от 294 и 506 bp. Всички проби бяха амплифицирани на Applied Biosystems™ Veriti™ Thermal Cycler, (Thermo Fisher Scientific Inc). Секвенирането на PCR продукти се извършва с помощта на BigDye terminator v3.1 на ABI PRISM 3130xl генетичен анализатор.

- Двама пациенти от нашата кохорта са изследвани с директно секвениране на екзон 1 на *TCAP* гена.

- MYO-SEQ project – Международно изследователско сътрудничество, което прилага целенасочено секвениране на целия екзом (WES) на най-голямата събирана кохорта от пациенти (1000) с недиагностицирана проксимална мускулна слабост. ДНК пробите бяха изпращани в Newcastle Medical Research Council (MRC) Centre Biobank for Neuromuscular Diseases. Таргетно пълно екзомно секвениране (WES) е извършено в Broad Institute с помощта на Illumina exome capture и 38 Mb таргетни примамки с

>250 ng ДНК. Наборът от потенциални варианти е качен в xBrowse и е извършен анализ на 169 кандидат- гени за пояс-крайник тип мускулна слабост. Използваната технология е HiSeq X Ten, Illumina Genome Analyzer IIx, Illumina HiSeq 2000. По този проект от нашата кохорта са доказани 1 пациент с аноктаминопатия, 2 пациенти с *CAPN3*, 1 пациент с телетонинопатия и 3ма пациенти с *POGLUT1* асоциирана ПКМД 2Z/R 21.

-Саркогликанопатия:

Пациентите от тази група са изследвани в Национална генетична лаборатория, УСБАЛАГ „Майчин дом“, МУ- София, Катедрата по биохимия и молекулярна генетика, Салпетриера, Париж; Центъра по генетика на човека, Едит Коуън Университета, Пърт, Генетична медико-диагностична лаборатория Геника.

Предвид генетичната хомогенност на пациентите с гама-саркогликанопатия, повечето от тях са изследвани с директно изследване на C283Y мутация:

-извършва се директна амплификация на екзон 8 на *g-SG* гена върху сухи кръвни петна от карти на Guthrie, последвана от анализ на полиморфизъм на едноверижна конформация (SSCP). Наличието на мутацията е потвърдено чрез RsaI рестрикционно смилане. Проби с различен SSCP модел на миграция са секвенирани с ABI PRISM 310 генетичен анализатор.

9. Образна диагностика

- На двама пациенти с телетонинопатия е оценен моделът на мускулно засягане на долните крайници с образно- диагностично изследване. Мускулите на долните крайници на 1 пациент са изследвани с 3 Tesla MPT апарат (Siemens Verio). Протоколът за изследване включва неусилени T1 и PD Fat Sat секвенции са приложени на мускулите на тазовия пояс, бедрата и подбедриците. Дебелината на среза е 10 мм, а разстоянието между срезове е 13 мм. За оценка за фибро-мастното заместване на мускулна тъкан на T1 изображенията е приложен Mercuri score. (Приложение 2) Тази скала има четири степени на нарастващ интензитет на сигнала, който корелира с дистрофичните мускулни промени. За наличието на миоедем са оценени изображения с Fat Sat. протонна плътност. Компютърна томография (СТ) на мускулите на долните крайници при 1 пациент е извършена на Aquilion 64 (Toshiba- 64 слайда).

- На 12 пациенти с гамасаркогликанопатия са осъществени КТ или МРТ на мускули по време на клинично-генетично и епидемиологично проучване на ПКМД гамасаркогликанопатия с С283У мутация сред ромите в България;

- На 3 пациенти с калпаинопатия е проведено МРТ изследване на долни крайници по изследователски проект ГРАНТ с вх. № 4874/09.07.2018 г. на тема: „Клинично-генетичен спектър на прогресивни мускулни дистрофии тип пояс-крайник в България“ в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Използван е апарат Магнитен резонанс „GE Signa HDxt“ 1,5 Т напрегнатост на полето;

- Пациентите с *POGLUT 1* асоциирана ПКМД 2Z/R 21 са изследвани 3 Tesla МРТ — (Siemens Verio) с използвани T1 и PD Fat Sat секвенции и дебелината на среза е 10 мм.

10. Статистически методи

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Генотип-фенотип корелации и епидемиологични данни при групите с ПКМД

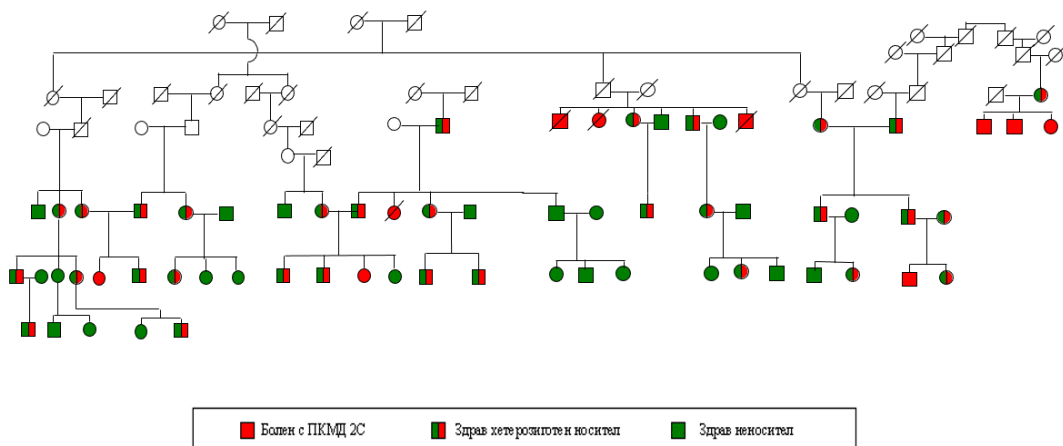
4.1.1. Гамасаркогликанопатия

4.1.1.1. Генетични находки и клинична картина при пациентите с установена гамасаркогликанопатия.

Клиничният контингент включва 73 пациенти с гама- саркогликанопатия. По време на теренни проучвания са идентифицирали 40 пациенти (21 мъже и 19 жени). Събрани са и катамнестични данни за 17 починали болни от гама- саркогликанопатия. Данни за останалите 16 пациенти (8 мъже и 8 жени) са събрани от преглед на медицинска документация на УМБАЛ „Александровска“ и МБАЛББ „Св. София“.

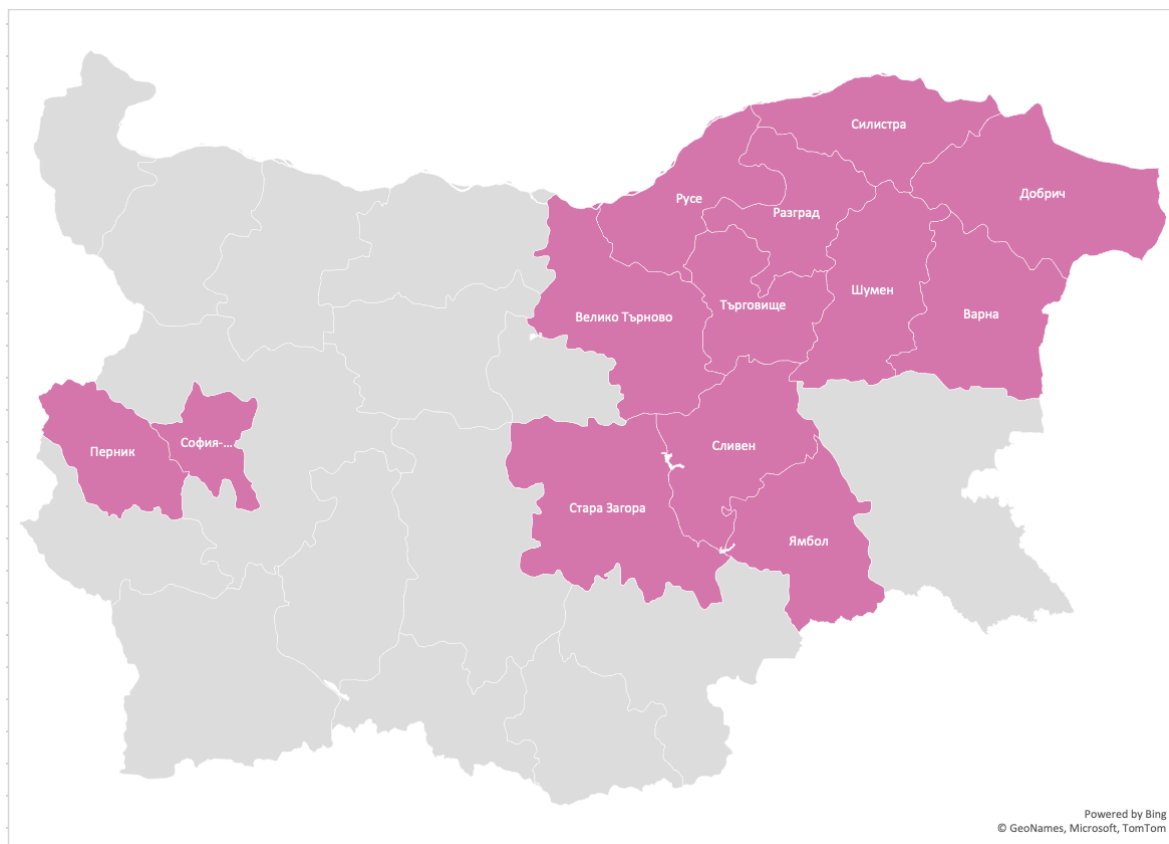
По време на теренни проучвания са идентифицирани 35 родословия със заболяването. Всички пациенти принадлежат към групата на уседналите роми

мюсюлмани - милет. Няма идентифицирани случаи на ПКМД 2С в други ромски групи (Фигура 7).



Фигура 7. Родословие с ПКМД 2С, с. Априлово, с. Голямо Ново, с. Еленово, Търговищка област, с. Синя вода и с. Раковски, Разградски регион.

Заболяването е идентифицирано в 13 области- 11 в Източна България: Търговищка, Разградска, Русенска, Силистренска, Добричка, Великотърновска (най-източната част), Сливенска и Ямболска, Старозагорска, Варненска, Шуменска и 2 в Западна България- София и Перник. В Търговищка област случаи със заболяването са открити в гр. Омуртаг, селата Илийно, Кардам, Голямо Ново, Априлово, Лиляк, Драгановец и Еленово; в Разградска област- в гр. Кубрат, гр. Завет, гр. Исперих, с.Раковски, с.Острово и Синя вода.; в Русенска област – в гр. Сеново; в Силистренска област – в с. Зарник, община Кайнарджа; в Добричка област – в с.Пчеларово и гр. Каварна, във Великотърновска област - в с. Майско, община Елена; в Сливенска област– в гр. Сливен, с. Тополчане и с. Горно Александрово; в Ямболска област– в гр. Ямбол и с. Лозенец, община Стралджа, в Старозагорска и Варненска, Софийска в самите градове (Фигура 8).



Фигура 8. Разпространение на ПКМД 2С сред ромите в България по области.

Заболяването в тази група пациенти започва обикновено с поява на оплаквания от промяна в походката, чести падания, ходене на пръсти, затруднения при изкачване на стълби, тичане и изправяне от клекнало положение. Средната възраст на пациентите по време на изследването е 21.9 ± 7.8 (за жените - 22.9 ± 8.7 ; за мъжете – 20.9 ± 7.0). Възрастта на началото на заболяването варира между 2 и 13 години. Средната възраст на началото е 6.7 ± 2.5 г. (за жените тя е 7.8 ± 2.5 , а за мъжете – 5.7 ± 2.0). Средната възраст на инвалидизация е $13.6 \text{ г.} \pm 3.2$. За жените тя е 14.9 ± 3.7 , а за мъжете – 12.4 ± 2.1 . Средната продължителност на ходене след дебюта на заболяването е 6.9 ± 3.1 (за жените тя е 7.1 ± 3.8 , а за мъжете – 6.7 ± 2.3). Средната възраст на настъпване на смъртта е 28.13 ± 3.5 (за жените 32.6 ± 3.1 , а за мъжете 25.9 ± 3.8) Първоначално се установява мускулна слабост в тазовия пояс, а по-късно и в раменния с поява на криловидни лопатки (фигура 9).



Фигура 9. Пациент с ПКМД 2С на 13г., с. Майско, общ. Елена.

На по-късен етап се засяга паравертебралната мускулатура, проявяваща се с лумбална хиперлордоза. Контрактури на глезенните стави се откриват след 8-годишна възраст. В по-напредналите стадии мускулната слабост става дифузна, въпреки че най-тежко са засегнати тазовия и раменния пояс, и особено *mm. glutei, psoas, sacrospinalis, periscapularis* и *trapezius*. В проксималната мускулатура на крайниците е налице ранно селективно засягане на флексорите (*m.biceps brachii* и *m.flexor femoris*) с относително добро съхранение на екстензорите (*m.triceps brachii* и *m.quadriceps*). Дисталната мускулна сила е запазена дори и при най-възрастните пациенти. При нито един пациент не се установява лицева и булбарна мускулна слабост. Псевдохипертрофия на подбедриците, криловидни лопатки и лумбална хиперлордоза се наблюдават при повечето пациенти на по-ранните стадии. Макроглия се установява при 21 от 56 пациенти (при 8/27 жени и при 13/29 мъже). Прогресираща сколиоза със значителна ригидност в шията се открива при 18 пациенти, като всички те са инвалидизирани. Сколиоза се установява при 10 мъже и 8 жени. Контрактури – при 17/29 мъже и при 15/27 жени.

Средната стойност на креатинфосфокиназата е 20 пъти по-висока от нормалната при всички пациенти.

Интелектуалните функции са запазени при всички пациенти. Сърдечните функции са изследвани при 20 пациенти на възраст от 10 до 40 години и при един пациент е описано сърдечно засягане с дилатативна кардиомиопатия и изразена систолна дисфункция, налагаща медикаментозна терапия.

При 6 пациенти се наблюдава смущение в дихателната функция, като при 4 е установено леко рестриктивен тип дихателно нарушение. При двама е установена тежка дихателна недостатъчност, при единия от които се е наложило лечение с инвазивна белодробна вентилация от 35 г.в.

Електромиографското изследване на пациентите показват типични смесени миогенни и неврогенни промени. Спонтанна активност (фибрилации, положителни остри вълни) се установява предимно в *mm. biceps brachii*, *rectus femoris* и *tibialis anterior*. Продължителността на акционните потенциали е скъсена. При автоматичния анализ стойностите са 2.0-3.8 мсек за *m.rectus femoris*, 2.5-3.3 мсек за *m.tibialis anterior*, 2.0-3.3 мсек за *m.biceps brachii* и 4.5-8.6 мсек за *triceps brachii*. Амплитудите на акционните потенциали са в областта на долна граница на нормата при автоматичния анализ. За *m.rectus femoris* и *m.triceps brachii* амплитудите са $< 0.9\text{mV} / 0.7-0.9/$, за *m.tibialis anterior* $< 0.7\text{mV} / 0.3-0.7/$ и за *m.biceps brachii* $< 0.4\text{mV} / 0.2-0.4/$. Скоростта на провеждане по двигателните и сетивните влакна са в границите на нормата.

КТ и МРТ на мускули на долни крайници са осъществени при 12 пациенти. Степента на мускулното засягане корелира с възрастта и етапа на заболяването при съответните пациенти. Наблюдава се симетрично засягане на поясната мускулатура, като промените прогресират дистално- по-дисталните мускулни групи се запазват по-дълго в хода на заболяването. *Mm. glutei (medius и minimus)* са минимално засегнати при двамата по-млади пациенти, които могат самостоятелно да изкачват стълби; умерено засегнати при 10 до 12 годишни пациенти, които ходят все още самостоятелно; тежко засегнати са при пациентите, които са неспособни да ходят; напълно заместени с мастна тъкан при най-възрастните и най-тежко инвалидизираните пациенти. *M. subscapularis* и *m. trapezius* са минимално засегнати при по-младите пациенти, при които *m. deltoideus* е съхранен. Тежко засегнати на възраст между 12 и 14 години, когато *m. deltoideus* е минимално до умерено засегнат;

и напълно атрофични при най-възрастните пациенти, при които се откриват следи от *m. deltoideus*. Селективно засегнати мускули при всички изследвани пациенти са *mm. glutei*, *mm. adductori*, *flexor femoris*, *abdominalis*, *spinalis*, *supraspinatus*, *infraspinatus*, *subscapularis* и *soleus*. В по-ранните стадии се открива относително по-тежко засягане на флексорните, отколкото на екстензорните мускулни групи в четирите крайника. В стадия на пълна инвалидизация повечето мускули са атрофични или напълно заместени от мастна тъкан, докато *mm. deltoideus*, *quadriceps*, *sartorius*, *gracilis* и *gastrocnemius* са относително съхранени.

Установени са значителни интер- и интра-фамилни вариации в протичането на заболяването. В три семейства с пациенти от двата пола, болестта протича значително по-леко и по-забавено при жените, отколкото при мъжете. В четвърто семейство (1Ж + 2М) ПКМД 2С е с по-тежко протичане при единия брат и при сестрата, отколкото при другия брат. В две семейства, в които пациентите са само жени (2Ж; 2Ж), също се установяват фенотипни вариации. В едното семейство болестта е с еднакъв дебют при двете сестри, но е с по-ранна инвалидизация при по-голямата сестра, в другото семейство – протича по-тежко (с по-ранен дебют и с по-ранна инвалидизация) при по-малката сестра. В други две семейства, в които пациентите са само мъже (4М; 2М) фенотипните вариации са значително по-малко изразени.

Установени са статистически значими полови различия в протичането на ПКМД 2С. Заболяването започва по-късно при жените, отколкото при мъжете, мъжете спират да ходят по-рано, отколкото жените. Продължителността на живота при жените е по-голяма. Налице е статистически значима корелация между възрастта на началото и възрастта на инвалидизацията. Колкото по-рано започва заболяването, толкова по-ранна е и инвалидизацията, респективно по-малка е продължителността на ходене.

При 7 пациенти е изследвана е имунохистохимичната характеристика на саркогликановите и дистрогликановите компоненти при седем пациенти с ПКМД 2С. При всички изследвани пациенти се установяват сходни промени: постоянна липса на α -дистрогликан и добре запазен β -дистрогликан. Чрез използване на различни домен-специфични антитела срещу α -саркогликана се откри относително запазване

на неговия интрамембранен домен и липса на С- и N-терминалните му части. Бета-саркогликанът е тежко редуциран или липсва. Напълно липсва и γ -саркогликанът при всички пациенти. Делта-саркогликанът е относително най-добре запазен и се експресира в значително по-голяма степен при ПКМД 2С, отколкото при ПМД тип Дюшен.

Обсъждане:

ПКМД 2С е най-честата миопатия сред ромите в България, въпреки че има регионално разпространение в източна част на страната. Всички пациенти принадлежат към групата на уседналите роми мюсюлмани - милет. Няма идентифицирани случаи на ПКМД 2С в други ромски групи. Проучването на засегнатите семейства включва генетично хомогенна група от хомогенната група от 73 пациенти с ПКМД 2С, всички хомозиготни за мутацията С283У. Заболяването е идентифицирано само в 11 региона на Източна България. Клиничните наблюдения при пациентите с ПКМД 2С подкрепят констатациите на съвместното европейско проучване [Merlini L и съавт. 2000, Merlini L и съавт., L 2001] по отношение на естествения ход на заболяването, скоростта на прогресиране на увреждането, модела на мускулно засягане и липсата на когнитивно увреждане. Рестриктивният тип дихателна недостатъчност е често срещана находка [Politano L и съавт., 2001, Calvo F и съавт., 2000, Melacini P и съавт., 1999, Voito C и съавт., 2003], като в българската популация е установен само един пациент тежка дихателна недостатъчност с необходимост от инвазивна белодробна вентилация.

Описаният Дюшеноподобен фенотип със загуба на самостоятелна походка преди навършване на 13 години се наблюдава в най-голям процент от пациентите, като останалите са разпределени в почти равно отношение към тези класифицирани със средна тежест на заболяването (загуба на походка между 13 и 16г.) и тези с по-лек фенотип- подобен на ПМД тип Бекер. Разлики са наблюдавани в някои от нашите засегнати родословия- в две семейства са представени и трите фенотипа при три засегнати деца в едно семейство и пет допълнителни семейства с прояви на два фенотипа в тях.

Важна особеност за пациентите с гама-саркогликанопатия е значителното по-тежко протичане при мъже. Въпреки че не са наблюдавани разлики свързани с пола по отношение на началната възраст на мускулното засягане, загубата на самостоятелната

походка настъпва по-рано при мъжете. По-леките фенотипове са значително по-чести сред пациентите от женски пол, с изключение на един представител, при когото е настъпила тежка дихателна недостатъчност с необходимост от ИБВ.

ПКМД 2С следва да се има предвид при пациенти и от двата пола с проксимална мускулна слабост с ранно начало, ромски произход, произхождащи от горепосочените региони в Североизточна България, с Дюшеноподобна клинична характеристика.

4.1.2. Калапаинопатия

4.1.2.1. Генетични находки и клинична картина при пациентите с установена калпаинопатия

Клиничният контингент включва 34 пациенти с генетично верифицирана калпаинопатия, принадлежащи към 29 семейства. Тридесет и двама са с ПКМД 2А/Р1, а двама са представители на семейство с АД калпаинопатия - ПКМД D4. От изследваните пациенти 24 са жени (66,5%), а 12 (33.5%) са мъже.

Използвани са данни, събирани по време на теренни проучвания и чрез документацията на Клиника по нервни болести, УМБАЛ „Александровска“. Пациентите с техните генетични и клинични характеристики са описани в Таблица 6.

Таблица 6. Клинични и генетични характеристики на пациентите с ПКМД.

Използвани съкращения: М- мъжки; Ж- женски; ТБС- тазобедрена става, РС-раменна става, АС- Ахилесови сухожилия, ЛХ- лумбална хиперлордоза.

Пациент № / Семейство	Пол	Алели	Възраст при регистрацията	Възраст на началото	Първи симптоми (трудности при)	Мануално мускулно тестване (MRC scale)			Други клинични прояви			КФК	Създаване на ФИ %	Дих. засягане	Инвалидизация
						ТБС Фл/ екс/ Абд/ Длд	Дистал на слабост	РС Фл/ екс	Крилоидни лопатки	Сколиоза/контрактури	Хиперпрофия на подбедрици				
1 ; 1	ж	c550delA ?	10	1.5	Качване на стълби, ходи на пръсти	4/5 -	не	5/5	-	-	-	-	-	-	Не
2 ; 2	Ж	p/Gly333 Asp ?	8	8	Уморяемост след натоварване, висока КФК	5/5 5/5	5/5	5/5	Не	Не	не	11000	не	-	-
3 ; 3	ж	c550delA c550delA	26	11	Изправяне, качване на стълби	3/5 3/5	-	4/5	-	Скъсени АС	да	353	не	-	Не, по ходи трудно на 26
4 / 4	ж	c550delA c550delA	58	11	-	2/5 2/5	-	3/5	-	-	-	150	-	-	Да, на 39
5 ; 5	Ж	c550delA p/ Glu323X	18	12	Качване на стълби	4/5 4/5	-	-	-	ЛХ	Да	2555	не	-	Не
6 ; 6	Ж	c550delA del12-8	21	12	Тичане, изправяне, качване на стълби	3/5 4/5	-	4+/5	да	-	да	2570	не	-	Не
7 ; 7	ж	c550delA p/Arg169Gly	29	12-13	Ходене, изправяне	3/5 3/5	-	4/5	Да	-	Не	2476, 1326	да	Не	Не
8 ; 8	Ж	pArg169Gly ?	32	15	Бърза уморяемост, изправяне	3/5 3/5	Не	4/5	Не	Не	да	2720	Не	-	Не, по ходи трудно
9 ; 9	Ж	c550delA c550delA	26	19	Изправяне, бърза уморяемост	4/5 4/5	-	4/5	-	Не	Да	3296	Не	Не	Не
10 / 10	ж	c550delA c550delA	35	17	-	3/5 3/5	-	4/5	Не	Не	Не	-	Не	Не	Да, на 30
11 / 10	ж	c550delA c550delA	29	21	През бременност, Изправяне	4/5 -	-	4/5	Не	Не	Не	2856	Не	Не	Не
12 / 11	ж	pAsp735Asn	28	25	При бременност, качване на стълби	4/5 4/5	5/5	4/5	Не	Не	Не	140	Не	Не	Не
13 / 12	ж	c550delA c550delA	-	48	-	3/5 3/5	-	3/5	-	-	-	-	-	-	Да
14 / 13	ж	c.1811_1812del TC c.1811_1812del TC	41	11	-	3/5 3/5	5/5	3/5	Да	Не	Да	116	-	-	Да, от 33 години
15 / 13	М	c.1811_1812del TC c.1811_1812del TC	51	14	-	3/5 3/5	5/5	3/5	Не	Не	Да	-	-	-	Да, на 32 години
16 ; 14	М	c550delA ?	Ек преди 20	1.5-2	Бърза уморяемост, чести падания	3/5 2/5	-	3/5	Да	Да, глезени, лакти	Да	1564	Да	Не	Да, на 10
17 / 15	М	c550delA del2-8	27	8	Тичане, изправяне	4/5 4/5	5/5	4/5	-	Да, глезени, лакти	Да	1200	-	-	Да, на 18
18 ; 16	М	c550delA c550delA	18	9-10	Тичане, качване на стълби	4/5 4/5	5/5	4/5	Да	Да, глезени	Не	3260	Не	-	Не

19:17	M	c550delA c550delA	15	11	Ходи на пръсти, качване на стълби	4/5 -	-	5/5	Не	Глезени	Да	5321	-	-	Не
20:18	M	pGlu323X pArg49His	51	13	Качване на стълби, чести падания	3/5 3/5	-	4/5	Не	Глезени, лакти	-	269	Не	-	Да, на 30
21:19	M	c.550delA /c.773G>C	11	3-4	Ходи на пръсти, болка и схващане в петите, затруднено изправяне	4+5 5/5	Не, 5/5	5/5	да	Скъсени АС	да	9824	не	не	не
22:20	Ж	1337 G>T p.Gly446Val	17	14-15	Изправяне от клекало положение, трудно качва стълби	3+5 3+5	не	4/5 4/5	да	Скъсени АС	не	3163	не	не	не
23:20	M	1337 G>T (p.Gly446Val)	16	11	Умора след натоварване, повишена КФК	2/5	не	3/5 3/5	да	Скъсени АС, торако-лумбална сколиоза.	не	3681	не	не	не
24:21	ж	c550delA c550delA	36	16	Изправяне от клекало положение, трудно качва стълби	4/5 4/5	не	4/5 4/5	да	Скъсени АС, ЛХ	не	391	не	не	Ходи с подкрепа от 34 г.в.
25:22	ж	c550delA Екзон 4 9675G/T Екзон 7	24	9	Тичане	3/5 3/5	3/5	3/5	-	Хиперлордоза, скъсени АС	не	2066	не	не	не
26:23	м	c550delA c550delA	12	27	Качване на стълби, тичане	2/5 2/5	5/5	2/5	да	ЛХ, лакти, колелна, глезени	не	777	не, ФИ 56%	не	не, от 24 г.в.

27:24	ж	c550delA c550delA	16	14	Изкачване на стълби, изправяне от клекало положение	4/5 4/5	5/5	4/5	Не	Скъсени АС, ЛХ	да, от ранна възраст	3170	не ФИ 68	не	не
28:25	ж	c550delA c550delA	12	9	Ходи на пръсти	3/5 4/5	4/5	3/5	да, Д>Л	Скъсени АС, Пес 8888	да	4092	не	не	не
29:26	м	c.550delA p.Thr184ArgfsT er36	18	11-12	Ходене на пръсти, скъсени Ах сухожилия	3/5 4/5	3/5	5-5	да	Скъсени АС	не	114	Не, ФИ 61%	не	не
30:27	ж	c.1504_1505del AT	16	11-12	Промяна в походката, трудно ставане от клекало положение	3/5 3/5	3/5	4/5	да	Скъсени АС ригиден гръбнак, колени, лакътни стави	не	1376	Не, ФИ 66%	не	не
31:27	ж	c.1504_1505del AT	14	14	асимптомна	5/5 5/5	5/5	5/5	не	не	не	1666	не	не	не
32:28	ж	c550delA Екзон 4 985G/A Екзон 7	30	27	Трудно качване на стълби/ Ходене по нагорнище	3/5 3/5	не	5/5 4/5	Да, Д>Л	ЛХ, скъсени АС	Да, Д>Л	1179, 1981 2870	Не, ФИ 66%	не	не
33:29	ж	C598_612 del хетерозигот.	26	11	Болки в подбедрици като при мускулна треска, лесна умора	1/5 0/5	3/5	2/5	Да	ЛХ, скъсени АС	Да, в по-ранна възраст	2879, 481	Не	не	не
34:29	м	C598_612 del хетерозигот.	56	-	асимптомна	5/5 5/5	5/5	5/5	не	Хипотрофия на бицепс, трицепс.	не	259	не	не	не

Средната възраст на начало на заболяването при кохортата от пациенти е 13,85 г., като се установява значителна полово обусловена разлика- при мъжете е 10,85г., а при жените- 15,15г. Първите прояви на заболяването варират, като най-чест първоначален симптом при 35,29 % (12) от пациентите е затруднение при качване на стълби, а трудно изправяне от клекало положение е описано при 35,29 % (12) от

пациентите, като признак на проксимална мускулна слабост в долните крайници. Лесна умора е наблюдавана като начало на заболяването при 17.65 % (6) от пациентите, при 20.59 % (7) има трудности при тичане или ходене, при двама има описано ходене на пръсти, двама са асимптомни при установяване на заболяването (без субективни оплаквания). При двама от изследваните пациенти дебют на заболяването е по време на бременност, при един пациент има описани болки като мускулна треска в подбедриците. Скъсени Ахилесови сухожилия и контрактури на глезенните стави са описани при 52,95% пациентите – (18), а псевдохипертрофия на подбедриците, понякога наблюдаван като ранен белег на заболяването има при 44,12% (15) от изследваните пациенти.

Асиметрични прояви- криловидни лопатки, псевдохипертрофия на подбедриците е наблюдавана при двама от пациентите, като при единия те са в комбинация.

При един от пациентите се наблюдава атипична проява на заболяването- с ригиден гръбнак и ранни контрактури, без сърдечно засягане (пациент № 30). Тя и асимптомната ѝ сестра са носители на неописана до сега мутация в *CAPN3* гена- p.Le502TrpfsTer74. При 4 от пациентите има установени нормални стойности на КФК, като двама от тях са в напреднал етап на заболяването (Пациенти №4 и №14). При останалите пациенти има значителни вариации в стойностите на КФК, вариращи от леко повишени – 250 IU при норма до 200 и 11000 IU.

Не е установено засягане на дихателната мускулатура, водещо до нарушение във вентилаторните показатели. Леко сърдечно засягане е описано при двама пациенти, за които няма допълнителна информация.

Общият брой пациенти, загубили самостоятелна походка е 10 (29,41%), като са равен брой мъже и жени. Средната възраст на инвалидизиране е 27,6 години, като се наблюдава значителна разлика за мъжете е 22.8 години, а при жените 32,4 години.

Общо 32% (12) от пациентите са хомозиготи за с.550delA, а 20.5 % (7) го носят поне на един алел (Таблица 6).

Мутацията с.550delA е нуклеотидна делеция и вероятно е стара мутация с ефект на родоначалника с много високо разпространение- около 75% в Югоизточна Европа. [Sanki-Klain N и съавт., 2004, Fanin M и съавт., 2015]. Резултатите от проучването потвърждават високото разпространение на тази мутация при пациенти

с ПКМД 2А от България. Мутациите на втория алел при тези пациенти е съответно при двама p.Glu323X, двама с del12-8, един пациент с 985G/A и един с с.773G>C.

При двамата пациенти, двойни хетерозиготи на делециите с.550delA/del2-8 (№ 9 и 10), тежестта на заболяването и прогресията се различават, тъй като мъжът не може да ходи на 18-годишна възраст, докато жената е все още подвижна на 21 годишна възраст. Вътрешнофамилна вариабилност във възрастта на инвалидизиране и във възрастта на начало също е налице при фамилните случаи.

Малките делеции, голямата делеция на екзони 2–8 и безсмислената мутация p.Glu323X, всички водещи до намален протеин, представляват голям процент от установените мутации.

При пациентите от проучването се срещат и други мутации в хетерозиготно състояние, при които не е установен втори мутантен алел. Те са следните p.Gly333 Asp, pArg169Gly, pAsp735Asn, Thr184ArgfsTer36. Един от пациентите е с установено двойно хетерозиготно носителство на pGlu323X и pArg49His (Пациент №20).

Пациентите с открита само една мутация, след пълно секвениране на гена *CAPN3* и извършен скрининг за големи делеции на ниво РНК [Todorova A и съавт., 2007] показват изключително вариабилна клинична изява на заболяването, което противоречи на хипотетичния лек фенотип, свързан с единичен генен дефект. [Piluso G и съавт., 2005]. Установените резултати са повече в съответствие с данните на Saenz и съавт. от 2005г, показващи голяма вариабилност в началото и тежестта на заболяването в случаите с единична *CAPN3* мутация. От друга страна, мутацията p.Asp753Asn се открива в три независими проучвания като единична мутация при пациенти с ПКМД 2А и всички те се характеризират с по-късно начало и лека проява на заболяването .[Fanin M и съавт., 2005, Saenz и съавт., 2005].

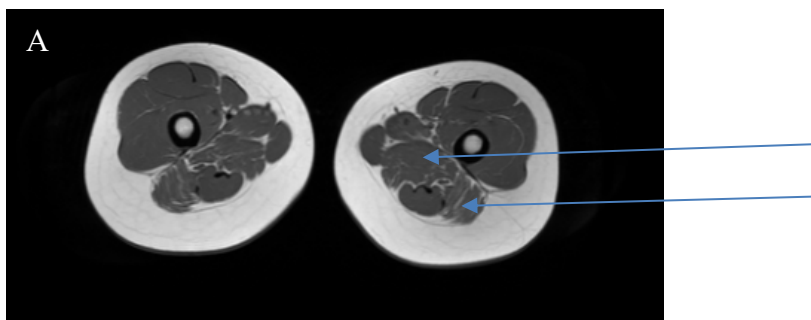
Останалите пациенти са фамилни случаи с по двама представители носители на мутации в хомозиготно състояние (с.1811_1812delTC , с.1504_1505delAT, 1337 G>T p.Gly446Val, съответно семейства № 13, 20 и 27) с фамилна анамнеза, съответстваща на АР тип на унаследяване, както и двама са баща и дъщеря (семејство № 29), хетерозиготни носители на C598_612 del, асоциирана с АД калпаинопатия.

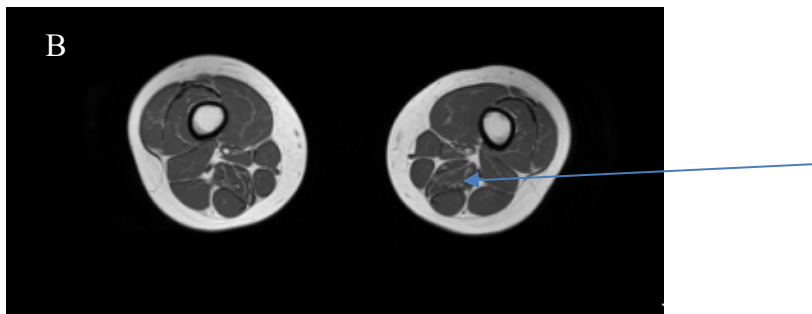
Находки от проведената образна диагностика

В кохортата пациенти в проучването с калпаинопатия на бма е проведено МРТ изследване на мускули. Резултатите на пациенти №, 30, 31 и 33 ще бъдат представени по-долу в графа Клинични случаи (виж т. 6.1.2.3)

МРТ изследване на мускули на долни крайници и тазов пояс е осъществено на пациент №21, с установено двойно хетерозиготно носителство на с.550delA и с.773G>C; pArg258Thr, а майката е хетерозиготен носител на с.773G>C; pArg258Thr, без клинични прояви. Последната (с.773G>C; pArg258Thr) е непубликувана до момента и според критериите за патогенност е с неясно клинично значение. Три от критериите подкрепят патогенната природа на открития вариант, така че е по-добре да се определи като вероятно патогенен. Анамнестичните данни представят ранно начало - от ранна детска възраст родителите са забелязали че предпочита да ходи на пръсти. На 10 г.в. се появили болка и схващания в областта на петите, променила се походката. Има затруднения да се изправи напълно, започнал да ходи по-приведен. Без данни за фамиленост. От клиничния преглед с данни за лек миопатен синдром с лека проксимална мускулна слабост в долни крайници и аксиална мускулна слабост, леко затруднено изправяне от легнало положение, лумбална хиперлордоза, набелязани криловидни лопатки, псевдохипертрофия на подбедриците контрактури на ахилесовите сухожилия. Изследваната КФК е над 10 пъти над нормата – от 2100 до 9824. ЕМГ демонстрира миогенна увреда, сърдечната и дихателната функции са запазени.

МРТ на долни крайници: Изследваният пациент е с начални промени на МРТ изследването, които корелират и с леко изразената мускулна слабост.



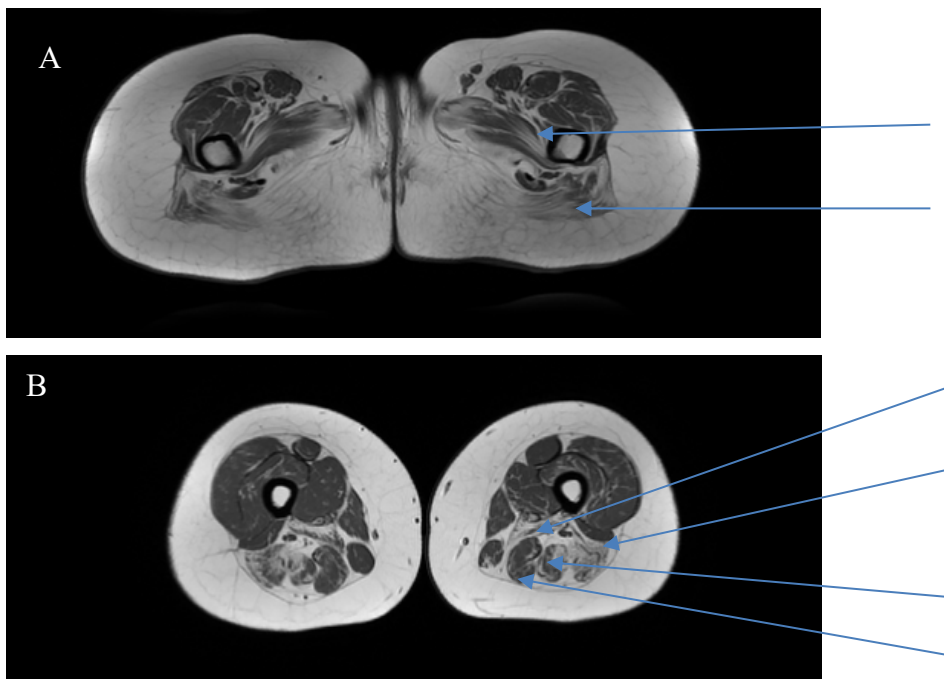


Фигура 10. МРТ на бедрена мускулатура- проксимална и дистална част.

Наблюдават се дискретни промени със заместване на мускулната тъкан с мастна инфилтрация за проксималната част на бедрото на част от м. m. gluteus maximus, m. adductor magnus, m. biceps femoris (фигура 10А). В по-дисталната част на бедрото прави впечатление мастна атрофия единствено на m. semimembranosus (фигура 10В).

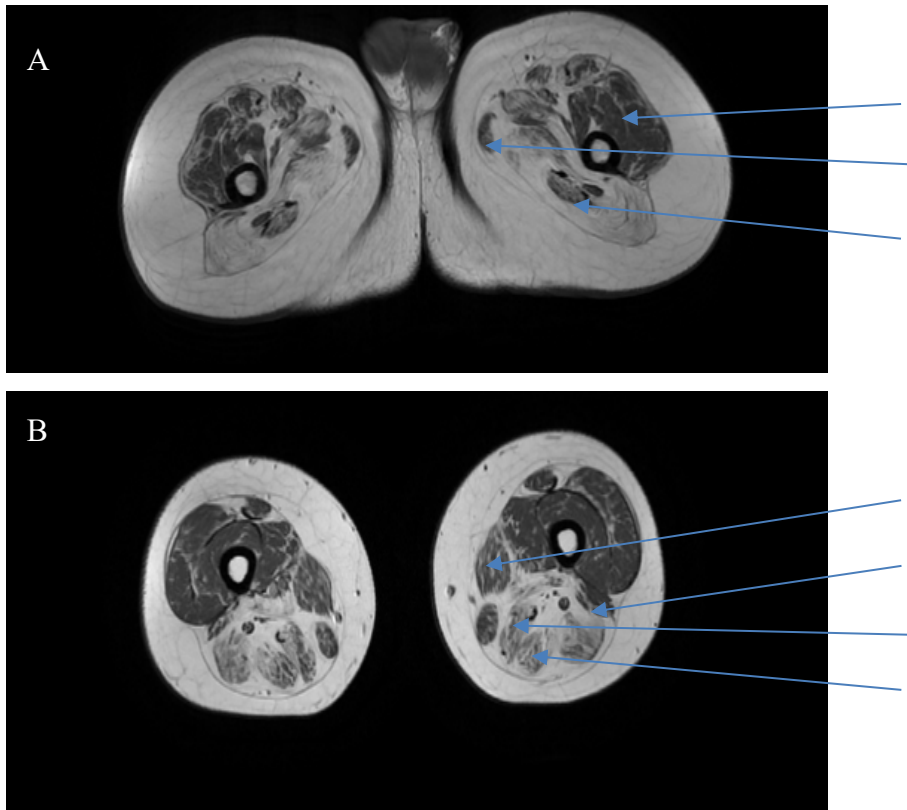
МРТ образна диагностика е проведена и на пациенти № 22 и 23. Пациентите са с брат и сестра, носители на 1337 G>T, p.Gly446Val в хомозиготно състояние, която не е описвана преди това в *CAPN3* гена. Майката на пациентите е хетерозиготен носител. Пациентите са етнически турци.

При пациент №22 се наблюдава засягане на мускулите на задно- медиалната група на бедрата- мастна дегенерация на m. semimembranosus, semitendinosus, adductor longus.



Фигура 11. Представяне на мускулите на тазовия пояс и дисталната част на бедрото- пациент №22. Наблюдава се значително засягане на тазовия пояс, с изразена мастна инфилтрация на *m. gluteus maximus*, *m. obturator externus*. Аддукторната група мускули са със сравнително запазена характеристика (11А). При мускулите в проксималната част на бедрото прави впечатление ангажирането на задната група мускули- *m. semimembranosus*, *semitendinosus*, *m. biceps femoris*. В най-голяма степен е изразена мастрана инфилтрация на *m. biceps femoris*- късата и дългата глава (11В).

При пациент № 23 началото на заболяването е в по-ранна възраст и е в по-напреднал етап. Прави впечатление по-изразената мастна инфилтрация на мускулите, което корелира с по-изразения дистрофичен процес с напредване на заболяването.



Фигура 12. Представяне на мускулите на тазовия пояс и дисталната част на бедрото- пациент №23. На нивото на тазовия пояс се наблюдава относително съхранение на *m. vastus lateralis* и *m. gracilis*, *m. semitendinosus*. Тежко изразена замяна на мускулна с мастна тъкан се вижда в аддукторната група мускули (12А). На нивото на проксималната част на бедрото се наблюдава мастна атрофия на телата на мускулите

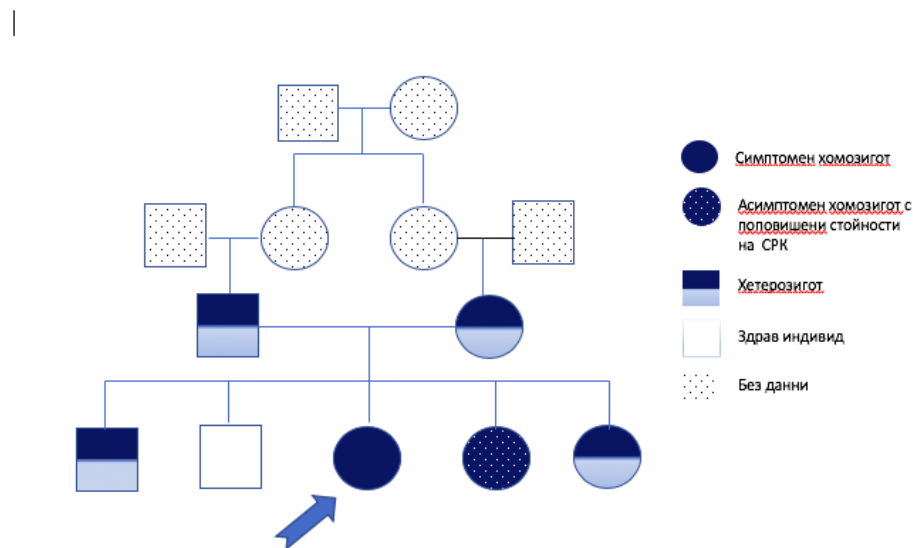
от задно-медиалната група- късата и дългата глава на *m. biceps femoris*, *m. semitendinosus*, *semimembranosus*, *adductor longus* (12B).

Ангажираните от мастно- дистрофичния процес мускули следват характерния модел на мускулно засягане при калпаинопатиите.

4.1.2.2. Клинични случаи

Семейство от сирийски произход с установено носителство на неописана досега мутация в *CAPN3* гена, с атипичен фенотип, унаследяваща се по АР път.

Семейството има 5 деца- две са хомозиготни по съответната мутация, като симптомно протичане на заболяването с разгърната клинична картина има при едното, а при другото има установени повишени стойности на КФК в серум. Други две от децата, едно момиче и едно момче, както и родителите, са хетерозиготи, а едно от децата (момче) не е носител на мутацията (фигура 13).



Фигура 13. Родословие на изследваното семейство.

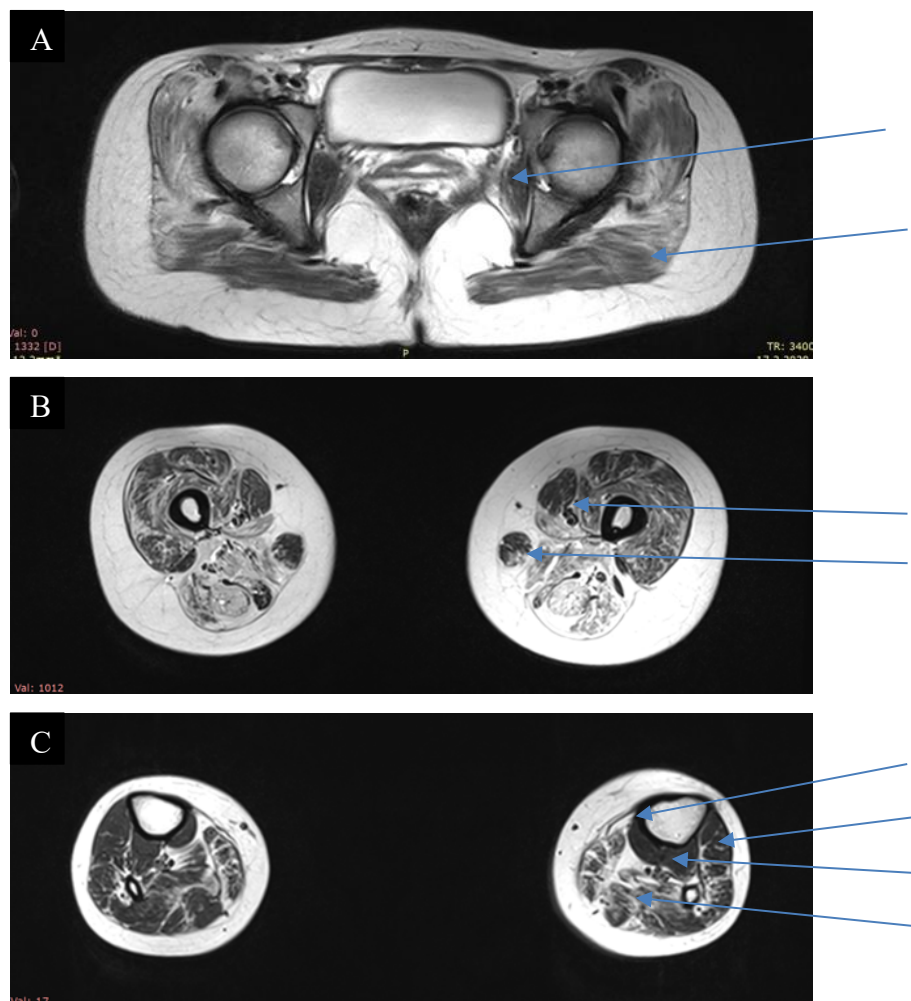
Децата са родени от кръвнородствен брак- родителите са първи братовчеди. Индексният пациент е момиче на 16 г.в. , родено от трета нормално протекла бременност и раждане на термин с т.м. 3000 кг. С нормално невропсихично развитие.

Проходила на 1 г., фразеологична реч от 1 г. и 2 месеца. Оплакванията и датират от 11-12 г.в., когато се променила походката, «започнала да ходи с повдигане на ходилата». Впоследствие се затруднило изправянето от клекнало положение и изкачването на стълби. Променила се стойката, с издаване на корема напред, при ходене започнала да усеща болка в лумбалната област. Затруднило се изправянето от легнало положение.

От неврологичния статус е налице миопатен синдром, изразен за проксимални мускули на горни, проксимални и дистални мускули на долни крайници, аксиална слабост. Затруднено е изправянето от клекнало и легнало положение с положителен (+) симптом на Gowers. Сухожилните рефлексии (СР) са отслабени в ръцете и липсващи в краката. Походката е степажно- клатушкаща се. При мануалното мускулно тестване (MCR скала) се установява намалена мускулна сила за флексия и екстензия в лакътна става, флексия, екстензия, абдукция и аддукция в тазобедрени стави, дорзална и плантарна флексия 3/5 двустранно. В останалите мускулни групи силата е по-леко засегната със стойности 4/5. Установяват се криловидни лопатки двустранно, лумбална хиперлордоза, ригиден гръбначен стълб, скъсени Ахилесови сухожилия двустранно. Наблюдават се хипотрофии на проксималните отдели на мускулите на горни и долни крайници и дисталните на долните крайници. Налични са флексиионни контрактури на колени и лакътни стави. Стойностите на КФК в серум са неколkokратно повишени (1376 IU/ml). Електромиографското изследване установява първична миогенна увреда. При проведените функционално изследване на дишането (ФИД), електрокардиограма (ЕКГ) и ехокардиография (ЕхоКГ) не са установени отклонения в дихателните и сърдечните функции. На останалите членове на семейството беше изследвана КФК в серум, като при едната сестра (на 14 г.в.), бяха установени повишени стойности (1666 IU/ml). При нея беше проведен клиничен преглед, като не са установени отклонения в неврологичния статус.

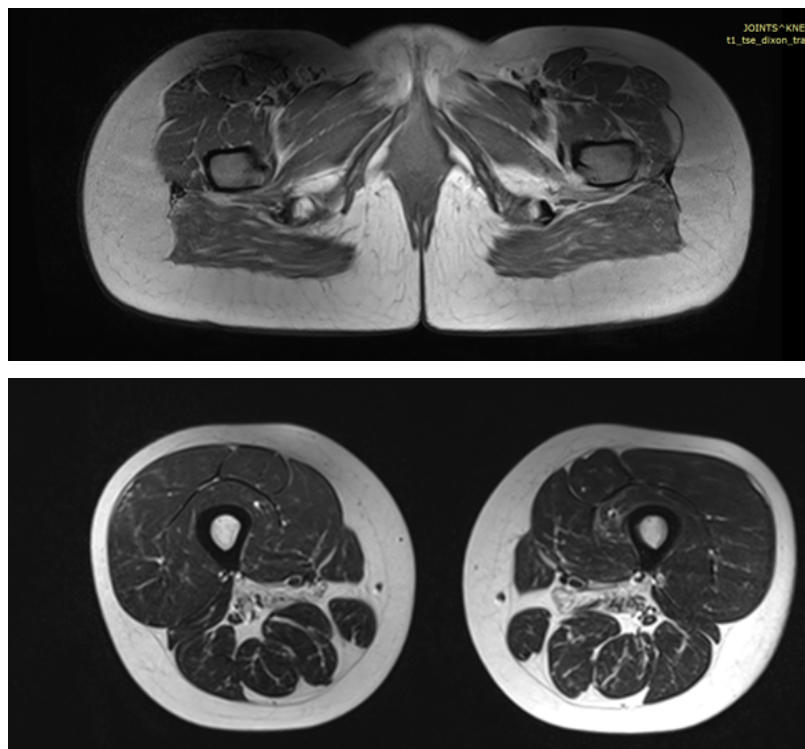
При всички членове на семейството е проведено пълно екзомно секвениране (WES), при което се идентифицира неописана до сега мутация p.Ile502TrpfsTer74 в *CAPN3* гена. Установената мутация не присъства сред 138 000 контроли на проекта GnomAD. Предполага се, че мутацията води до загуба на функция на засегнатото копие на гена. В съответствие със стандартите и насоките от ACMG / AMP този вариант е класифициран като патогенен (категории: PVS1, PM1, PM2).

На двамата хомозиготни пациенти (индексната пациентка и сестра ѝ с установени повишени стойности на КФК) е проведено МРТ изследване на мускули. При асимптомната пациентка не се установят промени в образната находка на мускули на долни крайници.



Фигура 14. МРТ на мускули на тазов пояс и долни крайници на индексната пациентка. При индексната пациентка се наблюдават мастна инфилтрация на глутеалните мускули (14А), изразено ангажиране на бедрената мускулатура, като най-засегнати са аддукторнага група мускули, задната група мускули, и в по-малка степен *m. quadriceps femoris*, на фона на който *m. vastus medialis* е най-съхранен. Изключение са *m. gracilis* и *m. rectus femoris* (14В). При мускулите на подбедрицата са ангажирани медиалните части на *m. gastrocnemius* и в по-малка степен на *m. soleus*, *tibialis posterior*, *tibialis anterior*, *m. extensor digitorum longus*. Правят впечатление по-изразените патологични

промени в дясната подбедцрица, които нямат клинична изява с асиметрична слабост (14C).



Фигура 15. МРТ на тазов пояс и бедрена мускулатура на пациентката асимптомен хомозигот. Наблюдава се нормална находка на изследваните мускули.

Pollitt и колект. (2001) и Mercuri и колек. (2005) и Landires и колект. (2020), независимо един от друг докладват за подобни варианти на клинична експресия на калпаинопатия, при който се наблюдават ранни контрактури и ригиден гръбнак.

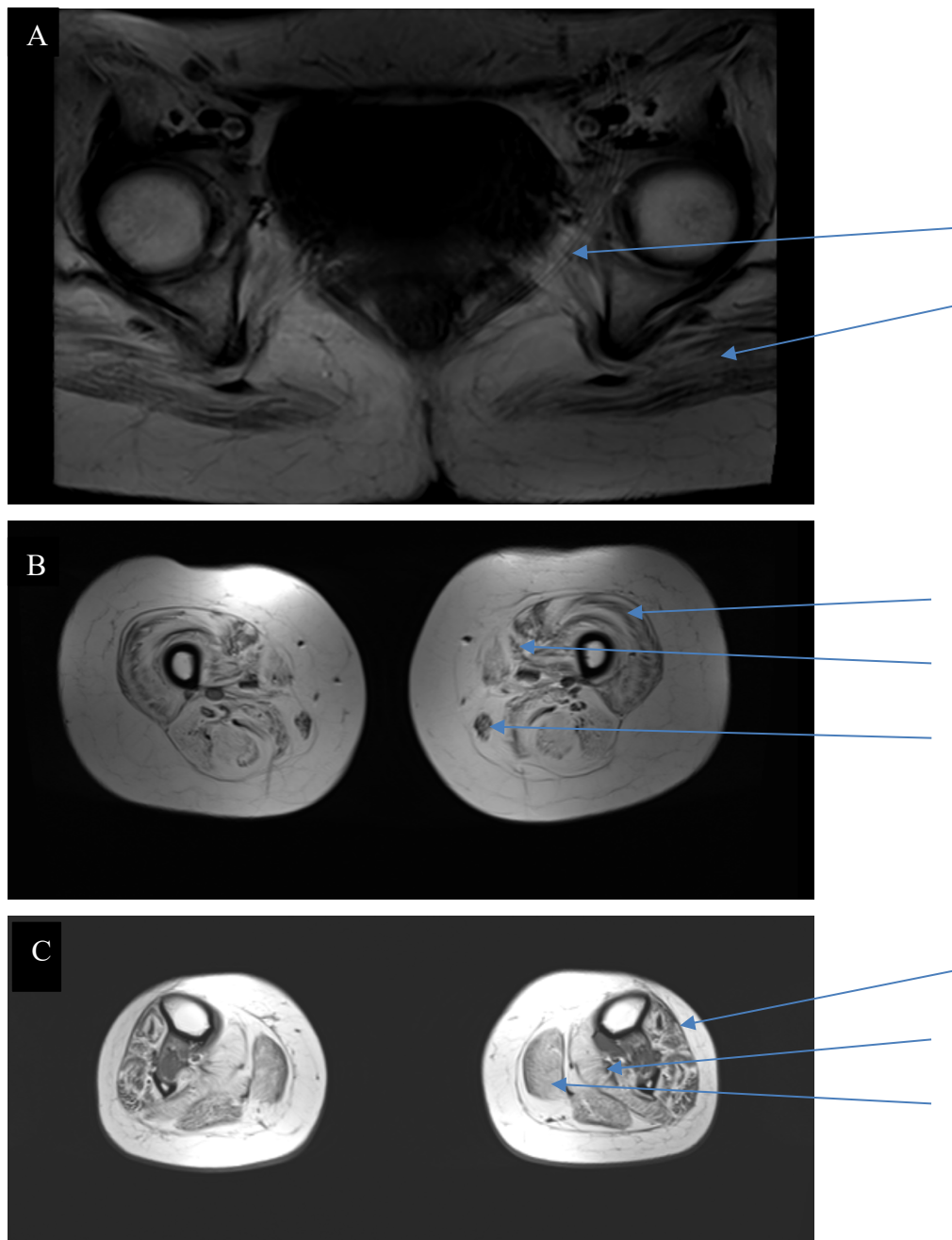
Описаните в тези клинични случаи патогенни варианти се различават от тези, установени при нашите пациенти, с което се разширява фенотипния и генотипния спектър на калпаинопатите.

Представяне на семейство с автозомно-доминантна форма на *CAPN3* свързана Пояс-крайник мускулна дистрофия.

Семейството се състои от баща и дъщеря, носители на c598_612 del мутация в *CAPN3* гена в хетерозиготно състояние. Бащата е с украински произход.

При дъщерята се наблюдава разгърната клинична картина на заболяването. Родена от първа нормална протекла бременност и раждане, с тегло 3500гр. и ръст 52см. Проходила на 1г., проговорила на 1г. и 2 месеца. Оплаквания датират от 11г.в., когато се появили болки в краката- мускули на бедра, подбедрици, стъпала, усещаци се като мускулна треска, започнала да се изморява по-лесно. Постепенно се появили трудности при бягане, скачане, започнана по-бавно и трудно да се изкачва и слиза по стълби, затруднило се изправянето от клекнало положение. Съобщава за момент, в който прасците са били по-големи (трудно си е намирала ботуши), в последствие са намалели по обем. От 13-14 г.в. забелязала, че започва по-често да се спъва, с чести падания, поради затруднено изправяне на стъпалото. От около 14- 15 г. в. се добавила слабост в ръцете- предимно в мишниците, които започнали да отслабват по обем. В последствие се ангажирали и мускулите на раменната област. Гореописаните оплаквания прогресират във времето. От 25 г.в. има необходимост от подкрепа при ставане от седнало положение и при ходене. От проведения неврологичен преглед е с данни за миопатен синдром с генерализирана мускулна слабост, по- силно изразена за проксималните мускули на четирите крайника и на аксиалната мускулатура, генерализирана арефлексия, невъзможно изправяне от клекнало положение, невъзможно изправяне от легнало положение, миопатно- клатушкаща се походка с едностранно подпомагане; Лумбална хиперлордоза; Криловидни лопатки двустранно; скъсени Ахилесови сухожилия двустранно. Наблюдават се хипотрофии на проксималната мускулатура на долни крайници и раменен пояс.

На симптоматичния пациент е проведено NGS. При родителите е проведено секвениране на *CAPN3* гена. При пациентката не са описани отклонения от изследването на сърдечната и дихателната функция. КФК е проследявана неколкократно в годините, като стойностите варират от 2 до 15 пъти над нормата (481 IU, 2879 IU). Проведена е МРТ на мускули на тазов пояс и долни крайници и параспинална мускулатура.



Фигура 16. МРТ образи на тазов пояс, подбедрици, бедра, аксиален срез, T1 секв. Описани са изразени атрофични промени в параспиналната мускулатура (не е представена снимка). При бедрата се наблюдава дифузна тежка атрофия със заместване от мастна тъкан на *m. iliacus*, *mm. glutei maximi, minimi, medii* двустранно, както и *m. vastus lateralis et medialis*. *M. gracillis* е сравнително съхранен като сигнална интензитет (16А,В). При изследване на подбедриците правят впечатление изразени атрофични промени в *m. gastrocnemius*, *m. soleus*. *M. tibialis posterior*, както и *m. flexor halucis longus* и *m. flexor digitorum longus*, *m popliteus* са съхранени. Забелязва се

умерено към силно изразена атрофия на *m. tibialis anterior*, което не е обичайна находка при това заболяване (16С).

Бащата на пациентката не съобщава за субективно оплакване от мускулна слабост. Поради това в началото е поставена погрешна диагноза- АР калпаинопатия. От проведените преглед и изследвания при него се установяват хипотрофии на мускулите на мишниците – *m. biceps brachii* и *m. triceps brachii* (Фигура 17), без обективно да има слабост в тях (пациентът работи тежка физическа работа с ръцете си).



Фигура 17. Снимка на хипотрофии на *m. biceps brachii* и *m. triceps brachii* при съхранени *mm.deltoidei* двустранно.

От параклиничните изследвания се установяват повишени стойности на КФК, двукратно изследвани- около 250 UI. Иглената ЕМГ демонстрира миогенна увреда в мускулите на долни крайници.

В описаното семейство се наблюдава изразена интрафамилна вариабилност, представяща пациент с разгърна клинична картина и такъв с почти безсимптомно протичане на заболяването.

Обсъждане:

ПКМД 2А е най-честата ПКМД в световен мащаб, но втората по честота в България.

Началните прояви на заболяването са обичайните, които са описани в литературата, представляващи трудности при качване на стълби, при тичане, ставане от клекнапо положение и демонстриращи проксимална мускулна слабост. Описаните допълнителни прояви като псевдохипертрофия на подбедриците при 41,18% от пациентите също е характерна проява при заболяването.

В нашата група клиничното начало е предимно през второто десетилетие, а като при 7/34 % от засегнатите е в първото десетилетие. Мускулното засягане при нашите пациенти следва стандартния модел с първоначална и тежка проксимална слабост в долните крайници, придружена или последвана от слабост на предните тибиялни мускули и по-късно засягане на мускулите на горните крайници. При някои пациенти са наблюдавани хипертрофия на прасеца, криловидни лопатки, ставни контрактури. Клиничният ход и тежестта на заболяването обаче показват между- и вътрешнофамилни вариации въпреки хомогенността на мутацията. Моделът на мускулните МРТ промени при нашите пациенти е близък до описаните в литературата [Barp A. и сътр. 2019] и потвърждава описвания преди това модел на мускулно засягане при калпаинопатията с преобладаващо засягане на бедрените мускули на долните крайници и главно на адукторите (*m. adductor magnus*), някои от задната група мускули (*m. semitendinosus*, *m. semimembranosus* и дългата глава на *m. biceps femoris*) и *m. gluteus minimus*, заедно с относително запазване на *m. sartorius*, *m. gracilis*, *m. quadriceps*, късата глава на *m. biceps femoris* и *m. iliopsoas*. В подбедрицата се наблюдава преобладаващо засягане на *m. gastrocnemius medialis*.

Данните от пациентите в проучването потвърждават наличието на изразена интра – и интерфамилна клинична вариабилност, варираща от тежки до леко протичащи форми [Richard и съавт., 1999, Fanin & Angelini 2015].

Идентифицирани са и неописвани до сега мутации в литературата. Една от тях е с типичен фенотип на заболяването, протичаща с характерно начало и мускулно засягане. При една е установена атипична форма на заболяването – с Емери-Драйфус подобен фенотип без сърдечно засягане, което разширява генотипния и допълва фенотипния спектър на заболяването. Установено е семейство с АД калпаинопатия с изразена интрафамилна вариабилност на протичането, което корелира с характеристиката на тази форма. [Vissing и съавт., 2016, Cerino M и съавт., 2020]. Мутацията, която е установена при пациентите е описана в литературата като такава,

асоциирана с АД калпаинопатия [Serino M и съавт., 2020] при семейство с фенотип, подобен на семейството описано в проучването, с клинична изява, варираща от олигосимптомно протичане до изразена тип пояс-крайник мускулна слабост.

Поради това при съмнения за калпаинопатия дори в семейства с клинични данни за АД унаследяване на заболяването, е уместно секвениране на *CAPN3* гена.

Резултатите от проучването потвърждават високото разпространение на тази мутация при пациенти с ПКМД 2А от България. Това, заедно с факта, че голяма част от точковите мутации и малки делеции попадат в екзони 4 и 7 на гена *CAPN3*, улесняват генетичните тестове при българските пациенти. Непрекъснатото разширяване на генотипния и фенотипния спектър на калпаинопатиите води до необходимостта от използването на съвременни методи за генетично изследване като NGS за поставяне на точна генетична диагноза при неясни и нетипични случаи.

4.1.3. Телетонинопатия

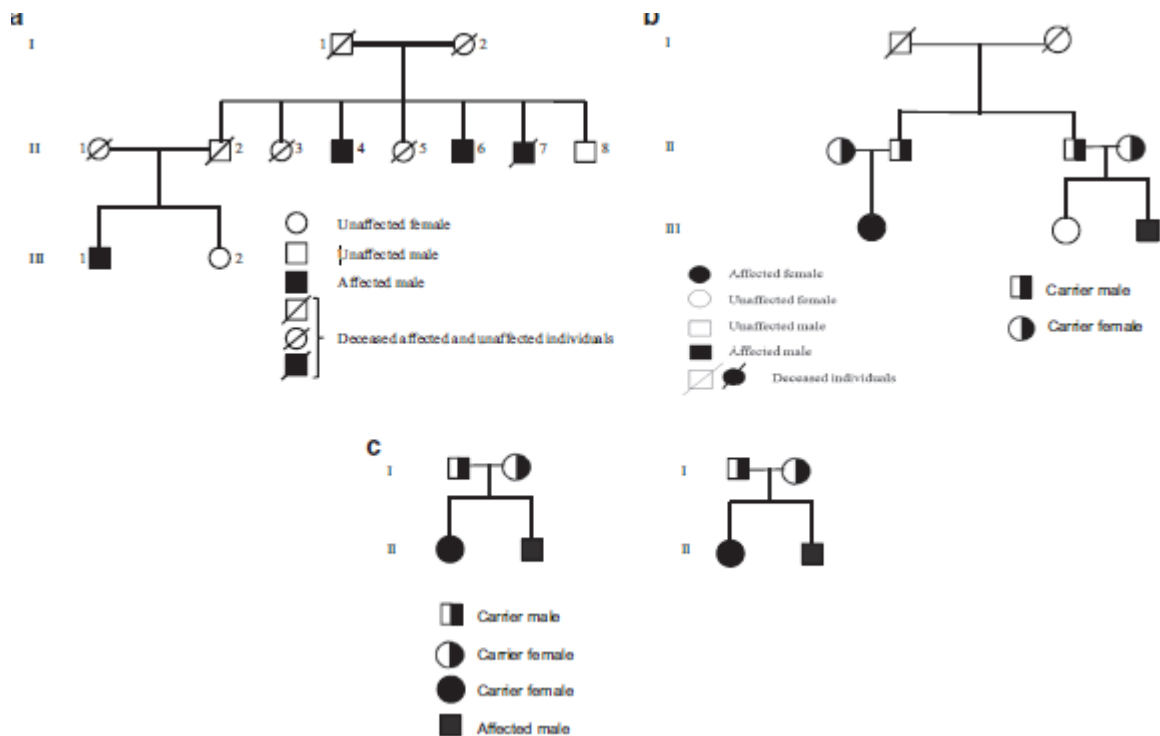
Клиничният контингент включва 19 болни (13 мъже и 6 жени) от 12 родословия, като информацията е събрана за период от между 2012 и 2021г. Използвани да данни, събирани по време на теренни проучвания и чрез документацията на Клиника по нервни болести, УМБАЛ „Александровска“.

След установяването на първите случаи през 2012г., молекулярно-генетичното изследване на *TCAP* гена е включено в диагностичния алгоритъм на българските пациенти с ПКМД. За да се провери хипотезата за ендемичната област на мутацията с.75G> А, р.Trp25 *, са изследвани 100 новородени от района на гр. Смолян и гр. Рудозем за тази мутация в *TCAP* гена. Проверката на хетерозигозността се извършва чрез PCR амплификация на суха капка кръв от картите на Guthrie [Todorova A и съавт., 1999] . Отворена мускулна биопсия от m. quadriceps femoris на пациент е проведена на №12. Хистохимичните изследвания са проведени във Friedrich-Baur Institut, Мюнхен, Германия.

Генетични находки: Десетима от пациентите съобщават за положителна фамилна анамнеза с родословна структура в съответствие с АР модел на унаследяване. (Фиг. 20.). 18 от засегнатите хомозиготни за с.75G>А, р.Trp25*мутация, а един е двоен

хетерозигот, носещ Glu132Val в екзон 2 на гена *TCAP* като втора мутация. Заместването на TGG към TGA в кодон 25 на екзон 1 се очаква да замени триптофан в тази позиция със стоп сигнал (Trp25X) и е довело до пресечена молекула телетонин, която завършва на позиция 25 вместо нормална 167.

Всички засегнати семейства отричат кръвнородствени бракове. Всички хомозиготни пациенти принадлежат към религиозно малцинство от българо-мохамедани и произхождат от югозападния регион на страната (Смолян и Рудозем). Това води до предположение за кумулативни ефекти от историческа ендогамия или висока честота на носителство за с.75G>A, р.Trp25* в тази субпопулация. По време на скрининга за р.Trp25* мутация в горепосочения регион на страната са открити два хетерозиготни носителя на мутацията, което представлява значима честота на носителство около 2% (2/100). В хода на скрининга случайно е открит друг генетичен вариант с.36_38delGGA; р.Glu13del в екзон 1 на *TCAP* гена с несигурно значение за диагнозата ПКМД 2G. Същият вариант е докладван в базата данни за мутации (www.dmd.nl) като свързан с хипертрофична кардиомиопатия [Andersen и съавт., 2009]



Фигура 18. Родословия на фамилните случаи с ПКМД 2G

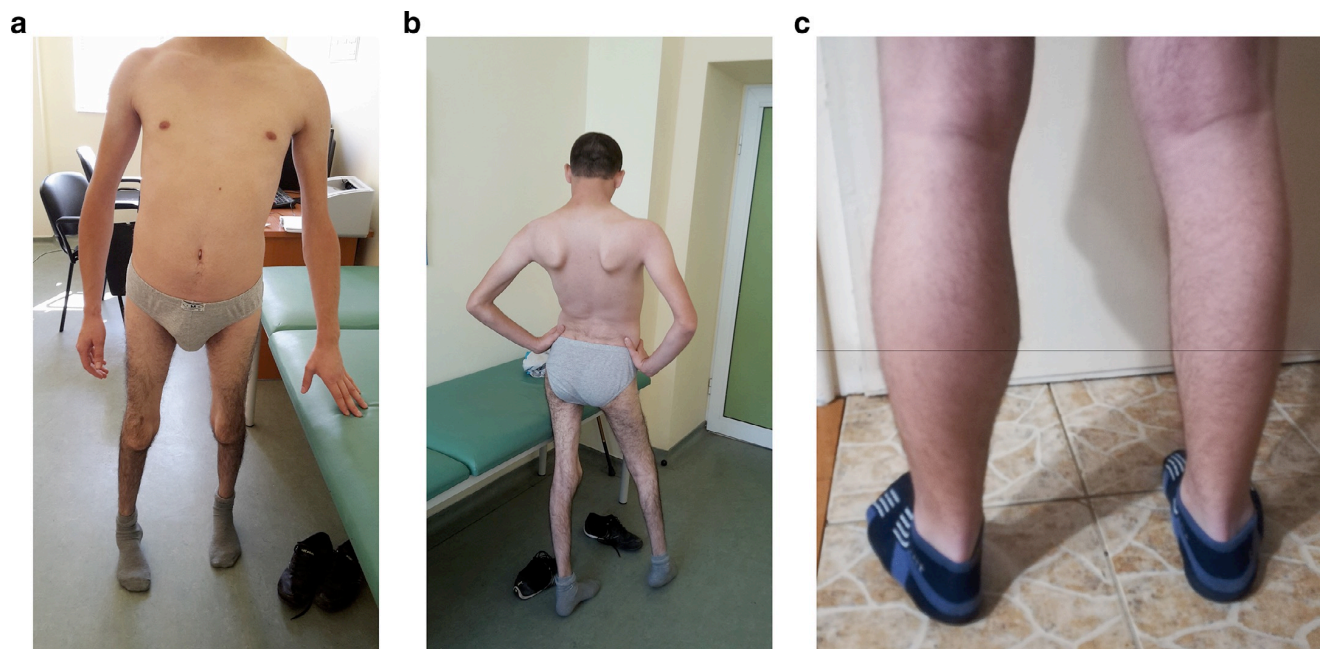
Пациентите с техните генетични и клинични характеристики са описани в таблица (Таблица 7).

Таблица 7. Генетични и клинични характеристики на пациенти с телетониопатия.

Пациент N	Мутация TCAP гена	Пол	ДОВ	Възраст на начало	Възраст на загуба на походка	Мануално мускулно тестване (MRC scale)			Псевдо хипертрофия на подбедрици
						m.tibialis ant.	m. triceps surae	Проксимални мускули на долни крайници	
1	Trp25Term/Trp25Term	М	21.02 1990	25 г.	-	2/5	2+/5	3/5	не
2	Trp25Term/Glu132Val	М	НД	29 г.	-	2/5	4/5	3/5	Не
3	Trp25Term/Trp25Term	М	НД	61 г.	-	0/5	0/5	1/5	Не
4	Trp25Term/Trp25Term	М	НД	39 г.	40	0/5	0/5	1/5	Не
5	Trp25Term/Trp25Term	М	НД	51 г.	35	0/5	0/5	2/5	Не
6	Trp25Term/Trp25Term	Ж	03.06 1993	17 г.	-	5/5	4+/5	4/5	Не
7	Trp25Term/Trp25Term	М	нд	61 г	34	0/5	0/5	1/5	Не
8	Trp25Term/Trp25Term	М	нд	26	-	3/5	5/5	3/5	Не
9	Trp25Term/Trp25Term	М	нд	30	-	0/5	0/5	2/5	Не
10	Trp25Term/Trp25Term	М	10.01 1981	21	-	2/5	5/5	3/5	не
11	Trp25Term/Trp25Term	Ж	Нд	24	-	2/5	4/5	3/5	Не
12	Trp25Term/Trp25Term	М	нд	22	-	3/5	5/5	4/5	Не
13	Trp25Term/Trp25Term	М	нд	23	-	2/5	4+/5	4/5	Не
14	Trp25Term/Trp25Term	Ж	нд	26	-	2+/5	5/5	4/5	Не
15	Trp25Term/Trp25Term	ж	нд	29	-	2/5	3/5	4/5	Не
16	Trp25Term/Trp25Term	ж	25	34	-	0/5	1/5	3+/5	Не
17	Trp25Term/Trp25Term	м	24.03 1999	3-4	-	3/5	4/5	4/5	не
18	Trp25Term/Trp25Term	М	02.07 2000	6-7	-	3+/5	4/5	5-/5	Да, в ляво
19	Trp25Term/Trp25Term	Ж	08.05 1992	14	-	3/5	4/5	3/5	Да, в ляво

Средната възраст на началото е 28,4 години, варираща между 3 и 25 години, като при жените е значително по-рано- 24 години, докато при мъжете е 30,54 г. Първоначалните прояви при повечето от пациентите (14/19) включват проксимална мускулна слабост в долните крайници с прогресивни затруднения при бягане, изкачване на стълби и изправяне от стол, последвано от затруднения в дорзалната флексия на глезена. При 4 от засегнатите проксималната и дисталната слабост в

краката са настъпили едновременно. Първоначално и по-тежко засегнати са мм. *gluteus maximus*, *gluteus medius*, hamstring мускули, бедрени аддуктори и *m. tibialis anterior*. Проксималните мускули на горните крайници се ангажират 5-9 години след началото на заболяването. Криловидни лопатки и лумбална хиперлордоза се развиват късно в хода на заболяването. Сколиоза е наблюдавана при един пациент (№15) 9 години преди мускулната слабост. Контрактури на глезена и хипертрофия на прасеца неизменно присъстват при 14/17 пациенти. При двама пациенти е описана едностранна псевдохипертрофия на подбедриците. Екстраокуларните и лицевите мускули са запазени при всички засегнати. (Фиг. 19)

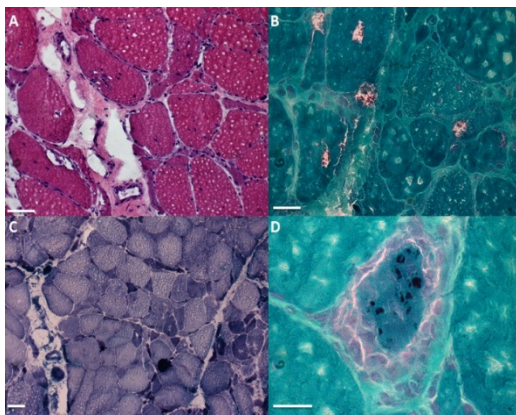


Фигура 19. Клиничен фенотип на пациент 1 на 25 г.в., хомозигот за *c.75G > A*, *p.Trp25X. 19A*. Хипотрофии на бедрените мускули, *m. tibialis anterior*, двустранен пес еквиноварус, по-изразен в дясно. *19B*. Криловидни лопатки. хипертрофия на подбедриците. *19C*. Асиметрия между лява и дясна подбедрица при пациент 13 с разлика в диаметрите от 3см.

В хода на изследването 5 пациенти са загубили самостоятелна походка. Загубата на възможност за придвижване е настъпила през четвъртото десетилетие средно на $35,4 \pm 2,60$ години, с вариация между 34 и 40 години.

В кохортата от изследваните пациенти 31.6 % (6/19) са жени, а 68,4 % са мъже.

Мускулна биопсия, взета от *m. quadriceps femoris* на пациент №12 демонстрира умерено заместване на мастна и съединителна тъкан, вариация на размера на влакната и централно разположени мионуклеуси. В единични влакна са описани „rimmed” вакуоли и немалинови пръчици (Фигура 20). Рядко се наблюдава некроза на единични влакна и фагоцитоза. Имунохистохимичните изследвания показват нормална реакция за трите епитопа на дистрофин (пръчка, карбокси край, amino край), саркогликани (алфа, бета, гама, делта), десмин, кавеолин, дисферлин и емерин.

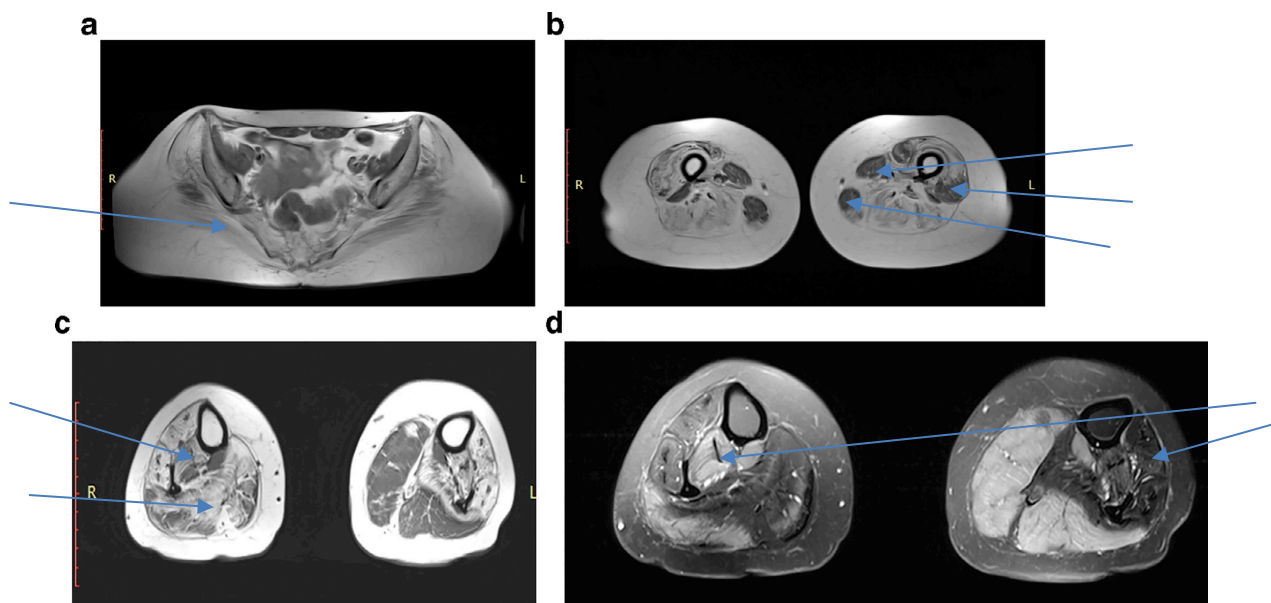


Фигура 20. Хистологична находка от *m. quadriceps femoris* на пациент № 9 на възраст 18 години. **A.** Н&Е оцветяването показва миопатна трансформация на мускулната тъкан с лека фиброза, интернализирани ядра и увеличаване на вариабилността на размера на влакната. **B + D.** Трихромното оцветяване на разкрива единични влакна с включени вакуоли и немалинови пръчки. **C.** NADH реакцията показва тъмносини, но не и лобулирани влакна (баровете в А-D се регулират на 50 μm).

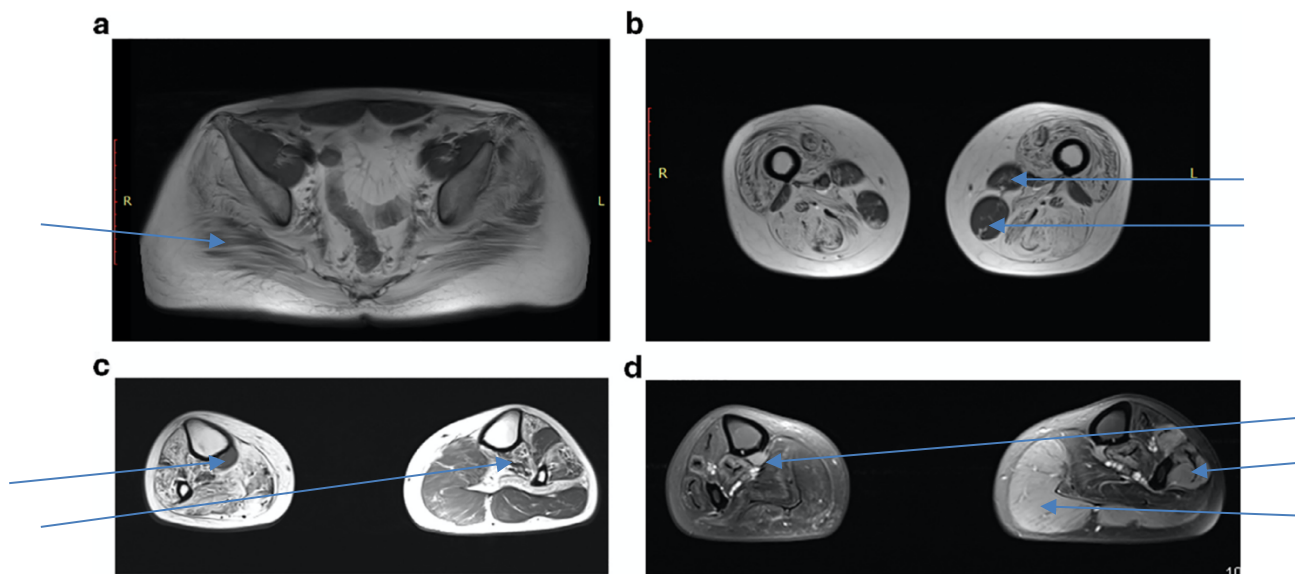
ЕМГ изследването демонстрира миогенни промени с ниски потенциали на двигателната единица.

От проведената образна диагностика на двама пациенти МРТ на тазовия пояс на пациент №16, направена на 39 г.в. демонстрира тежки фибро- мастни изменения и на двата *mm. glutei maximi*, *tensor fasciae latae* мускули и десен *obturator internus*, съпроводено с атрофия на *mm. Psoas* и *sartorius* (фигура 21). Най-тежки промени са открити в предната и задната част на двете бедра. Мускулите *sartorius* и *gracilis* са относително запазени без признаци на миоедем. В подбедриците е установено двустранно тежко фибро-мастно заместване на предния отдел и *m. soleus*. Освен това

десния заден отдел са силно засегнати. Описани са и ранни фибро-мастни промени в медиалната глава на левия *m. gastrocnemius*. На секвенциите PD Fat Sat е описан миоедем на *m. tibialis posterior*, латерална глава на двата *mm. gastrocnemius* и медиалната глава на левия *m. gastrocnemius* (Фигура 21D).



Фигура 21. МРТ на мускули на тазов пояс и долни крайници на пациент № 10 (Ж), на 39 г.в. (21А) T1 аксиален срез на ниво бедра – тежка атрофия на *mm. glutei minimi, medii, maximi* и *mm. piriformi*, среднотежка строфия на *m. Psoas*. (21В) T1 аксиален срез на ниво на двете бедра - Mercuri score 4 – краен етап на засягане на предните и задните отдели. Мускулите са заменени със съединителна и мастна тъкан. *Mm. vastus medialis* и *lateralis* на левия крак са по-малко засегнати. Относително запазване на *m. sartorius* и *gracilis* и късата глава на *m. biceps femoris*. (21С) Всички мускули с изключение на *m. flexor digitorum longus* в дясно са с изразена мастна дегенерация. В лява подбедрица е налице тежка фибро-мастна замяна на антеролатералния отдел и *m. soleus*, а в средната глава на *m. gastrocnemius* се наблюдават ранни фибромастни промени. (21D) Fat Sat на двата долни крака - миоедем на *m. tibialis posterior*, латерална глава на двата *mm. gastrocnemii* и медиалната глава на левия *m. gastrocnemius*.



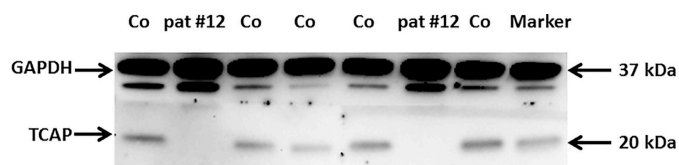
Фигура 22. МРТ на тазовите мускули и мускулите на долните крайници на пациент №7 (мъж), на 35 години (22А.) Т1 аксиален срез на нивото на бедрата - тежки фибро-мастни двустранни промени на мускулите *mm. glutei minimi, medii, maximi, piriformis*. (21В) Т1 аксиален срез на нивото на двете бедра. Тежка мастна дегенерация на предни и задни части. Относително запазване на мускулите *m. sartorius, gracilis* и късата глава на двуглавия бедрен мускул, които са леко засегнати. (22С) Т1 TSE на двете подбедрици - аксиален срез - Всички мускули с изключение на *m. flexor digitorum longus* показват тежка мастна дегенерация от дясната страна. В лявата подбедрица се представя фибро-мастно заместване на антеролатералния дял и *mm. solei* с ранни фибро-мастни промени в медиалната глава на *m. gastrocnemius*. Промените са относително по-слабо изразени в левия крак в сравнение с пациент №10. (22D) PD Fat Sat на двете подбедрици- аксиален срез- миоедем на задния тибиялен мускул, латерална глава на двата *mm. gastrocnemii* и медиална глава на ляв *m. gastrocnemius*.

Средната сърдечна честота на изследваните пациенти е 76 ± 8 удара в минута, средното систолно артериално налягане - 112 ± 8 mmHg и средното диастолно артериално налягане - 74 ± 5 mmHg. На ЕКГ не са регистрирани патологични отклонения. Ехокардиографията показва нормална систолна функция със средна фракция на изтласкване $66 \pm 4\%$. Параметрите на диастолната функция също са в референтните граници. Липсват признаци на ЛК хипертрофия – средната дебелина на септума е

9,4±0,9 mm. При изследваните пациенти дихателната функция е запазена със стойности на FVC в диапазона 73-108%.

Стойностите на КФК са повишени 2 до 25 пъти над горната граница на нормата.

Western blot анализът, извършен с 20 kDa моноклонално антитело срещу ТСАР показва пълно отсъствие на протеина при пациент № 9 (Фигура 23).



Фигура 23. ТСАР Western blot при пациент № 9. Western blot анализ с моноклонално антитяло срещу ТСАР показва пълно отсъствие на телетонин при 20 kDa при пациент № 9. GAPDH е представен като контролен протеин.

Обсъждане:

Проучването на засегнатите семейства, принадлежащи към групата на българо-мохамедани, идентифицира известна ТСАР хомозиготна мутация с.75G>A, p.Trp25, открита преди това при пациент от Молдова [Olivé M и съавт., 2008]. Това е втората по големина група хомозиготни ПКМД 2G пациенти, идентифицирани досега [Moreira ES и съавт., 1997, Moreira ES и съавт., 2000]. Въпреки че първоначално заболяването е ограничено до бразилски пациенти от италиански произход, впоследствие е идентифицирано при други засегнати с различен генетичен произход, като по този начин се демонстрира по-широко географско разпространение. [Moreira E и съавт., 1997, Moreira E и съавт., 2000, Valle G и съавт., 1997, Mason P и съавт., 1999, Vainzof M и съавт., 2002, De Fuenmayor-Fernández и съавт., 2016]. ТСАР мутацията p.Trp25* в екзон 1 е безсмислена мутация, което води до фенотип ПКМД със запазени сърдечни и дихателни функции. [Ferreiro и съавт., 2011]. В югозападната част на България беше установено, че процентът на носителство на p.Trp25* е доста висок 2% (2/100), вероятно поради кумулативни ефекти от историческата ендогамия в това затворено религиозно малцинство. Това откритие трябва да улесни молекулярната диагностика в бъдещи случаи с ПКМД при българо-мохамедани, произхождащи от горепосочения регион. Случайното откритие на p.Glu13del в екзон 1 на ТСАР, свързано със сърдечно засягане, дава някои насоки за бъдещ целеви скрининг на хора с хипертрофична

кардиомиопатия, принадлежащи към това религиозно малцинство. Известно е, че ПКМД 2G се развива през първото-второто десетилетие от живота. [Moreira E и съавт., 1997, съавт., 2000, Valle G и съавт., 1997, Mason P и съавт., 1999, Vainzof M и съавт., 2002, De Fuenmayor-Fernández и съавт., 2016]. В нашата група клиничното начало е предимно през второто десетилетие, а при 30% от засегнатите дори по-късно през третото. Мускулното засягане при нашите пациенти следва стандартния модел [Moreira E и съавт., 1997, Valle G и съавт., 1997, Mason P и съавт., 1999, Vainzof M и съавт., 2002], с първоначална и тежка проксимална слабост в долните крайници, придружена или последвана от слабост на предните тибиялни мускули и по-късно засягане на мускулите на горните крайници. При някои пациенти са наблюдавани хипертрофия на прасеца, криловидни лопатки, ставни контрактури. Клиничният ход и тежестта на заболяването обаче показват между- и вътрешнофамилни вариации въпреки хомогенността на мутацията. Моделът на мускулните МРТ промени при пациентът от проучването е близък до описаните по-рано два случая. [Negrao L и съавт., 2010, Francis A и съавт., 2014]. Засегнати са предимно мускулите и в трите дяла на бедрото и предната част на подбедрицата, докато *m. sartorius*, *gracilis* остават относително пощадени. Фибро-мастно заместване и миоедем присъстват двустранно в *m. tibialis posterior* и латерална глава *m. gastrocnemius*, докато медиалните му глави са по-запазени. Броят на отчетените до момента МРТ на мускулите на пациенти с ПКМД 2G е ограничен и са необходими бъдещи изследвания за по-стабилни заключения и сравнения.

Наличието на немалинови телца, открити в мускулната биопсия на пациент №12, е наблюдавано преди това при един пациент с ПКМД 2G. [Paim JF и съавт., 2013]. Телетонинът присъства в пръчките в мускулните влакна на немалиновата миопатия, което потвърждава неговата локализация Z-линията на саркомера. [Vainzof M и съавт., 2002]. Следователно немалиновите телца най-вероятно са вторичен феномен, свързан с фокалните аномалии на Z-линията по време на прогресията на заболяването [Paim JF и съавт., 2013].

В заключение, въпреки че се счита за рядка в световен мащаб, ПКМД 2G е често срещана форма сред българо-мохамеданите, която трябва да се има предвид при диагностицирането на такива пациенти. Високата степен на носителство на с.75G>A, р.Trp25* в *TCAP* сред тази група може да наложи създаването на програма за скрининг

за носители сред това религиозно малцинство, за да се предотвратят нови случаи. Хомозиготността за с.75G>A, р.Trp25*мутация е свързана с хомогенна клинична изява по отношение на модела на мускулно засягане. Клиничният ход и тежестта на заболяването обаче показват вътрешно- и междуфамилни вариации въпреки хомогенността на мутацията.

4.1.4. ПКМД 2Z/R21- POGLUT1 асоциирана

Клиничният контингент включва 3 пациенти с *POGLUT1* асоциирана ПКМД 2Z/R21.

Тримата пациенти са представители на едно семейство - три сестри от български етнос. Генетичното изследване е осъществено по проект MyoSeq, като е установено носителство на pR98W(p.Arg98Trp) мутация в хомозиготно състояние в *POGLUT1* гена. (Таблица 8).

Таблица 8. Клиничната характеристика на пациентите с ПКМД2Z/R 21.

	Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3
начало на оплакванията	25 г.	44 г.	22 г.
първи прояви на заболяването	трудно изкачване на стълби, изправяне от клекнало положение	затруднено изкачване на стълби, изправяне от клекнало, седнало и легнало положение и бърза умора при физическо натоварване	трудно изкачване на стълби, изправяне от клекнало положение, трудно стъпване на пети
засягане на горни крайници (г.в.)	около 45	50	около 40
засегнати мускулни групи	проксимални групи на четирите крайника, дистална в краката, аксиална мускулатура	проксимални мускули в горни и долни крайници и аксиални мускулатура	проксимална мускулатура на горни и долни крайници, аксиалната мускулатура, предна тибиялна мускулатура
стойности на КФК	122, 146, 172	125, 75, 121	133, 110, 135
ЕМГ находка	миогенна увреда	миогенна увреда	миогенна увреда
криловидни лопатки	Л>Д	Л>Д	Л>Д
лумбална хиперлордоза	да + тораколумбална сколиоза	да + дясно конвексна сколиоза	да

дихателно/ сърдечно засягане	не/не	не/не	не/не
АК замени	p.R98W/ p.R98W	p.R98W/ p.R98W	p.R98W/ p.R98W
възраст на поставяне на диагнозата	52/F	47/F	50/F
Долни крайници/проксимално (MRC)	4-	2	2
долни крайници дистално (MRC)	5	5	5
горни крайници проксимално (MRC)	4	4	4
горни крайници дистално (MRC)	5	5	5
FVC (%)	72	53	76
Загуба на походка	Не	Не	Не



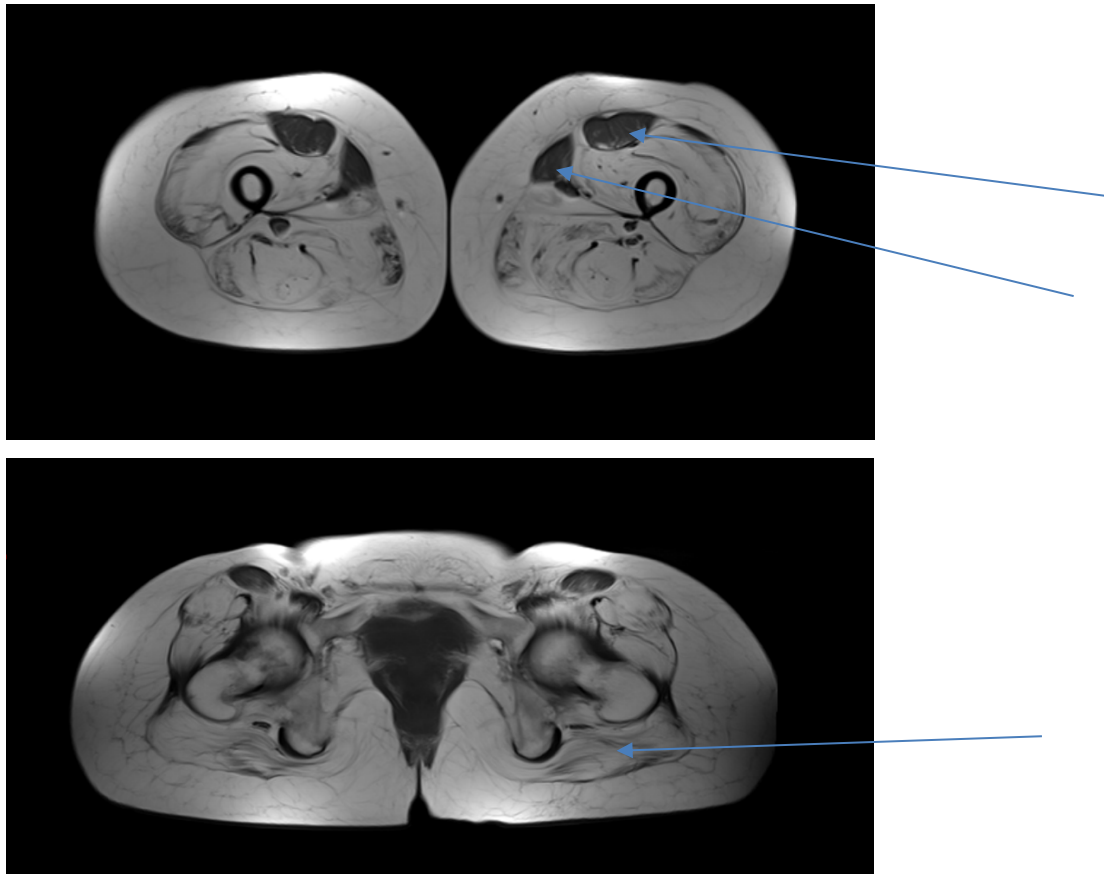


Фигура 24. Клинично представяне на пациент 3 (снимките са публикувани със съгласието на пациентката).

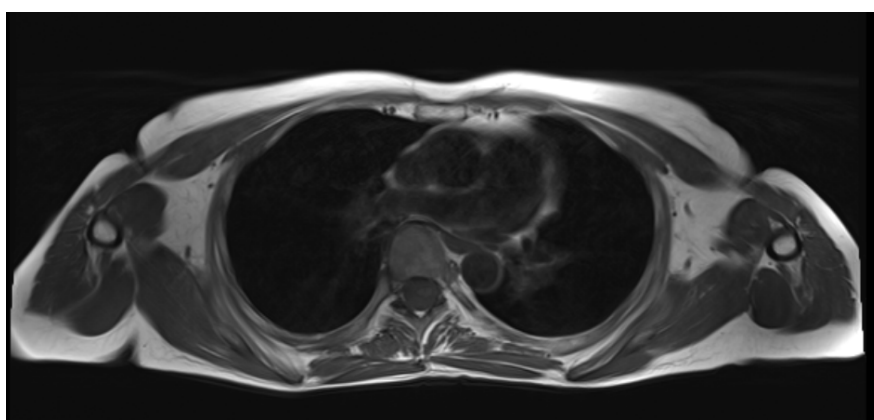
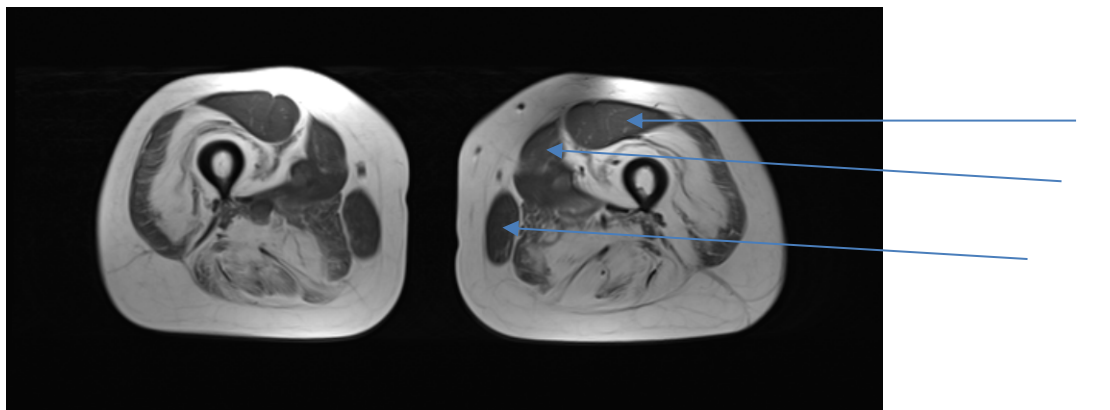
Пациентите от проучването са единствените описани с pR98W. С. Paradas и колектив изследват функциите на всички мутации, установени при пациентите с ПКМД 2Z/R21. Те установяват, че p.R98W, както и p.I129T, p.C102F и p.W308L мутации дестабилизират POGlut1 протеините.

Средната възраст на начало на заболяването при пациентите от проучването е 30 г.в., като се наблюдава значителна разлика - две от сестрите са с по-ранно начало на оплакванията (22 и 25 г.в.), а третата е с по-късно начало и по-леко изразена симптоматика. В останалите описани в литературата случаи също е установена разлика над 2 десетилетия в началото на проявите на мускулна слабост в едно и също семейство. Началните прояви на заболяването да идентични при трите пациентки-трудности при изправяне от клекнало положение, демонстриращи проксимална мускулна слабост в долните крайници. Интересно е, че пациент №2, която е с най-късно начало и лека форма, като начален симптом описва и лесна уморемост при физическо натоварване. При всички пациенти са описани асиметрично изявени криловидни лопатки, както и лумбална хиперлордоза. При двама от пациентите (№2 и №1) се наблюдава и сколиоза. Стойностите на КФК и при тримата пациенти са в

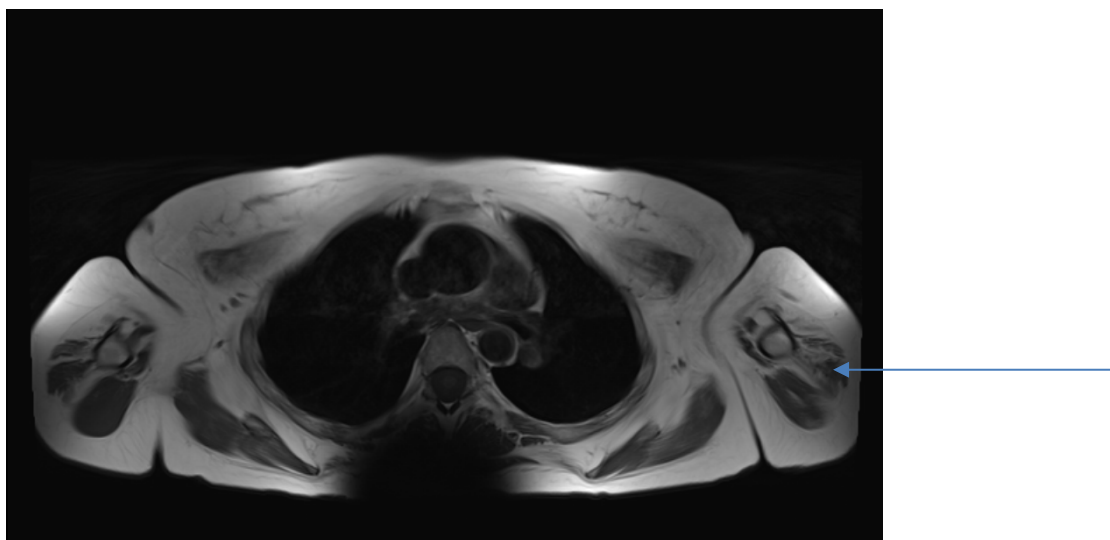
норма при неколкократни проследявания, което е характерна находка за заболяването. При пациентите в проучването не са наблюдавани сърдечно и дихателно засягане. От проведената образна диагностика на пациентите се установява характерната за заболяването находка- модел „отвътре навън“ мастна дегенерация на мускулите (фигура 25). Описан е при всички пациенти докладвани в литературата.

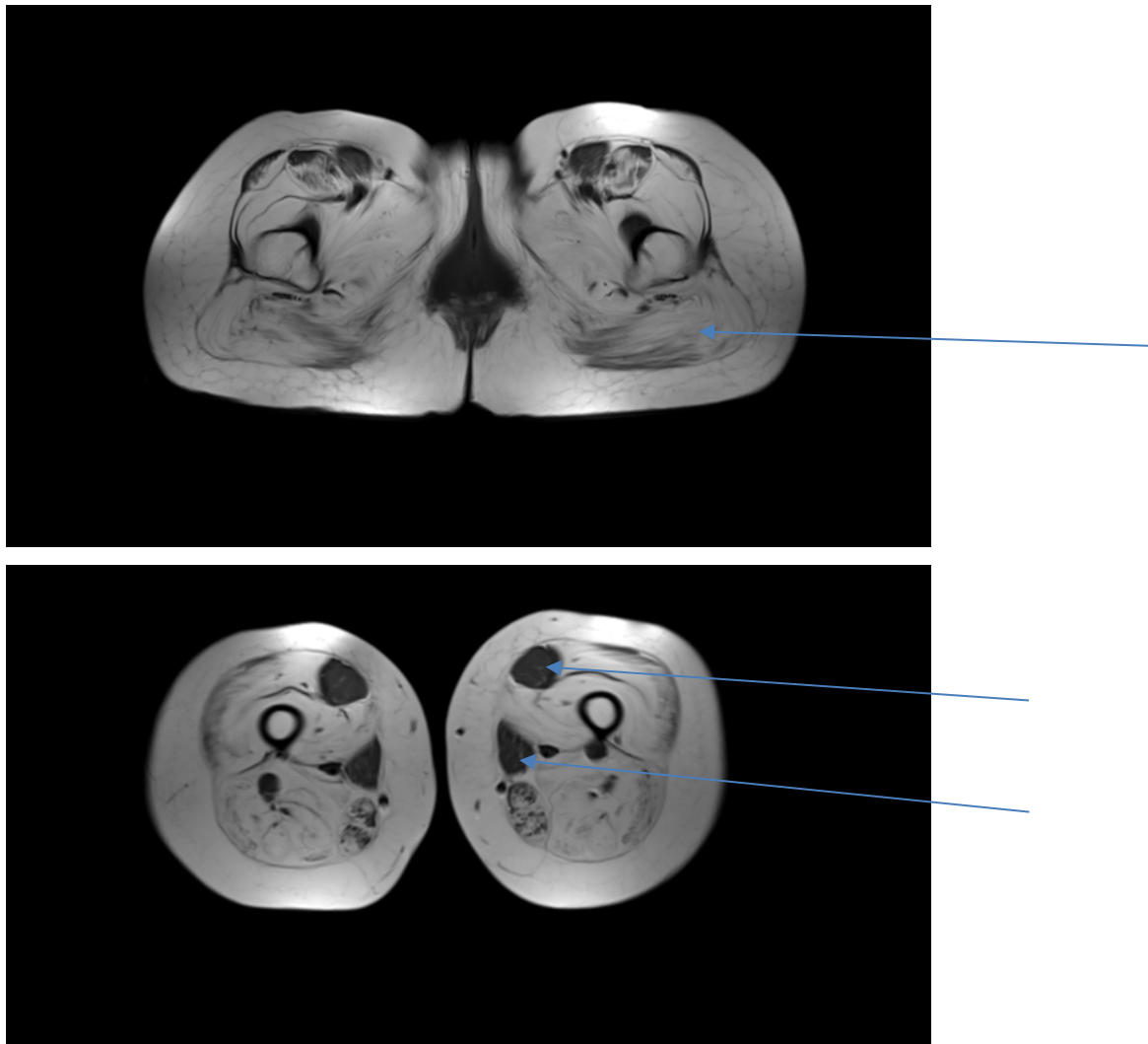


Фигура 25. Пациент № 1 МРТ на мускули на тазов пояс и бедрена мускулатура с данни за атрофия и мастна дегенерация на вътрешните части на мускулите на бедрата при относителна съхраненост на външните.



Фигура 26. Пациент № 2 Наблюдава се по-лека изразеност на замяната на мускулна тъкан с мастна, следваща същия модел на мускулно засягане.





Фигура 27. Пациент № 3. МРТ на мускули на тазов и раменен пояс и бедрена мускулатура. Тежко изразени промени на заместване на мускулна тъка с мастна, в по-малка степен в раменен пояс.

Забележимо е, че при пациент №1 и пациент № 3, които са с по-ранно начало на оплакванията, дистрофичният процес е по-напреднал. Наблюдава се симетрична мастна дегенерация на повечето мускули в тазовия пояс и бедрената мускулатура. Значително запазени се виждат *m. rectus femoris*, *m. sartorius*, в по-малка степен *m. gracilis* и при двете пациентки. Медиалните частни на *m. gluteus maximus* относително по-слабо засегнати, в сравнение с останалите наблюдавани мускули (Фигури 23 и 27). От МРТ изследване на раменния пояс на пациент № 3. се наблюдава симетрична мастна дегенерация на *m. deltoideus* (Фигура 27).

Този специален модел на частична дегенерация на мускулите, започвайки от вътрешните сегменти, включва *m. vastus lateralis, medialis, intermedius*, задната част на бедрото и коремните мускули. По-изявен по време на началните етапи на заболяването, но може да бъде наблюдаван в *m. vastus lateralis* дори и в крайните етапи. Мускулите на подбедрицата са по-запазени от мускулите на бедрото, дори когато бедрото се наблюдава напреднала дегенерация.

Обсъждане:

ПКМД 2Z/R21 е рядка форма на ПКМД в световен мащаб. Описана е кохорта от 15 пациенти с ПКМД с различни мутации в *POGLUT1*. Тази форма споделя много общи характеристики с другите ПКМД, но някои специфични характеристики помагат нейното отдиференциране. Пациентите показват клиничен спектър на заболяването със силно променлива възраст на начало и общ фенотип на ПКМД - начало от раждането; - начало преди 3-годишна възраст; - късно начало (от 2 до 5 декада). Първият симптом както при възрастни, така и при деца е слабост на проксималните мускули на долните крайници. Бедрените мускули са най-тежко засегнатите мускули по време на хода на заболяването при всички пациенти. Криловидни лопатки са налични при почти всички пациенти, Респираторното засягане не е обичайно, въпреки че може да се появи в по-късните етапи на заболяването. Описаният в литеатурата случай с начало при раждане се представя с подобно разпределение на мускулната слабост с по-бърза прогресия и по-тежко ангажиране на мускулите. Те демонстрират някои допълнителни характеристики, които не се наблюдават при възрастните форми, като засягане на лицето, птоза и леки контрактури. Не е описана значима интра- или междугамилна вариабилност на клиничните характеристики в групата с начало в зряла възраст. Най-значимата вариабилност сред цялата кохорта се наблюдава във възрастта на началото, варираща от първото до петото десетилетие. Друга важна диагностична характеристика са нормалните стойности на КФК, което може да служи като насочващ белег, в сравнение с други AP форми на ПКМД, повечето от които са със силно повишени стойности на КФК. [Morilla E и съавт., 2020]

Най-забележителната характеристика, свързана с мутациите на *POGLUT1*, е образната диагностика на мускули, особено на нивото на бедрата. Моделът на изобразяване на мускулите е мастна дегенерация с характеристика "отвътре навън", тъй като най-засегнатият сегмент е вътрешната част на всеки мускул в предната и

задната част на бедрото. Това може да се използва като ключова стъпка за диагностиката на тази форма на ПКМД. Българските пациенти с ПКМД 2Z/R21 следват фенотипа, описан при останалите пациенти до сега. Наблюдавана е характерната находка от МРТ изследването на мускули, която може да бъде определена като патогномоничен белег на заболяването. Установена е интрафамилна вариабилност на клиничния ход- един от тримата пациенти (№2) е с по-късно начало и по-бавна прогресия на заболяването, което също е наблюдавано и в други засегнати семейства. Предвид малкия брой на пациентите в световен мащаб, тепърва предстои натрупване на информация за тази форма на ПКМД, за да бъдат оформени хипотези за фенотип-генотип корелации.

4.1.5. Аноктаминопатия

В България е доказан 1 пациент с ПКМД 2L/ R12 anoctamin5- свързана. Генетичното изследване е осъществено по проект MyoSeq. Установена е двойно хетерозиготно носителство на делеция с.1520delT/ p.Phe507SerfsTer6* и с.1180+6T>C в *ANO5* гена. Делецията с.1520delT/ p.Phe507SerfsTer6* е описана при гръцки пациенти с аноктаминопатия, с фенотип вариращ от повишени стойности на КФК без миопатия до такива с прогресираща проксимална мускулна слабост [Svingou M и съавт., 2019] с.1180+6T>C мутацията е описана при пациент с ромски етнос, причиняваща изключване на екзон 12. Клиничният фенотип на пациента е с уморяемост и чести мускулни крампи след физическо натоварване от 28 г.в, на 45 г в без отклонения от неврологичния преглед. Установени са силно повишени стойности на КФК, ЕМГ характеристика на миопатия, МРТ промени от мускулите на долни крайници на 44 г.в. [Mavillard F и съавт., 2021].

Пациентът по време на първоначалния преглед е бил на 49 г.в. Начало на заболяването е от 35 г. в, когато по повод на опресия в гърдите са установени инцидентно повишени стойности на СРК над 1000. Впоследствие се добавила проксимална и по-лека дистална слабост в мускулите на долните крайници, която пациентът свързвал с проблемите с левия си крак (След преживяна катастрофа в юношеска възраст и след операция по повод фрактура на ляв крак е със скъсяване на същия с около 5 см.). Затруднило се стъпването на пети. От 41 г.в. не може да се изравя сам от клекнало

положение. От 42-43 г.в. проксималната слабост в долните крайници станала по-изразена и започнал да пада често. Проксималните мускули на долните крайници постепенно изтънели. Добавила се и проксимална слабост в горните крайници от около 43 г.в. Гореописаната слабост, по-изразена за проксималните мускули на четирите крайника, бавно прогресира във времето.

От неврологичния статус е с Миопатен синдром по-изразен за проксимални мускули на четирите крайника: Генерализирана мускулна хипотония; СР-отслабени стилорадиални, бицепсови и трицепсови и липсващи коленни и Ахилови рефлексии; Походка миопатна, клатушкащо се-степажна (по-изразен степаж за ляв крак); Невъзможно самостоятелно изправяне от клекнало положение; Хипотрофии на мишници, глутеална мускулатура, бедрена мускулатура; Торакална кифосколиоза; Леко набелязани псевдохипертрофии на подбедриците (таблица 9).

Таблица 9. Сравняване на мускулната слабост при пациента с ММТ (MRC scale).

		2014	2017
1	Флексия в шия	4/5	4/5
2	Екстензия в шия	4-/5	4-/5
3	Абдукция в раменни стави	4-/5	4-/5
4	Флексия, аддукция в раменна става	4/5	4-/5
5	Флексия и екстензия в лакътна става	4/5	Флексия Д 3+/5; Л 4-/5 Екстензия в лакътна става 4-/5
6	Флексия, екстензия в киткови стави	5/5	5-/5
7	Флексия и абдукция в ТЗБС	4-/5	4-/5
8	Екстензия и аддукция	4/5	Абдукция 4+/5 Аддукция Д 3+/5, Л 4-/5
9	Флексия и екстензия в колянна става	4/5	Флексия 4-/5 Екстензия 4/5 в колянна става
10	Плантарна флексия	5-/5	5-/5
11	Дорзална флексия	4/5 в ляво	4-/5

От проведените изследвания се установяват повишени стойности на КФК (измерени в IU- норма 20 до 200) 01.2014 г.- 1658; 03. 2014- 3079; 2017- 1947.

При двукратно (2014 г. и 2017г.) електромиографско изследване се установяват ЕМГ данни за миогенна увреда в горни и долни крайници. Единични фасцикулации, множество фибрилации и странни залпове от.м. тибалис ант.

Дихателната функция е била с леко изразено рестриктивен тип вентилаторно нарушение със стойности от ФИД:

- (2014) FVC 67%, FEV1 79 %.
- (2017) FVC 82%, FEV 1 68%.

Сърдечната функция е оценена с ЕхоКГ :

(2014г.) ФИ= 68%. Нормални размери, систолна функция и кинетика.

(2017г.) ФИ= 60%. ляво предсърдие 36мм, ЛП площ 15мм², Ао корен 32мм, ЛК: ДРЛК 48мм, СРЛК 33мм, ФС 32%, ТДО 128мл, ТСО 36мл, ФИ 60%, септум 12мм, ЗСЛК 12мм. Заключение: Нормални размери на сърдечни кухини, лекостепенна хипертрофия на миокарда на ЛК с диастолна дисфункция на ЛК. Без ДК обременяване. Преди генетичното поставяне на диагнозата, пациентът е бил изследван за възпалителна миопатия (миозитен панел антитела), Болест на Помпе, ПМД тип Бекер, калпаинопатия и телетонинопатия, които резултати са били негативни.

Обсъждане:

Въпреки, че в световен мащаб това е много често срещана форма на ПКМД, в българската популация е диагностициран само 1 пациент с аноктаминопатия. Изследваният пациент е носител на две мутации, които до сега не са били описвани в литературата в двойно хетерозиготство. Клиничната картина следва основните характеристики на заболяването с асиметрично мускулно засягане, началото на заболяването в зряла възраст и запазването на самостоятелна походка в късна възраст. Наблюдавано е и начало на заболяването с установени случайно повишени стойности на КФК, умора и нарушен толеранс към физическо натоварване. От сравнителната таблица на стойностите от ММТ не се наблюдава значителна прогресия при проследяване на пациента, което корелира с доброкачествения ход на заболяването, описан в литературата. От биохимичните изследвания е с повишени стойности на КФК 5 до 15 пъти над нормата. Описано е леко изразена рестриктивен тип дихателна слабост, която не е споменавана като характерна за заболяването. Установено е сърдечно засягане с лека ЛК диастолна дисфункция и спадане на ФИ на 60% при проследяване за пациента. Поради малката бройка на пациентите, няма как да установим дали са налични полово-обусловени разлики във фенотипа, което е отличителна черта на заболяването.

Предвид изразената интрафамилна вариабилност на заболяването описана при носителите на гореспомената мутация и липсата на данни от повече пациенти, генотип-фенотип корелации трудно могат да бъдат установени.

5. ИЗВОДИ

1. Пояс-крайник мускулната дистрофия в България е генетично и клинично хетерогенна.
2. Автозомно- рецесивните пояс-крайник прогресивни мускулни дистрофии са значително по-чести в България, отколкото автозомно- доминантните форми.
3. Въпреки че АР калпаинопатия е най-честата в световен мащаб, в българската популация най-честа е гамасаркогликанопатия.
4. Най-честата мутация при пациентите с калпаинопатия е с.550delA, която е най-честа в европейската популация.
5. Телетонинопатията е най-разпространена сред затворената религиозна общност на българомохамеданите в Смолянска област
6. Гасаркогликанопатията в България се среща само сред роми мюсюлмани – милет, главно в Източна България.
7. Въпреки, че ПКМД 2Z е рядка форма в световен мащаб, трябва да се има предвид при пациенти с пояс-крайник мускулна слабост характерната находка от на засягане на мускулите „отвътре навън“ от МРТ изследването.
8. Сърдечно засягане е наблюдавано сравнително рядко при пациентите с всички форми на ПКМД в българската популация, но това не отменя необходимостта от ежегодно проследяване на сърдечната функция.
9. Дихателна слабост се наблюдава при пациентите с гамасаркогликанопатия и по-рядко с калпаинопатия, което затвърждава необходимостта от редовно проследяване на дихателната функция.
10. Образната диагностика с МРТ на мускули е неинвазивен метод, който допълва диагностиката на мускулните заболявания, поради типичните специфики при някои от формите и може да се използва за насочване към конкретна диагноза, както и установяване на мускулно засягане в предклиничен стадий на заболяването.

11. Новите методи за генетични изследвания (WES, NGS) са методи на избор на изследване на неясни случаи на миопатия и пациенти с атипично протичане, като те разширяват генотипния и фенотипния спектър на невромускулните заболявания и в частност ПКМД.

6. ПРИНОСИ

Научно-теоретични:

1. За първи път у нас е проведено цялостно клиничко-генетично проучване на пациентите с ПКМД, като са анализирани генотип-фенотип корелации на базата на проведените клинични, образни и генетични методи.
2. Установена е нова форма на ПКМД 2Z, обусловена от мутация pR98W(p.Arg98Trp) в хомозиготно състояние в *POGLUT1*, която разширява генотипния спектър на тази група от заболявания.
3. Описано е семейство с автозомно-рецесивна калпаинопатия, причинена от нова мутация в *CAPN3* гена, демонстриращо атипичен клиничен фенотип.
4. Описано е семейство с автозомно-доминантна калпаинопатия, демонстриращо разпространението на тази иначе рядко описвана форма.
5. Установени са етнически и религиозни специфики в разпространението на ПКМД.

Приложни:

1. За пръв път в страната е събрана база данни за всички пациенти с ПКМД с информация, която може да бъде използвана при евентуални бъдещи възможности за провеждане на етиологично или патогенетично лечение.
2. Установено е значението на магнитно-резонансното изследване на мускули като възможност за улесняване на и по-бързо и точно насочване към генетична верификация на ПКМД. През последните години МРТ на мускулите е възприето като ключова стъпка в диагностиката и проследяването на няколко мускулни заболявания, тъй като може да идентифицира специфични модели на мускулно засягане, които са полезни при диференциалния диагностичен подход.

7. ЛИТЕРАТУРА:

1. Божинов С., Гълъбов Г. и сътр. Миопатии. Клинично, биохимично, хистологично, хистохимично и електронномикроскопско изследване. Медицина и физкултура 1973: 24с.
2. Георгиева Б, Тодорова А, Петрова И, Търнев И, Кременски И, Митев В. Муслкулна дистрофия пояс-крайник тип 2А (LGMD2А, калпаинопатия). Българска неврология, 2006, бр. 2, том 6, 73-78.
3. Национален консенсус за диагностика, лечение и профилактика на наследствените невромускулни заболявания, Българска неврология, Vol. 22 No. S2 (2021)
4. Търнев И. Клинико- генетично и епидемиологично проучване на шест новооткрити наследствени невромускулни заболявания сред ромите в България. Докторска дисертация, София, 2000.
5. Танева А, Чамова Т, Бичев С, Тодоров М, Господинова М, Кастрева К, Златарева, Д, Крупев М, Хаджииванов Р, В. Гергелчева, Л. Грозданова, Д. Цонева, А. Хюбнер, М. В. дер Хаген, Б. Шосер, Х. Лохмюлер, А. Тодорова, И. Търнев. Пояс- крайник мускулна дистрофия 2G в религиозно малцинство на българо- мохамедани, хомозиготи по мутация с.75G> А, р.Trp 25х. Българска неврология 2019; 2:71-76.
6. Чамова Т, Райчева М, Търнев И. Дистрофинопатии- генотип-фенотипни корелации, когнитивни нарушения и диагностика при прогресивните мускулна дистрофии тип Дюшен и Бекер. Българска неврология. 2009; 9 (4): 155-161.
7. Akasaka-Manyu K, Manyu H, Nakajima A, Kawakita M, Endo T. Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2. J Biol Chem 2006;281:19339e45.
8. Alhamidi M. et al. Limb girdle muscular dystrophy type 2I: No correlation between clinical severity, histopathology and glycosylated alpha-dystroglycan levels in patients homozygous for common FKRP mutation. Neuromuscul.Disord. 27,619–626 (2017).

9. Allamand V, Broux O, Bourg N et al. Genetic heterogeneity of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a genetic isolate (Amish) and evidence for a new locus. *Hum Mol Genet* 1995; 4 (3): 459–463.
10. Amato, A. & Brown, R. Jr. Dysferlinopathies. *Handb. Clin. Neurol.* 101, 111-118 2011
11. Anderson L, Davison K, Moss J, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 1999; 8:855–61.
12. Andra K., Lassmann, H., Bittner, R., Shorny, S., Faessler, R., Propst, F., and Wiche, G. (1997). Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev.* 11, 3143–3156.
13. Andra, K, Kornacker I, Joergl A et al. (2003). Plectin-isoform- specific rescue of hemidesmosomal defects in plectin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 120, 189–197.
14. Andreeva V et al. Whole exome sequencing links dental tumor to an autosomal-dominant mutation in ANO5 gene associated with gnathodiaphyseal dysplasia and muscle dystrophies. *Sci Rep.* 6, 26440, (2016).
15. Angelini C, Fanin M, Menegazzo E, Freda M et al. Homozygous alpha-sarcoglycan mutation in two siblings: one asymptomatic and one steroid-responsive mild limb-girdle muscular dystrophy patient. *Muscle Nerve.* 1998 Jun; 21(6):769-75.
16. Angelini C, Fanin M. Calpainopathy. In: Adam MP, Ardinger H, Pagon R, et al., editors. *Gene Reviews.* Seattle, WA: University of Washington (2017) 1–30.
17. Angelini C, L. Nardetto C. Borsato, R. Padoan, M. Fanin, A. C. Nascimbeni & E. Tasca (2010) The clinical course of calpainopathy (LGMD2A) and dysferlinopathy (LGMD2B), *Neurological Research*, 32:1, 41-46.
18. Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to
19. Argov Z, Sadeh M, Mazor K, et al. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features. *Brain* 2000;123(Pt 6):1229–37.
20. Azibi K, Bachner L, Beckmann J, et al. Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12. *Hum Molec Genet* 1993; 2:1423-8

21. Baghdiguian S, Martin M, Richard I et al: Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 1999; 5: 503 – 511.
22. Balci B, Uyanik G, Dincer P, Gross C, Willer T, Talim B et al. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscul Disord.* 2005; 15 (4):271–5.
23. Balcin H et al., Late-onset limb-girdle muscular dystrophy caused by GMPPB mutations, *Neuromuscular Disorders* (2017).
24. Bansal D, Miyake K, Vogel S, Groh S, Chen CC, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature.* 2003 May 8;423(6936):168-72.
25. Banwell, B, Russel J, Fukudome T et al. (1999). Myopathy, myasthenic syndrome, and epidermolysis bullosa simplex due to plectin deficiency. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 832–846.
26. Baranello G, Saredi S, Sansanelli S, Savadori P, Canioni E, Chiapparini L, et al. A novel homozygous ISPD gene mutation causing phenotype variability in a consanguineous family. *Neuromuscul Disord.* 2015; 25:55–9.
27. Barp, A., Laforet, P., Bello, L. Tasca G., Vissing J., Monforte M., Ricci E, Choumert A., Stojkovic T, Malfatti E, Pegoraro E et al. European muscle MRI study in limb girdle muscular dystrophy type R1/2A (LGMDR1/LGMD2A). *J Neurol* 267, 45–56 (2020).
28. Barresi R, Campbell K. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci* 2006; 119: 199–207.
29. Barresi R, Di Blasi C, Negri T, et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet* 2000; 37:102-7
30. Barresi, R., Campbell, K. P. Dystroglycan: From biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 2): 199-207.
31. Bashir R, Britton S, Strachan T, et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1998; 20:37–42.

32. Bashir R, Strachan T, Keers, S et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Human Molec Genet* 1994; 3: 455-457.
33. Beckmann J S, Richard I, Hillaire D et al. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci Paris* 1991; 312: 141-148.
34. Beeson D. Congenital myasthenic syndromes: recent advances. *Curr Opin Neurol* 2016; 29:565–571.
35. Belaya K, Rodríguez Cruz P, Liu W, Maxwell S, McGowan S, Farrugia ME, et al. Mutations in GMPPB cause congenital myasthenic syndrome and bridge myasthenic disorders with dystroglycanopathies. *Brain* 2015; 138:2493–504.
36. Bello L, Melacini P, Pezzani R. et al. Cardiomyopathy in patients with POMT1-related congenital and limb-girdle muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet* 20, 1234–1239 (2012).
37. Ben Hamida M, Fardeau M, Attia N. Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle Nerve* 1983; 6:469-80.
38. Ben Hamida M, Marrakchi D. Dystrophie musculaire progressive de type Duchenne en Tunisie. A propos de 13 familles et 31 cas d'une forme en apparence recessive autosomique. *J Genet Hum* 1980; 28:1-9 * (First clinical description of sarcoglycanopathy)
39. Ben Jelloun-Dellagi S, Chaffey P, Hentati, et al. Presence of normal dystrophin in Tunisian severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 1990; 40:1903
40. Ben Othmane K, Ben Hamida M, Pericak-Vance MA, et al. Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet* 1992;2:315-7
41. Ben Othmane K, Speer MC, Stauffer J, et al. Evidence for linkage disequilibrium in chromosome 13-linked Duchenne-like muscular dystrophy (LGMD2C). *Am J Hum Genet* 1995; 57:732-4
42. Berardo A, Lornage X, Johari M, et al. HNRHNPDL-related muscular dystrophy: expanding the clinical morphological and MRI phenotypes. *J Neurol* 2019; 266:2524-34.

43. Bharucha-Goebel D, Neil E, Donkervoort S, Dastgir J, Wiggs E, Winder T et al. Intrafamilial variability in GMPPB-associated dystroglycanopathy: broadening of the phenotype. *Neurology* 2015;84: 1495–7.
44. Bjornson C, Cheung T, Liu L, Tripathi P, Steeper K, Rando T. (2012) Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells* 30:232–242.
45. Bögershausen N, Shahrzad N, Chong J, et al. Recessive TRAPPC11 mutations cause a disease spectrum of limb girdle muscular dystrophy and myopathy with movement disorder and intellectual disability. *Am J Hum Genet.* 2013;93(1):181-190.
46. Bolduc V, Marlow G, Boycott K , et al. Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am J Hum Genet* 2010; 86:213–21.
47. Bolling M, Pas H, de Visser M , et al. (2010). PLEC1 mutations underlie adult-onset dilated cardiomyopathy in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J. Invest. Dermatol.* 130, 1178– 1181.
48. Bönnemann C, Bushby K. The limb-girdle muscular dystrophies. In: Engel, AG.; Franzini- Armstrong, A., editors. *Myology*. 3rd. McGraw-Hill; 2004. p. 1077-1121.
49. Bönnemann C, Wang C, Quijano-Roy S, Deconinck N, Bertini E, Ferreiro A, et al. Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2014; 24:289–311.
50. Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol.* 1999; 112:411–418.
51. Bos J, Poley R, Ny M, et al. Genotype–phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol Genet Metab* 2006; 88:78–85. [PubMed: 16352453]
52. Bouchet-Seraphin C, Vuillaumier- Barrot S, Seta N. Dystroglycanopathies: about numerous genes involved in glycosylation of one single glycoprotein. *J Neuromuscular Disorders* 2015; 2:27–38.
53. Bourteel H, Vermersch P, Cuisset JM, et al. Clinical and mutational spectrum of limb-girdle muscular dystrophy type 2I in 11 French patients. *J Neurol Neuro- surg Psychiatry* 2009; 80:1405–8.

54. Brenman J, Chao D, Xia H, Aldape K, Brecht D. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995; 82:743-52
55. Brockington M, Blake D, Prandini P, et al. Mutations in the Fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin $\alpha 2$ deficiency and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2001; 69:1198–209.
56. Brockington M, Yuva Y, Prandini P, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2851–2859.
57. Brohl D, Vasyutina E, Czajkowski M, Griger J, Rassek C, Rahn H et al (2012) Colonization of the satellite cell niche by skeletal muscle progenitor cells depends on Notch signals. *Dev Cell* 23:469–481.
58. Brummer D, Walter M, Palmbach M et al. Long-term MRI and clinical follow-up of symptomatic and Muscle imaging in primary dysferlinopathies presymptomatic carriers of dysferlin gene mutations. *Acta Myol* 2005; 24:6–16.
59. Bushby K, Beckmann JS. The limb-girdle muscular dystrophies—proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord* 1995; 5:337–343.
60. Bushby K. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: Report of the ENMC consortium on limb-girdle dystrophies. 1995. *Neuromuscular Disorders*, 5(1), 71–74.
61. Bushby K. Report on the 12th ENMC Sponsored International Workshop — The “Limb-Girdle” Muscular Dystrophies. *Neuromuscular Disorders*. 1992;2(1):3-5.
62. Bushby K, Norwood F, Straub V, The limb-girdle muscular dystrophies—Diagnostic strategies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1772, Issue 2, 2007, Pages 238-242, ISSN 0925-4439,
63. Cabrera-Serrano M, Ghaoui R, Ravenscroft G, Johnsen RD, Davis MR, Corbett A, et al. Expanding the phenotype of GMPPB mutations. *Brain* 2015; 138:836–44.
64. Cacciottolo M, Numitone G, Aurino S, et al. Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations. *Eur J Hum Genet* 2011; 19:974–80.

65. Calvo F, Teijeira S, Fernandez JM, et al. Evaluation of heart involvement in γ -sarcoglycanopathy (LGMD2C). A study of ten patients. *Neuromusc Disord* 2000; 10:560-6
66. Carafoli E, Molinari M: Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 193 – 203.
67. Carmignac V, Salih MA, Quijano-Roy S, Marchand S, Al Rayess MM, Mukhtar MM, et al. C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* 2007; 61:340–51.
68. Carss KJ, Stevens E, Foley AR, Cirak S, Riemersma M, Torelli S, et al. Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of α -dystroglycan. *Am J Hum Genet.* 2013; 93:29–41.
69. Cerino M, Bartoli M, Riccardi F, Le Goanvic B, Blanck V, Salvi A, Lévy N, Krahn M, Choumert A. Autosomal dominant segregation of CAPN3 c.598_612del15 associated with a mild form of calpainopathy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020 Dec;7(12):2538-2540. doi: 10.1002/acn3.51193. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33107701; PMCID: PMC7732236.
70. Cetin N, Balci-Hayta B, Gundesli H, Korkusuz P, Purali N, Talim B, et al. A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb- girdle muscular dystrophy: distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. *J Med Genet* 2013; 50:437–443.
71. Ceyhan-Birsoy O, Agrawal PB, Hidalgo C, Schmitz-Abe K, DeChene ET, Swanson LC, et al. Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology* 2013;8:1205–14.
72. Ceyhan-Birsoy O, Talim B, Swanson LC, et al. Whole exome sequencing reveals DYSF, FKTN, and ISPD mutations in congenital muscular dystrophy without brain or eye involvement. *J Neuromuscul Dis* 2015;2:87–92.
73. Chae J, Minami N, Jin Y, Nakagawa M, Murayama K, Igarashi F, Nonaka I. Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb- girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2001;11:547–55.

74. Chan SH, Foley AR, Phadke R, Mathew AA, Pitt M, Sewry C, et al. Limb girdle muscular dystrophy due to LAMA2 mutations: diagnostic difficulties due to associated peripheral neuropathy. *Neuromuscul Disord* 2014; 24:677–683.
75. Chardon JW, Smith AC, Woulfe J, Pena E, Rakhra K, Dennie C, et al. LIMS2 mutations are associated with a novel muscular dystrophy, severe cardiomyopathy and triangular tongues. *Clinical Genetics*. 2015.
76. Charton K, Daniele N, Vihola A, et al. Removal of the calpain 3 protease reverses the myopathology in a mouse model for titinopathies. *Hum Mol Genet*. 2010;19:4608–4624.
77. Chauveau C, Bonnemann CG, Julien C, Kho AL, Marks H, Talim B, et al. Recessive TTN truncating mutations define novel forms of core myopathy with heart disease. *HumMol Genet* 2014;23:980–91.
78. Chu, M.L., Moran, E. The Limb–Girdle Muscular Dystrophies: Is Treatment on the Horizon? *Neurotherapeutics* 15, 849–862 (2018).
79. Chuang JZ, et al. Characterization of a brain-enriched chaperone, MRJ, that inhibits Huntingtin aggregation and toxicity independently. *J Biol Chem*. 2002; 277:19831–19838.
80. Cirak S, Foley AR, Herrmann R, Willer T, Yau S, Stevens E, et al. ISPD gene mutations are a common cause of congenital and limb-girdle muscular dystrophies. *Brain*. 2013; 136:269–81.
81. Clement E M, Godfrey C, Tan J, et al. Mild POMGnT1 Mutations Underlie a Novel Limb-Girdle Muscular Dystrophy Variant. *Arch Neurol*. 2008;65(1):137–141.
82. Clement E, Mercuri E, Godfrey C, Smith J, Robb S, Kinali M, et al. Brain involvement in muscular dystrophies with defective dystroglycan glycosylation. *Ann Neurol*. 2008;64(5):573–82.
83. Clement EM, Feng L, Mein R, Sewry CA, Robb SA, Manzur AY, et al. Relative frequency of congenital muscular dystrophy subtypes: analysis of the UK diagnostic service 2001–2008. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(6):522–7.
84. Coral-Vasquez R, Cohn RD, Moore SA, et al. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in

85. Cormand B, Pihko H, Bayés M, Valanne L, Santavuori P, Talim B, et al. Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle- eye-brain disease. *Neurology*. 2001;56(8):1059–69.
86. Corrado Angelini & Marina Fanin (2016): Pathogenesis, clinical features and diagnosis of sarcoglycanopathies, *Expert Opinion on Orphan Drugs*.
87. Costamagna D, Costelli P, Sampaolesi M, Penna F. Role of inflammation in muscle homeostasis and myogenesis. *Mediat Inflamm* 2015; 2015:805172.
88. Couthouis J, Raphael A, Siskind C, et al. Exome sequencing identifies a DNAJB6 mutation in a family with dominantly- inherited limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2014; 24: 431-435.
89. Crosbie R, Lebakken C, Holt K et al. Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol* 1999; 145:153-65
90. Cupler E, Bohlega S, Hessler R, Mclean D, Stigsby B, Ahmad J. Miyoshi myopathy in Saudi Arabia: clinical, electrophysiological, histopathological and radiological features. *Neuromuscul Disord* 1998; 8:321–6.
91. Dai YS, Xu J, Molkentin J. The DnaJ-related factor Mrj interacts with nuclear factor of activated T cells c3 and mediates transcriptional repression through class II histone deacetylase recruitment. *Mol Cell Biol*. 2005; 25:9936–9948.
92. Dargelos E, Poussard S, Brule C, Daury L, Cottin P. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: A possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie* 2008, 90, 359–368.
93. de Beltrán-Valero B, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, et al. Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet*. 2002;71(5):1033–43.
94. de Bernabe DB, van Bokhoven H, van Beusekom E, et al. A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker–Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet* 2003; 40:845–8.
95. de Paula F, Vainzof M, Passos-Bueno M et al. Clinical variability in calpainopathy: what makes the difference? *Eur J Hum Genet*. 2002 Dec 10(12): 825-32.

96. de Seze J, Udd B, Haravouri H, Sablonnière B, Maurage CA, Hurtevent JF, et al. The first European family with tibial muscular dystrophy outside the Finnish population. *Neurology* 1998; 51:1746–8.
97. Dedieu S, Poussard S, Mazères G, Grise F et al. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp. Cell Res.* 2004, 292, 187–200.
98. DeRossi C, Vacaru A, Rafiq R, et al. Trappc11 is required for protein glycosylation in zebrafish and humans. *Molecular Biology of the Cell (MBoC)* 2016;27(8):1220–1234.
99. Devisme L, Bouchet C, Gonzalès M, Alanio E, Bazin A, Bessières B, et al. Cobblestone lissencephaly: neuropathological subtypes and correlations with genes of dystroglycanopathies. *Brain.* 2012;135(2):469–82.
100. Di Costanzo S, Balasubramanian A, Pond HL, Rozkalne A, Pantaleoni C, Saredi S, et al. POMK mutations disrupt muscle development leading to a spectrum of neuromuscular presentations. *Hum Mol Genet* 2014; 23:5781–5792.
101. Dinçer P, Balci B, et al. A novel form of recessive limb girdle muscular dystrophy with mental retardation and abnormal expression of alpha-dystroglycan. *Neuromuscular disorders: Band 13, Nummer 10, Dezember 2003, S. 771–778, ISSN 0960-8966.*
102. Dincer P, Balci B, Yuva Y, et al. A novel form of recessive limb girdle muscular dystrophy with mental retardation and abnormal expression of alpha-dystroglycan. *Neuromuscul Disord* 2003; 13:771–8.
103. Dinçer P, Leturcq F, Richard I, Piccolo F, Yalnizoğlu D, De Toma et al. A biochemical, genetic, and clinical survey of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies in Turkey. *Ann. Neurol.* 1997, 42, 222–229.
104. Ding J, Zhao D, Du R, Zhang Y, Yang H, Liu J, et al. Clinical and molecular genetic analysis of a family with late-onset LAMA2-related muscular dystrophy. *Brain Dev* 2016; 38:242–249.
105. Dobyns W, Pagon R, Armstrong D, Curry C, Greenberg F, Grix A, et al. Diagnostic criteria for Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet.* 1989; 32(2):195–210.

106. Donner K, M. Ollikainen, M. Gro" nholm, O. et al. Mutations in the beta-tropomyosin (TPM2) gene in rare cases of autosomal dominant nemaline myopathy, *Neuromuscul. Disord.* 10 (2000) 342–343.
107. Draviam R, Shand S, Watkins S. The β - δ -core of sarcoglycan is essential for deposition at the plasma membrane. *Muscle Nerve* 2006; 34:691-71
108. Durbeej M, Henry M., Campbell P. Dystroglycan in development and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10(5): 594-601.
109. Durbeej M, Cohn R, Hrstka R, et al. Disruption of the β -sarcoglycan gene reveals pathogenetic muscular dystrophy in β -sarcoglycan deficient mice. *Hum Molec Genet* 1999; 8:1589-98
110. Durrenberger PF, et al. DnaJB6 is present in the core of Lewy bodies and is highly upregulated in parkinsonian astrocytes. *J Neurosci Res.* 2009; 87:238–245
111. el Kerch F, Sefiani A, Azibi K, et al Linkage analysis of families with severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy in Morocco indicates genetic homogeneity of the disease in north Africa. *Journal of Medical Genetics* 1994; 31:342-343.
112. Elliott CE, Becker B, Oehler S, Castanon MJ, Hauptmann R, Wiche G. Plectin transcript diversity: identification and tissue distribution of variants with distinct first coding exons and rodless isoforms. *Genomics* 1997; 42:115–125.
113. Endo Y, Dong M, Noguchi S, Ogawa M, Hayashi Y et al. Milder forms of muscular dystrophy associated with POMGNT2 mutations. *Neurol Genet* 2015; 1: e33.
114. Ermolova N, Kramerova I, Spencer MJ. Autolytic activation of calpain 3 proteinase is facilitated by calmodulin protein. *J Biol Chem.* 2015 Jan 9;290(2):996-1004.
115. Ermolova, N., Kudryashova, E., DiFranco, M., Vergara, J., Kramerova, I., and Spencer, M. J. (2011) Pathogenity of some limb girdle muscular dystrophy mutations can result from reduced anchorage to myofibrils and altered stability of calpain 3. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3331–3345
116. Ervasti, J. M., Campbell, K. P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.* 1991; 66(6): 1121- 1131.

117. Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. ϵ -sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* 1997;272:32534-32538
118. Evilä A, Vihola A, Sarparanta J, Raheem O, Palmio J, Sandell S, et al. Atypical phenotypes in titinopathies explained by second titin mutations. *Ann Neurol* 2014; 75:230–40.
119. Fanin M, Angelini C. Protein and genetic diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A: the yield and the pitfalls. *Muscle Nerve*. (2015) 52:163–73. doi: 10.1002/mus.24682
120. Fanin M, Benedicenti F, Fritegotto C et al. An Intronic Mutation Causes Severe LGMD2A in a Large Inbred Family Belonging to a Genetic Isolate in the Alps. *Clin. Genet*. 2012, 82, 601–602.
121. Fanin M, Fulizio L, Nascimbeni AC, et al. Molecular diagnosis in LGMD2A: Mutation analysis or protein testing? *Hum Mut* 2004; 24: 52–62
122. Fanin M, Melacini P, Boito C, et al. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. *Neuromusc Disord* 2003; 13:303-9
123. Fanin M, Nascimbeni AC, Aurino S, et al. Frequency of LGMD gene mutations in italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology* 2009; 72:1432-5
124. Fanin M, Tasca E, Nascimbeni AC, Angelini C. Sarcolemmal neuronal nitric oxide synthase defect in limb-girdle muscular dystrophy: an adverse modulating factor in the disease course? *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68:383-90
125. Fanin M., Nascimbeni A. C., Fulizio L., Trevisan C. P., Meznaric-Petrusa M., Angelini C. (2003) Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am. J. Pathol.* 163, 1929–1936
126. Fanin, M. & Angelini, C. Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy. *Muscle Nerve* 54, 821–835 (2016).
127. Fanin, M., Nascimbeni, A. C., Fulizio, L., Trevisan, C. P., Meznaric- Petrusa, M., and Angelini, C. (2003) Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am. J. Pathol.* 163, 1929 –1936
128. Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, et al. Juvenile limb- girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain* 1996;119(Pt 1):295–308.

129. Fayssoil A, Ognà A, Chaffaut C, et al. Natural history of cardiac and respiratory involvement, prognosis and predictive factors for long-term survival in adult patients with Limb Girdle muscular dystrophies type 2C and 2D. *PLoS One* 2016;11:e0153095
130. Fee D, Harmelink M, Monrad P, Pyzik E. Siblings with mutations in TRAPPC11 presenting with limb-girdle muscular dystrophy 2S. *J Clin Neuromuscul Dis* 2017;19:27–30.
131. Feng X, Luo S, Li J et al. (2018) Fatty infiltration evaluation and selective pattern characterization of lower limbs in limb-girdle muscular dystrophy type 2A by muscle magnetic resonance imaging. *Muscle Nerve* 58 (4): 536–541.
132. Fernandez-Valdivia R, Takeuchi H, Samarghandi A, Lopez M, Leonardi J, Haltiwanger RS et al (2011) Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development by the protein O-glucosyltransferase Rumi. *Development* 138:1925–1934.
133. Fichna, J.P., Macias, A., Piechota, M. et al. Whole-exome sequencing identifies novel pathogenic mutations and putative phenotype-influencing variants in Polish limb-girdle muscular dystrophy patients. *Hum. Genomics* 12, 34 (2018).
134. Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology* 2008;71(10):758–65.
135. Fischer D, Walter MC, Kesper K et al. Diagnostic value of muscle MRI in differentiating LGMD2I from other LGMDs. *J Neurol* 2005;252: 538–47.
136. Forrest, K., Mellerio, E., Robb, S et al. (2010). Congenital muscular dystrophy, myasthenic symptoms and epidermolysis bullosa simplex (EBS) associated with mutations in the PLEC1 gene encoding plectin. *Neuromuscul. Disord.* 20, 709–711.
137. Francis A, Sunitha B, Vinodh K, Polavarapu K, Katkam SK, Modi S, Bharath MM, Gayathri N, Nalini A, Thangaraj K. Novel TCAP mutation c.32C>A causing limb girdle muscular dystrophy 2G. *PLoS One.* 2014 Jul 23;9(7): e102763. doi: 10.1371/journal.pone.0102763.
138. Fuchs P, Zorer M, Rezniczek GA, Spazierer D, Oehler S, Castanon MJ, et al. Unusual 5' transcript complexity of plectin isoforms: novel tissue-specific exons modulate actin binding activity. *Hum Mol Genet* 1999; 8:2461–2472.

139. Gallardo E, Saenz A, Illa I (2011) Limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Handb Clin Neurol* 101:97–110.
140. Gamez J, Navarro C, Andreu AL, Fernandez JM, Palenzuela L, Tejeira S, et al. Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy: a large kindred with evidence for anticipation. *Neurology*. 2001 Feb;56(4):450-54
141. Garnham C. P., Hanna R. A., Chou J. S., Low K. E., Gourlay K., Campbell R. L., Beckmann J. S., Davies P. L. (2009) Limb-girdle muscular dystrophy type 2A can result from accelerated autoproteolytic inactivation of calpain 3. *Biochemistry* 48, 3457–3467
142. Geis, T., Rödl, T., Topaloğlu, H. et al. Clinical long-time course, novel mutations and genotype-phenotype correlation in a cohort of 27 families with POMT1-related disorders. *Orphanet J Rare Dis* 14, 179 (2019).
143. Georgieva B, Todorova A, Tournev I, Mitev V, Kremensky I. C283Y gamma-sarcoglycan gene mutation in the Bulgarian Roma (Gypsy) population: prevalence study and carrier screening in a high-risk community. *ClinGenet*2004;66:467–472.
144. Georgieva B, Todorova A, Tournev I, Mitev V, Plageras P, Kremensky I. 550delA mutation in the calpain 3 (CAPN3) gene: DMD/BMD, SMA, or LGMD2A--clinically misdiagnosed cases. *Am J Med Genet A*. 2005 Aug 1;136A (4):399-400.
145. Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitàs K, Sasse-Klaassen S, et al. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* 2002;30:201–4.
146. Gneocchi-Ruscione T, Taylor J, Mercuri E et al. Cardiomyopathy in duchenne, becker, and sarcoglycanopathies: a role for coronary dysfunction? *Muscle Nerve*. 1999 Nov;22(11):1549-56.
147. Godfrey C, Clement E, Mein R, Brockington M, Smith J, Talim B, et al. Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*. 2007;130:2725–35.
148. Godfrey C, Escolar D, Brockington M, et al. Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2006;60:603–10.
149. Godfrey C, Foley AR, Clement E, Muntoni F. Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr Opin GenetDev* 2011; 21: 278 - 285. An excellent overview of dystroglycanopathies based on recent studies that extend our knowledge about the

relationship between the underlying genetic defect and the resulting clinical phenotype.

150. Godfrey, C., Foley, A. R., Clement, E., Muntoni, F. Dystroglycanopathies: Coming into focus. *Curr Opin Genet Dev.* 2011; 21(3): 278-285.
151. Goll D, Thompson V, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev* 2003;83:731–801.
152. Greenberg SA, Salajegheh M, Judge D, et al. Etiology of limb girdle muscular dystrophy 1D/1E determined by laser capture microdissection proteomics. *Ann Neurol.* 2012; 71:141–145.
153. Gregorio, K. Trombita's, T. Centner, B et al. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19 kda ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 1013 – 1027.
154. Griffin DA, Johnson RW, Whitlock JM, et al. Defective membrane fusion and repair in anoctamin5-deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2016;25:1900–11.
155. Guglieri M, Magri F, D'angelo MG, et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 2008;29:258e66.
156. Gundesli H, Talim B, Korkusuz P, et al. Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2010 Dec 10;87(6):834-41.
157. Hack AA, Lam MYJ, Cordier L, et al. Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci* 2000;113:2535-44
158. Hackman P, Marchand S, Sarparanta J, Vihola A, Pénişon-Besnier I, Eymard B, et al. Truncating mutations in C-terminal titin may cause more severe tibial muscular dystrophy (TMD). *Neuromuscul Disord* 2008;18:922–8.
159. Hackman P, Udd B, Bönnemann CG, Ferreiro A; Titinopathy Database Consortium. 219th ENMC International Workshop Titinopathies International database of titin mutations and phenotypes, Heemskerk, The Netherlands, 29 April-1 May 2016. *Neuromuscul Disord.* 2017 Apr;27(4):396-407.

160. Hackman P, Vihola A, Haravuori H, Marchand S, Sarparanta J, De Seze J, et al. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet.* 2002;71(3):492–500
161. Hageman J, et al. A DNAJB chaperone subfamily with HDAC-dependent activities suppresses toxic protein aggregation. *Mol Cell.* 2010; 37:355–369.
162. Haliloglu, G., Balci, B., Talim, B., Dinçer, P., & Topaloglu, H. (2006). P.P.4 06 Limb-girdle muscular dystrophy and mental retardation (LGMD2M) has a heterogeneous background. *Neuromuscular Disorders*, 16(9-10), 679–680.
163. Hanai R, Mashima K. Characterization of two isoforms of a human DnaJ homologue, Hsj2. *Mol Biol Rep.* 2003; 30:149–153.
164. Hanisch F, Grimm D, Zierz S, et al. Frequency of the FKRP mutation c.826C>A in isolated hyperCKemia and in limb girdle muscular dystrophy type 2 in German patients. *J Neurol* 2010; 257:300–1.
165. Hara Y, Balci-Hayta B., Yoshida-Moriguchi T et al. (2011). A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *The New England journal of medicine*, 364(10), 939–946.
166. Harel, T., Goldberg, Y., Shalev, S. et al. Limb-girdle muscular dystrophy 2I: phenotypic variability within a large consanguineous Bedouin family associated with a novel FKRP mutation. *Eur J Hum Genet* 12, 38–43 (2004).
167. Harms MB, Sommerville RB, Allred P, Bell S, Ma D, Cooper P, Lopate G, Pestronk A, Weihl CC, Baloh RH. Exome sequencing reveals DNAJB6 mutations in dominantly inherited myopathy. *Ann Neurol.* 2012 Mar;71(3):407-16. doi: 10.1002/ana.22683. Epub 2012 Feb 14. PMID: 22334415; PMCID: PMC3314127.
168. Harris E, McEntagart M, Topf A, Lochmuller H, Bushby K, Sewry C, et al. Clinical and neuroimaging findings in two brothers with limb girdle muscular dystrophy due to LAMA2 mutations. *Neuromuscul Disord* 2017; 27:170–174.
169. Hartzell HC, Yu K, Xiao Q, et al. Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Physiol* 2009;587(Pt 10):2127–39.
170. Harvey BM, Haltiwanger RS (2018) Regulation of Notch function by O-glycosylation. *Adv Exp Med Biol* 1066:59–78.

171. Hauser M. , Horrigan S. , Salmikangas P., Torian U., Viles K., Dancel R., Tim R., Taivainen A., Bartoloni J., James M. Gilchrist, Jeffrey M. Stajich, P. Craig Gaskell, John R. Gilbert, Jeffrey M. Vance, Margaret A. Pericak-Vance, Olli Carpen, Carol A. Westbrook and Marcy C. Speer Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A Human Molecular Genetics, 2000, Vol. 9, No. 14 2141–2147
172. Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, et al. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2004;44:2192–201.
173. Henry, M. D., Campbell, K. P. Dystroglycan: An extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol. 1996; 8(5): 625-631.
174. Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. N Engl J Med 2012;366:619
175. Heydemann A, Huber JM, Kakkar R, Wheeler MT, McNally EM. Functional nitric oxide synthase mislocalization in cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 2004;36:213Y23
176. Hicks D, Sarkozy A, Muelas N, Köehler K, Huebner A, Hudson G, Chinnery PF, Barresi R, Eagle M, Polvikoski T, Bailey G, Miller J, Radunovic A, Hughes PJ, Roberts R, Krause S, Walter MC, Laval SH, Straub V, Lochmüller H, Bushby K. A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. Brain. 2011 Jan;134(Pt 1):171-182.
177. Hicks D, Sarkozy A, Muelas N, Koehler K, Huebner A, Hudson G, et al. A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. Brain. 2011;134(Pt 1):171-82.
178. Hicks, D. et al. A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. Brain 134, 171–182 (2011).
179. Hijikata T, Murakami T, Ishikawa H, Yorifuji H. Plectin teth- ers desmin intermediate filaments onto subsarcolemmal dense plaques containing dystrophin and vinculin. Histo- chem Cell Biol 2003;119:109–123.
180. Hohenester E, Yurchenco PD. Laminins in basement membrane assembly. Cell Adh Migr 2013;7:56-63.
181. Holt KH, Campbell KP. Assembly of the sarcoglycan complex. J Biol Chem 1998;273:34667-70

182. 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;355:696–702.
183. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Milatovich, A., Ozelik, T., Yang, B., Koepnick, K., Francke, U., Campbell, K. P. Human dystroglycan: Skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet.* 1993; 2(10): 1651-1657.
184. Illa I, De Luna N, Dominguez-Perles R et al. Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology* 2007;68:1284–9.
185. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001;49:130–4. [PubMed: 11198284]
186. Ishpekova, B., Milanov, I. Differential diagnosis of limb-girdle syndromes. *Electromyography and clinical Neurophysiology*, 1996, 36, 8, 469-475
187. Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi T, Koga Y, Arimura T, Koyanagi T, et al. Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:385–93.
188. Jarmula A, Łusakowska A, Fichna J, Topolewska, M, Macias A, Johnson K, Töpf A, Straub V, Rosiak E, Szczepaniak K, Dunin-Horkawicz S, Maruszak A, Kaminska A, Redowicz J. ANO5 mutations in the Polish limb girdle muscular dystrophy patients: Effects on the protein structure.
189. Jarry J, Rioux MF, Bolduc V, et al. A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12. *Brain* 2007;130:368–80.
190. Jarry J, Rioux MF, Bolduc V, Robitaille Y, Khoury V, Thiffault I, et al. A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13- p12. *Brain.* 2007; 130(Pt 2):368-80.
191. Jensen BS, Willer T, Saade DN, Cox MO, Mozaffar T, Scavina M, et al. GMPPB-associated dystroglycanopathy: emerging common variants with phenotype correlation. *Hum Mutat* 2015;36:1159–63.

192. Jia, Z., Petrounevitch, V., Wong, A., Moldoveanu, T., Davies, P. L., Elce, J. S., and Beckmann, J. S. (2001) Mutations in calpain 3 associated with limb girdle muscular dystrophy: analysis by molecular modeling and by mutation in m-calpain. *Biophys. J.* 80, 2590–2596
193. Jimenez-Mallebrera C, Torelli S, Feng L, et al. A comparative study of alpha-dystroglycan glycosylation in dystroglycanopathies suggests that the hypoglycosylation of alpha-dystroglycan does not consistently correlate with clinical severity. *Brain Pathol* 2009; 19:596–611.
194. Jin, L. et al. Three novel ANO5 missense mutations in Caucasian and Chinese families and sporadic cases with gnathodiaphysealdysplasia. *Sci. Rep.* 7, 40935, (2017).
195. Jokela, M., Lehtinen, S., Palmio, J. et al. A novel COL6A2 mutation causing late-onset limb-girdle muscular dystrophy. *J Neurol* 266, 1649–1654 (2019).
196. Jung D, Leturcq F, Sunada Y, et al. Absence of γ -sarcoglycan (35 DAG) in autosomal recessive muscular dystrophy linked to chromosome 13q12. *FEBS Lett* 1996;381:15-20
197. Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11:579–592.
198. Kang P, Feener C, Estrella E, et al. LGMD2I in a North American population. *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8:115.
199. Kang PB, Morrison L, Iannaccone ST, Graham RJ, Bonnemann CG, Rutkowski A, et al. Evidence-based guideline summary: evaluation, diagnosis, and management of congenital muscular dystrophy: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology* 2015; 84:1369–1378.
200. Katoh, M. & Katoh, M. Identification and characterization of TMEM16E and TMEM16F genes in silico. *Int. J. Oncol.* 2, 1345–1349 (2004).
201. Kefi M, Amouri R, Driss A, et al. Phenotype and sarcoglycan expression in Tunisian LGMD2C patients sharing the same 521delT mutation. *Neuromusc Disord* 2003;13:779-87

202. Kim Y.G., Raunser S., Munger C., Wagner J., Song Y.L., Cygler M., Walz T., Oh B.H., Sacher M. The architecture of the multisubunit TRAPP I complex suggests a model for vesicle tethering. *Cell*. 2006;127:817–830.
203. Kirschner J, Lochmüller H. Sarcoglycanopathies. *Hand Clin Neurol* 2011;101:41-6
204. Kley RA, Olive M, Schroder R. New aspects of myofibrillar myopathies. *Curr Opin Neurol* 2016; 29:628–634.
205. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 2002;111:943– 55. [PubMed: 12507422]
206. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998;394:388–92.
207. Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A. Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci* 2003;116:387–399.
208. Koster J, van Wilpe S, Kuikman I, Litjens SH, Sonnenberg A. 2004. Role of binding of plectin to the integrin beta4 subunit in the assembly of hemidesmosomes. *Mol Biol Cell* 15:1211-23.
209. Kramerova I., Beckmann J. S., Spencer M. J. (2007) Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A). *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 128–144
210. Kramerova, I., Kudryashova, E., Tidball, J. G., and Spencer, M. J. (2004) Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1373–1388
211. Kramerova, I., Kudryashova, E., Venkatraman, G., and Spencer, M. J. (2005) Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2125–2134; Correction (2007) *Hum. Mol. Genet.* 16, 1006
212. Kramerova, I., Kudryashova E., Ermolova, N., Saenz, A., Jaka, O., López de Munain, A., and Spencer, M. J. (2012) Impaired calcium calmodulin kinase signaling and muscle adaptation response in the absence of calpain 3. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3193–3204

213. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA (2007) Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129:999–1010.
214. Kubisch C, Ketelsen UP, Goebel I, Omran H. Autosomal recessive rippling muscle disease with homozygous CAV3 mutations. *Ann Neurol* 2005; 57:303–304.
215. Kyriakides T, Angelini C, Schaefer J, Sacconi S, Siciliano G, Vilchez JJ, et al. EFNS guidelines on the diagnostic approach to paucior asymptomatic hyperCKemia. *Eur J Neurol.* (2010) 17:767–73. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03012.x
216. Labeit S, Gautel M, Lakey A, Trinick J. Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J.* 1992;11(5):1711–1716.
217. Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW, Tarn WY. A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J Biol Chem.* 2000;275(11):7950–57.
218. Lai MC, Lin RI, Tarn WY. Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug;98(18):10154-59.
219. Laing N.G, S.D. Wilton, P.A. Akkari, S. Dorosz, K. Bound, C. Kneebone, P. Blumbergs, S. White, H. Watkins, D.R. Love, et al., A mutation in the alpha tropomyosin gene TPM3 associated with autosomal dominant nemaline myopathy, *Nat. Genet.* 9 (1995) 75 – 79.
220. Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, et al. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 2005;308:1599–603.
221. Larson, A.A., Baker, P.R., Milev, M.P. et al. TRAPPC11 and GOSR2 mutations associate with hypoglycosylation of α -dystroglycan and muscular dystrophy. *Skeletal Muscle* 8, 17 (2018).
222. Leshinsky-Silver E, Argov Z, Rozenboim L, et al. Dysferlinopathy in the Jews of the Caucasus: a frequent mutation in the dysferlin gene. *Neuromuscul Disord* 2007;17(11–12):950–4.
223. Li RZ, Hou J, Wei Y, et al. hnRNPD extensively regulates transcription and alternative splicing. *Gene* 2019;687:125-34.
224. Li, C.; Haller, G.; Wehl, C.C. Current and Future Approaches to Classify VUSs in LGMD-Related Genes. *Genes* 2022,13,382.

225. Liang W., Zhu W., Mitsuhashi S., et al. Congenital muscular dystrophy with fatty liver and infantile-onset cataract caused by TRAPPC11 mutations: broadening of the phenotype. *Skeletal Muscle*. 2015;5
226. Liang WC, Tian X, Yuo CY, Chen WZ, Kan TM, Su YN, et al. Comprehensive target capture/next-generation sequencing as a second-tier diagnostic approach for congenital muscular dystrophy in Taiwan. *PLoS One* 2017; 12:e0170517.
227. Liewluck T, Winder TL, Dimberg EL, et al. ANO5-muscular dystrophy: clinical, pathological and molecular findings. *Eur J Neurol* 2013;20: 1383–9.
228. LIEWLUCK T. MD and MILONE M., MD, PhD, UNTANGLING THE COMPLEXITY OF LIMB-GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHIES *Muscle Nerve* 2018, 58: 167–177.
229. Lim LE, Campbell KP. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 1998;11:443-52
230. Lindberg C, Sixt C, Oldfors A. Episodes of exercise-induced dark urine and myalgia in LGMD 2I. *Acta Neurol Scand* 2012;125:285–7.
231. Linssen WH, Notermans NC, Van Der Graaf Y, et al. Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 dutch patients. *Brain* 1997;120:1989e96.
232. Litjens SH, Wilhelmsen K, de Pereda JM, Perrakis A, Sonnenberg A. Modeling and experimental validation of the binary complex of the plectin actin binding domain and the first pair of fnIII domains of the $\alpha 4$ integrin. *J Biol Chem* 2005;280: 22270–22277.
233. Liu J, Aoki M, Illa I, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20:31–6.
234. Liu, C.G., Maercker, C., Castanon, M.J., Hauptmann, R., and Wiche, G. (1996). Human plectin: organization of the gene, sequence analysis, and chromosome localization (8q24). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4278–4283.
235. Lo HP, Cooper ST, Evesson FJ, et al. Limb-girdle muscular dystrophy Diagnostic evaluation, frequency and clues to pathogenesis. *Phys Rev Lett* 2008;18:34–44.
236. Lokken N, Born AP, Duno M, Vissing J. LAMA2-related myopathy: frequency among congenital and limb-girdle muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2015; 52:547–553.

237. Maeda Y, Kinoshita T. Dolichol-phosphate mannose synthase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1780:861–8.
238. Maertens GN, Cook NJ, Wang W, Hare S, Gupta SS, Öztop I, et al. Structural basis for nuclear import of splicing factors by human Transportin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb;111(7):2728-33
239. Magri F, Bo RD, D'Angelo MG, Sciacco M, Gandossini S, Govoni A, et al. Frequency and characterisation of anoc-tamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients. *Neuromuscular Disorders*. 2012;22(11):934-43.
240. Magri F, Brajkovic S, Govoni A, Brusa R, Comi GP. Revised genetic classification of Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Curr Mol Med*. 2014; 14:834-943.
241. Magri F, Brusa R, Bello L, Peverelli L, Del Bo R, Govoni A, Cinnante C, Colombo I, Fortunato F, Tironi R, Corti S, Grimoldi N, Sciacco M, Bresolin N, Pegoraro E, Moggio M, Comi GP. Limb girdle muscular dystrophy due to LAMA2 gene mutations: new mutations expand the clinical spectrum of a still challenging diagnosis. *Acta Myol*. 2020 Jun 1;39(2):67-82.
242. Magri, F., Colombo, I., Del Bo, R., Previtali, S., Brusa, R., Ciscato, P., Scarlato, M., Ronchi, D., D'Angelo, M. G., Corti, S., Moggio, M., Bresolin, N., & Comi, G. P. (2015). ISPD mutations account for a small proportion of Italian Limb Girdle Muscular Dystrophy cases. *BMC neurology*, 15, 172.
243. Mah JK, Korngut L, Fiest KM, Dykeman J, Day LJ, Pringsheim T, et al. A systematic review and metaanalysis on the epidemiology of the muscular dystrophies. *Can J Neurol Sci* 2016; 43:163–177.
244. Malfatti E, Cassandrini D, Rubegni A, et al. Respiratory muscle involvement in HNRNPDL LGMD D3 muscular dystrophy: an extensive clinical description of the first Italian patient. *Acta Myol* 2020;39:98-100.
245. Manya H, Sakai KKobayashi K et al. Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306 (1) 93- 97
246. Manya H, Akasaka-Manya K, Nakajima A, Kawakita M, Endo T. Role of N-glycans in maintaining the activity of protein O-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. *J Biochem* 2010;147:337e44.

247. Manzini MC, Tambunan DE, Hill RS, et al. Exome sequencing and functional validation in zebrafish identify GTDC2 mutations as a cause of Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;91:541–547.
248. Margeta M, Connolly AM, Winder TL, et al. Cardiac pathology exceeds skeletal muscle pathology in two cases of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Muscle Nerve* 2009; 40:883–889.
249. Markert CD, et al. TCAP knockdown by RNA interference inhibits myoblast differentiation in cultured skeletal muscle cells. *Neuromusc Disord* 2008;18:413–22.
250. Martin, P. T. Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. *Glycobiology*. 2003; 13(8): 55R- 66R.
251. Mason P, Bayol S, Loughna PT. The novel sarcomeric protein telethonin exhibits developmental and functional regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:699–703. [PubMed: 10208846]
252. Matalonga L., Bravo M., Serra-Peinado C., et al. Mutations in TRAPPC11 are associated with a congenital disorder of glycosylation. *Human Mutation*. 2017;38(2):148–151.
253. Mathews K, Stephan C, Laubenthal K et al. Myoglobinuria and muscle pain are common in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2I. *Neurology* 2011; 76:194–195.
254. Matsubara E, Tsuchiya A, Minami N, et al. (2007) A unique case of limb-girdle muscular dystrophy type 2A carrying novel compound heterozygous mutations in the human CAPN3 gene. *Eur J Neurol* 14(7):819–822.
255. Matsuda C, Aoki M, Hayashi Y et al. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* 1999;53:1119–22.
256. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 2001;10:1761–6.
257. Matsumura K, Campbell KP. Deficiency of dystrophin-associated proteins: a common mechanism leading to muscle cell necrosis in severe childhood muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord*. 1993 Mar;3(2):109-18.
258. Matsumura K, Tomè FMS, Collin H, et al. Deficiency of the 50k dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 1992;359:320-2

259. Matthew P. Wicklund, John T. Kissel, *The Limb-Girdle Muscular Dystrophies*, Neurologic Clinics, Volume 32, Issue 3, 2014, Pages 729-749.
260. Mayans, O. et al. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 395, 863–869 (1998)
261. Mazzone A, Strega PR, Tester DJ, Bernard CE, Faulkner G, Degiorgio R, et al. A mutation in telethonin alters Nav1.5 function. *J Biol Chem* 2008;283:16537–44.
262. McLaughlin HM, Kelly MA, Hawley PP, Darras BT, Funke B, Picker J. Compound heterozygosity of predicted loss-of-function DES variants in a family with recessive desminopathy. *BMC Med Genet* 2013; 14:68.
263. McLean WH, Pulkkinen L, Smith FJ, Rugg EL, Lane EB, Bullrich F, Burgeson RE, Amano S, Hudson DL, Owaribe K, McGrath JA, McMillan JR, Eady RA, Leigh IM, Christiano AM, Uitto J. Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev.* 1996;10:1724–1735.
264. McMillan, J.R., Akiyama, M., Rouan, F., Mellerio, J.E., Lane, E.B., Leigh, I.M., Owaribe, K., Wiche, G., Fujii, N., Uitto, J., et al. (2007). Plectin defects in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 35, 24–35.
265. McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bönnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, Lidov HG, Noguchi S, Ozawa E, Finkel RS, et al. Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1996 Nov;5(11):1841–1847
266. McNally EM, Passos-Bueno MR, Bonnemann CG, et al. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single γ -sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet* 1996;59:1040-7
267. Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, et al. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve* 1999;22:473-9
268. Mercuri, E.; Bushby, K.; Ricci, E.; Birchall, D.; Pane, M.; Kinali, M.; Allsop, J.; Nigro, V.; Sáenz, A. *Neuromuscul. Disord.* 15, 164 (2005).
269. Merlini L, Barois A, Monte A, et al. Homogeneous phenotype of the Gypsy Limb-girdle Muscular Dystrophy with the gamma-sarcoglycan C283Y mutation. *Neurology* 2000;54:1075–9.
270. Merlini L, Kaplan J, Navarro C, et al. The gypsy limb-girdle muscular dystrophy 2C. *Acta Myol* 2001;(3):188–91.

271. Merlini L., A. Barois, A. Monte, B. Echenne, L. Jarre, L. Kalaydjieva, A. Levi-Gomes, C. Navarro, A. Toutain, I. Tournev, A. Urtizberea, J. Vallat, T. Voit, J. Warter, J. Kaplan. Homogeneous phenotype of the Gypsy Limb-girdle Muscular Dystrophy with the gamma-sarcoglycan C283Y Mutation. *Neurology*, 54, 1075-1079, 2000.
272. Meyer LC, Wright NT. Structure of giant muscle proteins. *Front Physiol.* 2013;4:368.
273. Michele, D. E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R. D., Satz, J. S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R. I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K. D., Moore, S. A., Campbell, K. P. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*. 2002; 418(6896): 417-422.
274. Miller G, Musa H, Gautel M, Peckham M. A targeted deletion of the C-terminal end of titin, including the titin kinase domain, impairs myofibrillogenesis. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 23):4811–4819.
275. Milone M, Liewluck T, Winder TL, Pianosi P T. Amyloidosis and exercise intolerance in ANO5 muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2011; 22:13–15.
276. Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F. *Nat Genet.* Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy 1998 Apr;18(4):365-8.
277. Mitra A, et al. Large isoform of MRJ (DNAJB6) reduces malignant activity of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008; 10:R22
278. Mizuno Y, Noguchi S, Yamamoto H, Yoshida M, Suzuki A, Hagiwara Y, Hayashi YK, Arahata K, Nonaka I, Hirai S, et al. Selective defect of sarcoglycan complex in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Sep 15;203(2):979-83.
279. Mizuta, K. et al. Molecular characterization of GDD1/TMEM16E, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 126–132 (2007).
280. Monies D, Alhindi HN, Almuhaizea MA, et al. A first-line diagnostic assay for limb-girdle muscular dystrophy and other myopathies. *Hum Genomics* 2016; 10: 32.

281. Moore SA, Shilling CJ, Westra S, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:995–1003.
282. Mori-Yoshimura M, Segawa K, Minami N, Oya Y, Komaki H, Nonaka I, et al. Cardiopulmonary dysfunction in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Muscle Nerve*. (2017) 55:465–9. doi: 10.1002/mus. 25369
283. Mues A, van der Ven FM, Young P, et al. Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation-dependent way with telethonin. *FEBS Lett* 1998;428:111–4.
284. Muller JS, Piko H, Schoser BG, Schlotter-Weigel B, Reilich P, Gurster S, et al. Novel splice site mutation in the caveolin-3 gene leading to autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2006; 16:432–436.
285. Muntoni F, Torelli S, Brockington M. Muscular dystrophies due to glycosylation defects. *Neurother* 2008;5:627–32.
286. Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, et al. Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Ann Neurol* 2006; 60:597 – 602.
287. Murphy AP, Straub V. The classification, natural history and treatment of the limb girdle muscular dystrophies. *J Neuromuscul Disord* 2015;2(suppl 2): S7–S19.
288. Nam TS, Li W, Heo SH, et al. A novel mutation in DNAJB6, p.(Phe91Leu), in childhood-onset LGMD1D with a severe phenotype. *Neuromuscul Disord* 2015; 25: 843-851.
289. Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G, et al. Evidence-based guideline summary: diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology* 2014; 83:1453–1463.
290. Nascimbeni, A.; et al. Muscle MRI findings in patients with limb girdle muscular dystrophy with calpain 3 deficiency (LGMD2A) and early contractures. *Neuromuscul. Disord.* 2005, 15, 164–171.
291. Nguyen K, Bassez G, Krahn M, et al. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 2007;64(8):1176–82.

292. Niemi KM, Sommer H, Kero M, Kanerva L, Haltia M. Epidermolysis bullosa simplex associated with muscular dystrophy with recessive inheritance. *Arch Dermatol.* 1988;124:551–554.
293. Nigro V, Aurino S, Piluso G. Limb girdle muscular dystrophies: update on genetic diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol.* 2011 Oct; 24(5):429-36.
294. Nigro V, Piluso G. Spectrum of muscular dystrophies associated with sarcolemmal-protein genetic defects. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:583-93
295. Nigro V, Savarese M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol.* 2014;33(1):1-12.
296. Norwood FL, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: In-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain.* 2009;132(Pt 11):3175-86.
297. Nowak KJ, D. Wattanasirichaigoon, H.H. Goebel, M. Wilce, K. Pelin, K. Donner, R.L. Jacob, C. Hubner, K. Oexle, J.R. Anderson, C.M. Verity, K.N. North, S.T. Iannaccone, C.R. Muller, P. Nurnberg, F. Muntoni, C. Sewry, I. Hughes, R. Sutphen, A.G. Lacson, K.J. Swoboda, J. Vigneron, C. Wallgren-Pettersson, A.H. Beggs, N.G. Laing, Mutations in the skeletal muscle alpha actin gene in patients with actin myopathy and nemaline myopathy, *Nat. Genet.* 23 (1999) 208 – 212.
298. O’Grady G L, Lek M Lamande S R, Waddell L, Oates E C, Punetha J, et al. Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy: we are halfway there. *Ann Neurol* 2016;80:101–11.
299. Oestergaard ST, StojkovicT,DahlqvistJR,Bouchet-SeraphinC,Nectoux J, Leturcq F, et al. Muscle involvement in limb-girdle muscular dystrophy with GMPPB deficiency (LGMD2T). *Neurol Genet* 2016;2:e112.
300. Ohlsson M, Hedberg C, Brådvik B, Lindberg C, Tajsharghi H, Danielsson O, et al. Hereditary myopathy with early respiratory failure associated with mutation in A-band titin. *Brain* 2012;135:1682–94.
301. Okazaki, T., Matsuura, K., Kasagi, N. et al. Duchenne muscular dystrophy–like phenotype in an LGMD2I patient with novel FKRP gene variants. *Hum Genome Var* 7, 12 (2020).
302. Okere A, Reddy SS, Gupta S, Shinnar M. A cardiomyopathy in a patient with limb girdle muscular dystrophy type 2A. *Circ Heart Fail.* (2013) 6:e12–13.

303. Olive M, Shatunov A, Gonzalez L et al. Transcription-terminating mutation in telethonin causing autosomal recessive muscular dystrophy type 2G in a European patient. *Neuromuscul Disord* 2008;18(12):929–33.
304. Ono Y, Sorimachi H, Suzuki K: Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 289 – 294
305. Ono Y., Shimada H., Sorimachi H et al. (1998) Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J. Biol. Chem.* 273, 17073–17078
306. Osmanagic-Myers S, Wiche G. Plectin-rack1 (receptor for activated c kinase 1) scaffolding: a novel mechanism to regulate protein kinase c activity. *J Biol Chem* 2004;279:18701
307. Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, et al. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1998;21:421-387.
308. Ozawa E, Yoshida M, Suzuki A, Hagiwara Y, Noguchi S. Dystrophin-associated proteins in 2009;1:58-62
309. Palmieri A, Manara R, Bello L, et al. Cognitive profile and MRI findings in limb-girdle muscular dystrophy 2I. *J Neurol* 2011; 258:1312–1320.
310. Palmio J, Evilä A, Chapon F, et al. Hereditary myopathy with early respiratory failure: occurrence in various populations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85:345–53.
311. Palmio J, Jonson PH, Evilä A, et al. Novel mutations in DNAJB6 gene cause a very severe early onset limb-girdle muscular dystrophy 1D disease. *Neuromuscul Disord* 2015; 25: 835-842.
312. Papadopoulos C, Laforet P, Nectoux J, et al. Hyperckemia and myalgia are common presentations of anoctamin-5- related myopathy in French patients. *Muscle Nerve* 2017;56:1096–100.
313. Paradas, C., Gonzalez-Quereda, L., Luna, N.D., Gallardo, E., García-Consuegra, I., Gómez, H., Cabello, A., Illa, I., & Gallano, P. (2009). A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscular Disorders*, 19, 21-25.
314. Pedemonte, N. & Galletta, L. J. Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiol. Rev.* 9, 419–459 (2014).

315. Pegoraro E, Hoffman EP. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al., editors. GeneReviews(R). Seattle WA: University of Washington, Seattle; 1993.
316. Penisson-Besnier I, Hackman P, Suominen T, et al. Myopathies caused by homozygous titin mutations: limb-girdle muscular dystrophy 2J and variations of phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81:1200–1202.
317. Penttilä, S. et al. Eight new mutations and the expanding phenotype variability in muscular dystrophy caused by ANO5. *Neurology* 78, 897–903 (2012).
318. Petrof BJ. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Cell Biochem* 1998;179:111-23
319. Pfeffer G, Elliott HR, Griffin H, Barresi R, Miller J, Marsh J, et al. Titin mutation segregates with hereditary myopathy with early respiratory failure. *Brain* 2012;135(pt6): 1695–713.
320. Pfindner E, Rouan F, Uitto J. Progress in epidermolysis bullosa: the phenotypic spectrum of plectin mutations. *Exp Dermatol*. 2005;14:241–249.
321. Piccolo F, Moore SA, Ford GC, et al. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol* 2000;48:902–12.
322. Piccolo F., Jeanpierre M., Leturcq F. et al. A founder mutation in the γ -sarcoglycan gene of Gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5(12), 2019-2022.
323. Piluso G, Politano L, Aurino S, et al. Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes. *J Med Genet* 2005; 42: 686–693
324. Politano L, Nigro V, Passamano L, et al. Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromusc Disord* 2001;11:178-85
325. Pollitt, C.; Anderson, L.V.; Pogue, R.; Davison, K.; Pyle, A.; Bushby, K.M. The phenotype of calpainopathy: Diagnosis based on a multidisciplinary approach. *Neuromuscul. Disord*. 2001, 11, 287–296.
326. Poppe M, Cree L, Bourke J, et al. The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Neurology* 2003; 60:1246–1251.

327. Preisler N, Lukacs Z, Vinge L, Madsen KL, Husu E, Hansen RS, et al. Late-onset Pompe disease is prevalent in unclassified limb-girdle muscular dystrophies. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013;110(3):287-9.
328. Puckett RL, Moore SA, Winder TL, et al. Further evidence of Fukutin mutations as a cause of childhood onset limb-girdle muscular dystrophy without mental retardation. *Neuromuscul Disord* 2009;19:352–356.
329. Quijano-Roy S, Avila-Smirnow D, Carlier RY, WB-MRI muscle study group (2012) Whole body muscle MRI protocol: pattern recognition in early onset NM disorders. *Neuromuscul Disord* 1(22 Suppl 2):S68–84.
330. Rajab A, Straub V, McCann LJ, Seelow D, Varon R, Barresi R, et al. Fatal cardiac arrhythmia and long-QT syndrome in a new form of congenital generalized lipodystrophy with muscle rippling (CGL4) due to PTRF-CAVIN mutations. *PLoS Genet* 2010; 6:e1000874.
331. Rana NA, Nita-Lazar A, Takeuchi H, Kakuda S, Luther KB, Haltiwanger RS (2011) O-glucose trisaccharide is present at high but variable stoichiometry at multiple sites on mouse Notch1. *J Biol Chem* 286:31623–31637.
332. Raphael AR 2014 , Couthouis J, Sakamuri S, Siskind C, Vogel H, Day JW, et al. Congenital muscular dystrophy and generalized epilepsy caused by GMPPB mutations. *Brain Res*. 2014;1575:66–71.
333. Raphael AR, Couthouis J, Sakamuri S, Siskind C, Vogel H, Day JW, et al. Congenital muscular dystrophy and generalized epilepsy caused by GMPPB mutations. *Brain Res* 2014;1575:66–71.
334. Rezniczek A, Abrahamsberg C, Fuchs P et al. Plectin 5'-transcript diversity: short alternative sequences determine stability of gene products, initiation of translation and subcellular localization of isoforms. *Hum Mol Genet* 2003;12:3181–3194.
335. Rezniczek A, Walko G, Wiche G. 2010. Plectin gene defects lead to various forms of epidermolysis bullosa simplex. *Dermatol Clin* 28:33-41.
336. Rezniczek G, Konieczny P, Nikolic, B et al. (2007). Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with b-dystroglycan. *J. Cell Biol.* 176, 965–977.

337. Richard I, Brenguier L, Dinçer P, et al. Multiple independent molecular etiology for limb-girdle muscular dystrophy type 2A patients from various geographical origins. *Am. J. Hum. Genet.* 1997, 60, 1128–1138.
338. Richard I, Hogrel J, Stockholm D et al. Natural history of LGMD2A for delineating outcome measures in clinical trials. *Ann Clin Transl Neurol.* (2016) 3:248–65.
339. Richard I, Roudaut C, Saenz A et al. (1999) Calpainopathy: a survey of mutations and polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1524 –1540
340. Richard, I.; Broux, O.; Allamand, V.; et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995, 81, 27–40.
341. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405–24.
342. Roberds S, Leturcq F, Allamand V et al. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994;78: 625-633.
343. Roberds SL, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP. Primary structure and muscle-specific expression of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). *J Biol Chem* 1993;268:23739-42
344. Rodríguez Cruz M, Belaya K, Basiri K, et al. Clinical features of the myasthenic syndrome arising from mutations in GMPPB. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87:802–9.
345. Roscioli T, Kamsteeg EJ, Buysse K et al. Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of α -dystroglycan. *Nat Genet.* 2012;44:581–5.
346. Rose JM, Novoselov SS, Robinson PA, Cheetham ME. Molecular chaperone-mediated rescue of mitophagy by a Parkin RING1 domain mutant. *Hum Mol Genet.* 2011; 20:16–27.
347. Rudolf G, Suominen T, Penttila S, Hackman P, Evila A, Lannes B, et al. Homozygosity of the dominant myotilin c.179C>T (p. Se60Phe) mutation causes a more severe and proximal muscular dystrophy. *J Neuromuscul Disord* 2016; 3: 275–281.

348. Ruggieri A, Brancati F, Zanotti S, et al. Complete loss of the DNAJB6 G/F domain and novel missense mutations cause distal-onset DNAJB6 myopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2015; 3: 44.
349. Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM (2008) Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* 456:502–506.
350. Saenz A, Leturcq F, Cobo AM, et al. LGMD2A: Genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain-3 gene. *Brain* 2005; 128: 732–742
351. Saito A, Higuchi I, Nakagawa M, et al. Miyoshi myopathy patients with novel 5' splicing donor site mutations showed different dysferlin immunostaining at the sarcolemma. *Acta Neuropathol* 2002;104:615–20.
352. Samples with different SSCP migration pattern were sequenced with ABI PRISM 310 Genetic analyzer.
353. Sandell S, Huovinen S, Sarparanta J et al. The enigma of 7q36 linked autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2010;81:834-839.
354. Santavuori, P., Somer, H., Sainio, K et al. Muscle-eye-brain disease (MEB). *Brain Dev.* 1989; 11(3): 147-153.
355. Saredi S, Ruggieri A, Mottarelli E, et al. Fukutin gene mutations in an Italian patient with early onset muscular dystrophy but no central nervous system involvement. *Muscle Nerve* 2009;39:845–848.
356. Sarkozy, A. et al. ANO5 gene analysis in a large cohort of patients with anoctaminopathy: confirmation of male prevalence and high occurrence of the common exon 5 gene mutation. *Hum. Mutat.* 34, 1111–1118 (2013).
357. Sarparanta J, Blandin G, Charton K, et al. Interactions with M-band titin and calpain 3 link myospryn (CMYA5) to tibial and limb-girdle muscular dystrophies. *J Biol Chem.* 2010;285:30304–30315.
358. Sarparanta J, Jonson PH, Golzio C, et al. Mutations affecting the cytoplasmic functions of the cochaperone DNAJB6 cause limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 2012; 44: 450-455.
359. Sato T, Hayashi YK, Oya Y, et al. DNAJB6 myopathy in an Asian cohort and cytoplasmic/nuclear inclusions. *Neuromuscul Disord* 2013; 23: 269-276.

360. Savarese, M. et al. Next generation sequencing on patients with LGMD and nonspecific myopathies: Findings associated with ANO5 mutations. *Neuromuscul. Disord.* 25, 533–541 (2015).
361. Scacheri PC, Gillanders EM, Subramony SH, Vedanarayanan V, Crowe CA, Thakore N, et al. Novel mutations in collagen VI genes: expansion of the Bethlem myopathy phenotype. *Neurology* 2002; 58: 593–602.
362. Schessl J, Bach E, Rost S, Feldkirchner S, Kubny C, Muller S, et al. Novel recessive myotilin mutation causes severe myofibrillar myopathy. *Neurogenetics* 2014; 15:151–156.
363. Schessl J, Kress W, Schoser B. Novel ANO5 mutations causing hyper-CK-emia, limb girdle muscular dystrophy and miyoshi type muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2012;45:740–2.
364. Schroder R, Mundegar R, Treusch M, Schlegel U, Blumcke I, Owaribe K, et al. Altered distribution of plectin/hdl in dystrophinopathies. *Eur J Cell Biol* 1997;74:165–171.
365. Schroder R, Pacholsky D, Reimann J, Matten J, Wiche G, Furst DO, et al. Primary longitudinal adhesion structures: plectin- containing precursors of costameres in differentiating human skeletal muscle cells. *Histochem Cell Biol* 2002;118:301–310.
366. Scrivens P, Noueihed B, Shahrzad N, Hul S., Brunet S, Sacher M. C4orf41 and TTC-15 are mammalian TRAPP components with a role at an early stage in ER-to-Golgi trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 2011;22:2083–2093.
367. Seki N, et al. Cloning, tissue expression, and chromosomal assignment of human MRJ gene for a member of the DNAJ protein family. *J Hum Genet.* 1999; 44:185–189.
368. Servian-Morilla E, Takeuchi H, Lee T, Clarimon J et al. A POGlut1 mutation causes a muscular dystrophy with reduced Notch signaling and satellite cell loss. *EMBO Mol Med.* 2016. 8:1289–1309.
369. Sevcik J, Urbanikova L, Kost'an J, Janda L, Wiche G. Actin- binding domain of mouse plectin. Crystal structure and binding to vimentin. *Eur J Biochem* 2004;271:1873–1884.
370. Shi W, Chen Z, Schottenfeld J, et al. Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on β - and δ -sarcoglycan. *Muscle Nerve* 2004;29:409-19

371. Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, et al. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 2003;53:392–6.
372. Smith FJ, Eady RA, Leigh IM, McMillan JR, Rugg EL, Kelsell DP, Bryant SP, Spurr NK, Geddes JF, Kirtschig G and others. 1996. Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 13:450-7.
373. Smogavec M, Jana Zschüntzsch, Wolfram Kress, Julia Mohr, Peter Hellen, Barbara Zoll, Silke Pauli and Jens Schmidt, Novel fukutin mutations in limb-girdle muscular dystrophy type 2M with childhood onset. *Neurol Genet*. 2017 3(4): e167.
374. Sorimachi H, Ono Y, Suzuki K: Skeletal muscle-specific calpain, p94, and connectin/titin: their physiological functions and relationship to limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Adv Exp Med Biol* 2000; 481: 383 – 395, (discussion); 395 – 397.
375. Stensland E, Lindal S, Jonsrud C, et al. Prevalence, mutation spectrum and phenotypic variability in Norwegian patients with Limb Girdle Muscular Dystrophy 2I. *Neuromuscul Disord* 2011; 21:41–46.
376. Stensland E, Lindal S, Jonsrud C, et al. Prevalence, mutation spectrum and phenotypic variability in Norwegian patients with limb girdle muscular dystrophy 2I. *Neuromuscul Disord* 2011;21:41–6.
377. Straub V, Campbell KP. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 1997;10:168-75
378. Strogatz, S. H. Exploring complex networks. *Nature* 410, 268–276 (2001).
379. Suarez-Cedeno G, Winder T, Milone M. DNAJB6 myopathy: a vacuolar myopathy with childhood onset. *Muscle Nerve* 2014; 49: 607-610.
380. Sun Y, Chen H, Lu Y, et al. Limb girdle muscular dystrophy D3 HNRNPDL related in a Chinese family with distal muscle weakness caused by a mutation in the prion-like domain. *J Neurol* 2019;266:498-506.
381. Suominen T, Penttilä S, Malandrini A et al. The first Italian family with tibial muscular dystrophy caused by a novel titin mutation. *J Neurol* 2010;257:575–9.
382. Suzuki K, Sorimachi H: A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett* 1998; 433: 1 – 4.

383. Sveen M L, Schwartz M, Vissing J. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol* 2006; 59:808–15.
384. Svingou, M., Kekou K, Papadopoulos C et al (2019). EP.20ANO5-related myopathy: report of the first Greek patients. *Neuromuscular Disorders*. 29. S75-S76. 10.1016/j.nmd.2019.06.150.
385. Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, et al. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *J Neurol Sci* 2003;211:23–8.
386. Takano A, Bonnemann CG, Honda H, et al. Intrafamilial phenotypic variation in limb girdle muscular dystrophy type 2C with compound heterozygous mutations. *Muscle Nerve* 2000;23:807-10
387. Tanaka H, Hijikata T, Murakami T, Fujimaki N, Ishikawa H. Localization of plectin and other related proteins along the sarcolemma in smooth muscle cells of rat colon. *Cell Struct Funct* 2001;26:61–70.
388. Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S et al. Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in alpha- dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 2006; 15:1279–1289.
389. Taniguchi-Ikeda M, Morioka I, Iijima K, Toda T. Mechanistic aspects of the formation of α -dystroglycan and therapeutic research for the treatment of α -dystroglycanopathy: a review. *Mol Asp Med*. 2016;51:115–24.
390. Tasca G, Moro F, Aiello C, et al. Limb-girdle muscular dystrophy with α -dystroglycan deficiency and mutations in the ISPD gene. *Neurology*. 2013;80:963–5.
391. Tateyama M, Aoki M, Nishino I, et al. Mutation in the caveolin-3 gene causes a peculiar form of distal myopathy. *Neurology* 2002;58:323–5.
392. Thompson R, Straub V. Limb-girdle muscular dystrophies—international collaborations for translational research. *Nat Rev Neurol* 2016; 12:294–309.
393. Tian, Y., Schreiber, R. & Kunzelmann, K. Anoctamins are a family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J. Cell Sci*. 125, 4991–4998 (2012).
394. Tobon A. Metabolic myopathies. *Continuum (Minneapolis)* 2013; 19:1571–1597.

395. Todorova A, Ashikov A, Beltcheva O, Tournev I, Kremensky I. C283Y mutation and other C-terminal nucleotide changes in the gamma-sarcoglycan gene in the Bulgarian Gypsy population. *Hum Mutat.* 1999;14(1):40-4.
396. Todorova A, Georgieva B, Tournev I, et al. A large deletion and novel point mutations in the calpain 3 gene (CAPN3) in Bulgarian LGMD2A patients. *Neurogenetics* 2007; 8:225-9.
397. Tournev I, Aneva L, Kamenov O, Ishpekova B, Katsarova M, Gergelcheva V, Angelicheva D, Kalaydjieva L. Gamma sarcoglycan deficiency in Bulgarian Gypsies. *Muscle & Nerve*, 1998, Suppl. 7,136.
398. Trinick J. Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *Trends Biochem Sci.* 1994;19(10):405–409.
399. Tsai PC, Tsai YS, Soong BW, et al. A novel DNAJB6 mutation causes dominantly inherited distal- onset myopathy and compromises DNAJB6 function. *Clin Genet* 2017;
400. Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(9):679–689. doi: 10.1038/nrm1198.
401. Tsutsumi, S. et al. The novel gene encoding a putative transmembrane protein is mutated in gnathodiaphyseal dysplasia (GDD). *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1255–1261 (2004).
402. Udd B, Kaarianen H, Somer H. Muscular dystrophy with separate clinical phenotypes in a large family. *Muscle Nerve* 1991;14(11):1050–8.
403. Udd B, Partanen J, Halonen P, Falck B, Hakamies L, Heikkilä H, et al. Tibial muscular dystrophy — late adult-onset distal myopathy in 66 Finnish patients. *Arch Neurol* 1993;50:604–8.
404. Udd B, Vihola A, Sarparanta J, Richard I, Hackman P. Titinopathies and extension of the M-line mutation phenotype beyond distal myopathy and LGMD2J. *Neurology* 2005;64:636–42. 1993;3:109-18;1999;98:465-74
405. Udd B. Molecular biology of distal muscular dystrophies—sarcomeric proteins on top. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:145–58.
406. Ueyama H, Kumamoto T, Horinouchi H, et al. Clinical heterogeneity in dysferlinopathy. *Intern Med* 2002;41:532e6.

407. Uitto, J., Pulkkinen, L., Smith, F.J.D., and McLean, W.H.I. (1996). Plectin and human genetic disorders of the skin and muscle. The paradigm of epidermolysis bullosa with muscular dystrophy. *Exp. Dermatol.* 5, 237–246.
408. Urtasun, M.; Sáenz, A.; Roudaut, C et al. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain). *Brain* 1998, 121 Pt 9, 1735–1747.
409. Vainzof M, Moreira ES, Suzuki OT, et al. Telethonin protein expression in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta* 2002;1588:33–40.
410. Valle G, Faulkner G, De Antoni A, et al. Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* 1997;415:163–8.
411. Van den Bergh P, Bouquiaux O, Verellen C et al. Tibial muscular dystrophy in a Belgian family. *Ann Neurol* 2003;54:248–51.
412. Van den Bergh P, Sznajer Y, van Parys V, van Tol W, Wevers R, Lefeber D et al. A homozygous DPM3 mutation in a patient with alpha-dystroglycan-related limb girdle muscular dystrophy. *Neuro- muscul Disord* 2017; 27:1043–1046.
413. van den Bergh PYK, Sznajer Y, van Parys V, van Tol W, Wevers RA, Lefeber DJ, et al. A homozygous DPM3 mutation in a patient with alpha-dystroglycan-related limb girdle muscular dystrophy. *Neuro- muscul Disord* 2017;27:1043–1046.
414. Van der Kooi AJ, Barth PG, Busch HFM, de Haan R, Ginjaar HB, van Essen AJ, et al. The clinical spectrum of limb girdle muscular dystrophy A survey in the Netherlands. *Brain.* 1996;119(5):1471-80.
415. van Reeuwijk J, Maugendre S, van den Elzen C, Verrips A, Bertini E, Muntoni F, et al. The expanding phenotype of POMT1 mutations: from Walker- Warburg syndrome to congenital muscular dystrophy, microcephaly, and mental retardation. *Hum Mutat.* 2006;27(5):453–9.
416. Van Reeuwijk J, Olderode-Berends MJ, Van den Elzen C, et al. A homozygous FKRP start codon mutation is associated with Walker–Warburg syndrome, the severe end of the clinical spectrum. *Clin Genet* 2010; 78:275–281.
417. Varshney S, Stanley P (2018) Multiple roles for O-glycans in Notch signalling. *FEBS Lett* 592:3819–3834.
418. Vieira N, Naslavsky M, Licinio L, et al. A defect in the RNA-processing protein HNRPDL causes limb-girdle muscular dystrophy 1G (LGMD1G). *Hum Mol Genet* 2014;23:4103-10.

419. Vilchez J, Gallano P, Gallardo E, et al. Identification of a novel founder mutation in the DYSF gene causing clinical variability in the Spanish population. *Arch Neurol* 2005;62(8):1256–9.
420. Vissing J, Barresi R, Witting N, van Ghelue M, Gammelgaard L, Bindoff L, et al. A heterozygous 21-bp deletion in CAPN3 causes dominantly inherited limb girdle muscular dystrophy. *Brain* 2016; 139:2154–2163.
421. Vissing J. Limb girdle muscular dystrophies: classification, clinical spectrum and emerging therapies. *Curr Opin Neurol* 2016; 29:635–641.
422. Vuillaumier-Barrot S, Bouchet-Séraphin C, Chelbi M, Devisme L, Quentin S, Gazal S, et al. Identification of mutations in TMEM5 and ISPD as a cause of severe cobblestone lissencephaly. *Am J Hum Genet.* 2012; 91(6):1135–43.
423. Vuillaumier-Barrot S, Quijano-Roy S, Bouchet-Seraphin C, et al. Four Caucasian patients with mutations in the fukutin gene and variable clinical phenotype. *Neuromuscul Disord* 2009;19:182–188.
424. Waddell ML LB, Bahlo M, Bromhead C, Jones K, North KN, Clarke NF. G.P.41 the identification of LGMD2G (TCAP) in Australia. *Neuromuscul Disord* 2012;22(Abstracts):804–908.
425. Wahbi K, Meune C, Hamouda EH, et al. Cardiac assessment of limb-girdle muscular dystrophy 2I patients: an echography, Holter ECG and magnetic resonance imaging study. *Neuromuscul Disord* 2008; 18:650–5.
426. Wallace S, Conta J, Winder T, Willer T et al. A novel missense mutation in POMT1 modulates the severe congenital muscular dystrophy phenotype associated with POMT1 nonsense mutations. *Neuromuscul Disord.* 2014;24(4):312–20.
427. WALTON, J.N., NATTRASS F. J. ON THE CLASSIFICATION, NATURAL HISTORY AND TREATMENT OF THE MYOPATHIES *Brain*, Volume 77, Issue 2, June 1954, Pages 169–231,
428. Wang X, Wu Y, Cui Y et al. Novel TRAPPC11 Mutations in a Chinese Pedigree of Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Case Rep Genet.* 2018 Jul 16;2018:8090797.
429. Watson E, Geary-Joo C, Hughes M, Cross JC. The Mrj co-chaperone mediates keratin turnover and prevents the formation of toxic inclusion bodies in trophoblast cells of the placenta. *Development.* 2007; 134:1809–1817.

430. Wattjes M, Kley R, Fischer D. Neuromuscular imaging in inherited muscle diseases. *Eur Radiol* 2010; 20 (10):2447–60.
431. Wells L. The o-mannosylation pathway: glycosyltransferases and proteins implicated in congenital muscular dystrophy. *J Biol Chem*. 2013;288(10): 6930–5.
432. Wenzel K, Geier C, Qadri F, et al. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med* 2007;85:1203e14.
433. Wiche G, Becker B, Lubert K et al. 1991. Cloning and sequencing of rat plectin indicates a 466-kD polypeptide chain with a three-domain structure based on a central alpha-helical coiled coil. *J Cell Biol* 114:83-99.
434. Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* 1998;111:2477–2486.
435. Wicklund M, Di Vincenzo C, Liaquat K, et al. Relative prevalence of limb girdle muscular dystrophies in the United States population. *Neurology* 2013;80. P07.030.
436. Willer T, Lee H, Lommel M, Yoshida-Moriguchi T, de Bernabe DB, Venzke D, et al. ISPD loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome. *Nat Genet*. 2012;44:575–80.
437. Willer W, Amselgruber R, Deutzmann, S. Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyl-transferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids, *Glycobiology* 12 (2002) 771–783.
438. Willis T, Hollingsworth K, Coombs A, Sveen M-L, Andersen S, Stojkovic T, et al. Quantitative Magnetic Resonance Imaging in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2I: A Multinational Cross-Sectional Study. *PLoS ONE*. 2014; 9(2):e90377.
439. Witting N, Duno M, Petri H, et al. Anoctamin 5 muscular dystrophy in Denmark: prevalence, genotypes, phenotypes, cardiac findings, and muscle protein expression. *J Neurol* 2013;260:2084–93.
440. Witting, N. et al. Anoctamin 5 muscular dystrophy in Denmark: prevalence, genotypes, phenotypes, cardiac findings, and muscle protein expression. *J. Neurol*. 260, 2084–2093 (2013).
441. Xie Z, Xiao J, Zheng Y, Wang Z, Yuan Y. Magnetic Resonance Imaging Findings in the Muscle Tissue of Patients with Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2I Harboring the Founder Mutation c.545A>G in the FKRP Gene. *Biomed Res Int*. 2018 May 29;2018:3710814.

442. Yoshida A, Kobayashi K, Manya H et al. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1 *Dev Cell* 2001;1 (5) 717- 724
443. Yoshida M, E.Ozawa Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma, *J. Biochem. (Tokyo)* 108 (1990) 748 – 752.
444. Yoshida-Moriguchi T, Willer T, Anderson ME, et al. SGK196 is a glycosylation-specific O-mannose kinase required for dystroglycan function. *Science* 2013;341: 896–899.
445. Yoshida-Moriguchi T, Yu L, Stalnakker SH, et al. O- mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. *Science* 2010;327:88–92.
446. Yu H, Takeuchi H (2019) Protein O-glycosylation: another essential role of glucose in biology. *Curr Opin Struct Biol* 56:64–71.
447. Yurchenco PD. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3
448. Zhang T, Haws P and Wu Q. (2004). Multiple variable first exons: a mechanism for cell- and tissue- specific gene regulation. *Genome Res.* 14, 79–89.
449. Zhang Y, et al. The Hsp40 family chaperone protein DnaJB6 enhances Schlafen1 nuclear localization which is critical for promotion of cell-cycle arrest in T-cells. *Biochem J.* 2008; 413:239–250.
450. Zima J, Eaton A, Pál E, Till Á et al. Intrafamilial variability of limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1D type. *Eur J Med Genet.* 2020 Feb;63(2):103655.
451. Zou P, Pinotsis N, Lange S, et al. Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature* 2006; 439:229–33.
452. Ermolova N, Kudryashova E, Di Franco M, Vergara J, Kramerova I, Spencer M. (2011) Pathogenicity of some limb girdle muscular dystrophy mutations can result from reduced anchorage to myofibrils and altered stability of calpain 3. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3331–3345
453. Mavillard F, Servián-Morilla E, Rivas E, Paradas C, & Cabrera-Serrano, M. (2021). Novel ANO5 intronic Roma variant alters splicing causing muscular dystrophy. *Clinical Genetics*, 100(1), 106–110.

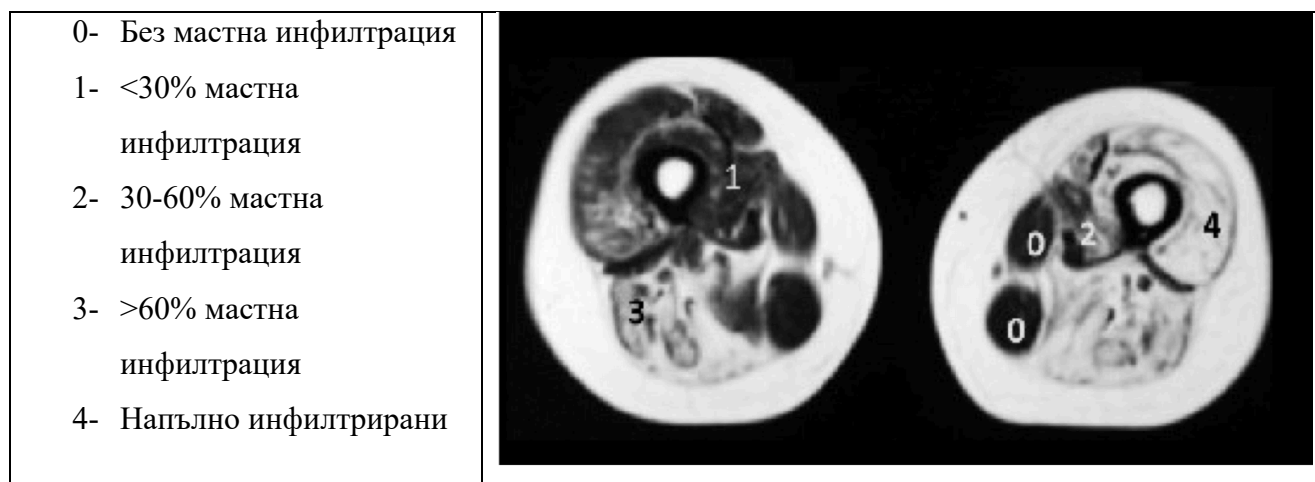
8. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Score	Muscle Response
0	No muscle contraction is seen or identified with palpation. Generally seen in case of complete paralysis.
1	Muscle contraction is identified or seen with palpation but the muscle is insufficient to produce joint movement. Only flicking or twitching is seen even with the elimination of gravity.
2	The muscle can move the joint it crosses through a full range of motion but only if the part is positioned in such a way that the force of gravity is eliminated.
3	The muscle can move the joint it crosses through a full range of motion against the gravity but without applying any resistance.
4	The muscle can move the joint it crosses through a full range of motion, against the gravity as well as against some amount of resistance applied by the examiner.
5	The muscle can move the joint it crosses through a full range of motion, against the gravity as well as against full resistance applied by the examiner.

MRC скала за оценка на мускулната сила при ММТ.

Приложение 2



T1-секвенция на МР изображение на бедрени мускули с мастна инфилтрация и тяхната оценка по Mercuri.

9. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

- 1 **Танева А.**, Чамова Т., Търнев И. Клиничен спектър на кавеопатиите, сп. Медикарт 2018.
- 2 **Танева А.**, Чамова Т, Бичев С, Тодоров М, Господинова М, Кастрева К, Златарева, Д, Крупев М, Хаджииванов Р, В. Гергелчева, Л. Грозданова, Д. Цонева, А. Хюбнер, М. В. дер Хаген, Б. Шосер, Х. Лохмюлер, А. Тодорова, И. Търнев. Пояс- крайник мускулна дистрофия 2G в религиозно малцинство на българо- мохамедани, хомозиготи по мутация с.75G>A, p.Trp25x. Българска неврология 2019; 2:71-76.
- 3 Чамова Т, **Танева А.**, Атемин С, Тодоров Т, Господинова М, Тодорова А, Търнев И. Колаген 6 свързани миопатии. Първото генетично доказано семейство в България с вродена миопатия на Бетлем. сп. Педиатрия, том LXI, 1, 2019.
- 4 **Танева А.**, Чамова Т, Търнев И. Прогресивни мускулни дистрофии тип пояс-крайник. Българска неврология 2023 (под печат).
- 5 Gospodinova M, Chamova T, **Taneva A.**, Todorova A, Denchev S, Tournev I. CARDIAC INVOLVEMENT IN MUSCULAR DYSTROPHIES. 2018. Advances in Bulgarian Science.
- 6 Chamova T, Bichev S., Todorov T., Gospodinova M, **Taneva A.**, Kastreva K., Zlatareva D., Krupev M., Hadjiivanov R., Guergeltcheva V., Grozdanova L., Tzoneva D., Huebner A. ,Von der Hagen M. Schoser B., Lochmuller H., Todorova A, Tournev I., Limb Girdle Muscular Dystrophy 2G in a religious minority of Bulgarian Muslims homozygous for the c.75G>A, p.Trp25X mutation. (2018). Limb Girdle Muscular Dystrophy 2G in a religious minority of Bulgarian Muslims homozygous for the c.75G>A, p.Trp25X mutation. Neuromuscular Disorders. 28 (8). 10.1016/j.nmd.2018.05.005. **IF 2.612**
- 7 Servián-Morilla E, Cabrera-Serrano M, Johnson K, Pandey A, Ito A, Rivas E, Chamova T, Muelas N, Mongini T, Nafissi S, Claeys KG, Grewal RP, Takeuchi M, Hao H, Bönnemann C, Lopes Abath Neto O, Medne L, Brandsema J, Töpf A, **Taneva**

- A.** Vilchez JJ, Tournev I, Haltiwanger RS, Takeuchi H, Jafar-Nejad H, Straub V, Paradas C. *POGLUT1* biallelic mutations cause myopathy with reduced satellite cells, α -dystroglycan hypoglycosylation and a distinctive radiological pattern. *Acta Neuropathol.* 2020 Mar;139(3):565-582. Epub 2020 Jan 3. IF **17.088**
- 8 Töpf A, Johnson K, Bates A, Phillips L, Chao KR, England EM, Laricchia KM, Mullen T, Valkanas E, Xu L, Bertoli M, Blain A, Casasús AB, Duff J, Mroczek M, Specht S, Lek M, Ensini M, MacArthur DG, **MYO-SEQ consortium**, Straub V. Sequential targeted exome sequencing of 1001 patients affected by unexplained limb-girdle weakness. *Genet Med.* 2020 Sep;22(9):1478-1488. IF **8.822**
- 9 Ategin S, Todorov T, Maver A, Chamova T, Georgieva B, Tincheva S, Pacheva I, Ivanov I, **Taneva A**, Zlatareva D, Tournev I, Guergueltcheva V, Gospodinova M, Chochkova L, Peterlin B, Mitev V, Todorova A. April 2021. *Neuromuscular Disorders.* 31(25). 10.1016. MYH7- related disorders in two Bulgarian families: Novel variants in the same region associated with different clinical manifestation and disease penetrance. MYH7-related disorders in two Bulgarian families: Novel variants in the same region associated with different clinical manifestation and disease penetrance. IF **3.538**.

Участие в конгреси:

Постери:

1. 18-21.05.2017г. Участие в XVI Национален конгрес по Неврология с международно участие с постер на тема: Автозомно-рецесивни пояс-крайник мускулни дистрофии тип 2A и 2G, обусловени от хомозиготни мутации при българо-мохамедани.
2. 08-10.09.2017г. Участие в 12th Balkan Congress of Human Genetics, 2017 с постер на тема Clinical and genetic spectrum of Limb-Girdle Muscular Dystrophies (LGMD) in Bulgaria.
3. 05.2018 г. Участие в XVII Национален конгрес по Неврология с международно участие с постер на тема: “Представяне на нова форма пояс-крайник мускулна дистрофия тип 2Z с мутация в *POGLUT1* гена при трима български пациенти”

4. 06.2018г. Участие в 4-ти Конгрес на Европейска академия по Неврология, Лисабон, Португалия, юни 2018 с постер на тема „Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) in Bulgaria“
5. 02-06.10.2018г. Участие в 23-ти Международен конгрес на World Muscle Society, Мендоса, Аржентина, с постер на тема „Limb-girdle muscular dystrophy 2Z in a Bulgarian family,“
6. 16-19.05.2019г. Участие в XVIII Национален конгрес по Неврология с международно участие с два постера- „Клинична и генетична вариабилност на MYH7 - свързаните миопатии в България“ и „Първите генетично доказани случаи в България с вродена миопатия на Bethlem.“
7. 27-31.10.2019г. Участие в XXIV Световен конгрес по Неврология, Дубай, ОАЕ с постер на тема „Targeted screening for detection of Pompe disease in patients with unclassified Limb-Girdle Muscular Dystrophy (LGMD) using Dried-Blood Spot (DBS) test: Bulgarian experience.“
8. Участие на участие в XXI Национален конгрес по неврология, 2022г. с постер на тема „Представяне на семейство с автозомно- доминантна форма на *CAPN3* свързана Пояс- крайник мускулна дистрофия.“

Орални презентации:

1. 11-12.10.2018 г. Национална научна конференция по Детска неврология, Психиатрия и Психология на развитието с международно участие, София 11-12.10. 2018, орална презентация на тема: “Пояс-крайник мускулни дистрофии”
2. 28-29.02.2020г. Участие в Научно- практическа конференция “Ден на редките болести в България” с първа награда за орална презентация по тема “Епидемиологично проучване на автозомно- рецесивните форми на пояс-крайник мускулна дистрофия в България.”

3. 01-02.09.2021г Участие в Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието с доклад на тема Клиничен спектър на калпаинопатите. Представяне на семейство с атипична форма на калпаинопатия с ригиден гръбнак.

Спечелени научни проекти ГРАНТ:

Два проекта към МУ- София в конкурс “Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения- 2018“, оценени с отлична оценка с теми:

1. „Клинико- генетичен спектър на прогресивни мускулни дистрофии тип пояс-крайник в България“
2. „Изследване на генотип- фенотипните корелации при пациенти с дистония- тремор синдром- вариант на Болест на Louis- Var, обусловен от хомозиготна мутация p.V2716A в *ATM* гена“