

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

**Д-Р АНА ВЕСКОВА ШОПОВА**

**ДИСЕРТАЦИЯ**

СОФИЯ, 2014

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ**

**КАТЕДРА ПО НЕВРОЛОГИЯ**

**Д-Р АНА ВЕСКОВА ШОПОВА**

**ГЕНОТИП-ФЕНОТИП КОРЕЛАЦИИ ПРИ  
МИОТОНИЧНИ ДИСТРОФИИ ТИП 1 И ТИП 2**

**ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И  
НАУЧНА СТЕПЕН**

**„ДОКТОР ПО МЕДИЦИНА“**

**СОФИЯ, 2014**

## СЪДЪРЖАНИЕ:

|   |     |
|---|-----|
| I. Литературен обзор  | 1   |
| 1. Исторически преглед  | 1   |
| 2. Епидемиология  | 2   |
| 3. Клинична характеристика на миотонична дистрофия тип 1      | 4   |
| 4. Клинична характеристика на миотонична дистрофия тип 2      | 35  |
| 5. Генетични механизми при миотонична дистрофия тип 1         | 39  |
| 6. Генетични механизми при миотонична дистрофия тип 2         | 61  |
| 7. Патогенитични механизми при миотоничните дистрофии         | 65  |
| 8. Подходи за диагностициране на миотоничните дистрофии       | 71  |
| 9. Терапевтични подходи при пациентите с миотонична дистрофия | 73  |
| II. Постановка на изследването                                | 76  |
| 1. Въведение  | 76  |
| 2. Цели, хипотези и задачи                                    | 77  |
| 3. Контингент на изследването                                 | 78  |
| 4. Методи на изследването                                     | 79  |
| III. Клинични резултати                                       | 84  |
| 1. Клинико-диагностичен анализ при пациенти с МД1             | 85  |
| 2. Клинико-диагностичен анализ при пациенти с МД2             | 111 |
| IV. Резултати от генетични изследвания                        | 113 |
| 1. Генетични резултати при МД1                                | 113 |
| 2. Генетични резултати при МД2                                | 153 |
| V. Дискусия   | 157 |
| VI. Изводи  | 183 |
| VII. Приноси  | 184 |
| VIII. Приложение  | 185 |
| IX. Литература  | 192 |

## **Използвани съкращения:**

МД – миотонична дистрофия;

МД1 – миотонична дистрофия тип 1;

МД2 - миотонична дистрофия тип 2;

ЕКГ- електрокардиография;

ЕМГ- електромиография;

ЕНГ- електроневрография;

ЕхоКГ- ехокардиография;

Холтер-ЕКГ- холтер електрокардиография;

ПНП- периферна полиневропатия;

ГГТ (GGT)- гамаглутамил трансфераза;

ТСХ (TSH)- тиреоидстимулиращ хормон;

ИгГ (IgG) - Имуноглобулин тип Г;

ИгА (IgA) – Имуноглобулин тип А;

ИгМ (IgM) – Имуноглобулин тип М;

КФК (СРК)- креатинфосфокиназа;

КЗ - Кръвна захар;

АХ- Артериална хипертония;

ФИД- функционално изследване на дишането;

ФВК (FVC)- форсиран витален капацитет;

ФЕО1 (FEO1)- форсиран експираторен обем за 1 секунда;

МРТ- магнитнорезонансна томография;

ММТ- мануално мускулно тестване;

ЛПХБ - ляв преден хемиблок;

СЧ - сърдечна честота;

ФИ – фракция на изстласкване;

ЛК – лява камера;

ДК – дясна камера;

ДББ- десен бедрен блок;

ЛББ- ляв бедрен блок;  
ДНК - дезоксирибонуклеиновата киселина;  
РНК - рибонуклеинова киселина;  
AV- блок - предсърдно-камерен блок;  
AVF- атриовентрикуларни фибрилации;  
СТС- Christmas tree cataract;  
ССТG – цитозин-цитозин-тиамин-гуанин;  
СТG – цитозин-тиамин-гуанин;  
PROMM – проксимална миотонична миопатия;  
AV- блок - предсърдно-камерен блок;  
AVF- атриовентрикуларни фибрилации;  
DMPK - dystrophia myotonica protein kinase;  
ZNF9(CNBP) - zinc finger 9;  
PCR – полимеразна верижна реакция;  
MD- мускулна дистрофия;  
MDs - мускулни дистрофии;  
STR - къси тандемни повтори (short tandem repeat);  
MBNL - muscleblind подобен белтък;  
CUGBP – CUG – свързващ белтък;  
CELF - CUGBP и ETR - 3 like factors;  
TP-PCR - Triplet Repeat Primed PCR;  
PKC - протеин киназа C;  
MEF2A - myogenic enhancer factor 2A;

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### 1. ИСТОРИЧЕСКИ ПРЕГЛЕД

Миотоничната дистрофия е наследствено заболяване с проява на мускулна слабост и загуба на мускулна маса, характеризиращо се с постоянни и неволеви мускулни контракции. Тези контракции възникват в отговор на волево съкращение на мускула или при удар на мускула. Заболяването е описано за първи път като миотония атрофика от Steinert през 1909 г. Клинично миотоничната дистрофия е класифициран като мускулна дистрофия, въпреки че механизмът на заболяването е различен от този на други мускулни дистрофии. Фамилният модел на унаследяване е подобен на този на миотония конгенита, описана от Thomsen през 1876 г. и на парамиотония конгенита, описана от Eulenburg през 1886 г. Първоначалното описание се базира на засягане на скелетната мускулатура подобно на конгенитална миотония тип Томпсън, но при миотоничната дистрофия се наблюдават още мускулна слабост и атрофия. По-късни клинични проучвания установяват комплексен мултисистемен фенотип, със засягане на очите, сърцето, ендокринната система и централната система (ЦНС), което разграничава МД от недистрофичните миотонии (конгенитална миотония тип Томсън и тип Бекер) и от немиотоничните мускулни дистрофии (тип Дюшен и тип Бекер). Миотоничната дистрофия е мултисистемно заболяване, като обаче първите данни за пределекционното засягане на мускулите, а не на нервната система, са от Denny-Brown и Nevin през 1941 г. Наблюдава се тенденцията заболяването да е с по-тежка изява в следващите поколения, феномена на антиципация, описан от Флайшър през 1918 г.

Мутацията в гена за миотонична дистрофия тип 1 (МД1) е идентифицирана през 1992 г., като експанзия от тринуклеотиден повтор (CTG) в 3' нетранслираната (UTR) област на DMPK гена (DMPK - dystrophia myotonica protein kinase). Мутацията, която е причина за миотонична дистрофия тип 2 (МД2) е идентифицирана през 2001 г. в първия интрон на zinc finger 9 (ZNF9) белтък, кодиращ ген (Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LP.). През 2004 г. Isabelle Le Ber и сътрудници описват случай, който е предложен да се класифицира, като миотонична дистрофия тип 3 (Isabelle Le Ber, 2004). По-късно обаче е характеризирани, като необичайна форма на болестта на Paget (Udd B, Meola G, 2006). Проф. Я. Янков допринася за описанието на болестта с дългогодишен труд върху дистрофичната миотония, отразен в голямата си част в дисертацията: “Дистрофична миотония /клиника, етиология, патогенеза и нозологичен проблем/”. Изследванията са провеждани, със съвременни за времето си, подходи от страна на епидемиологията, биохимията, морфологията и хистохимията, електронната микроскопия, цитогенетиката, електрофизиологията

## **2. ЕПИДЕМИОЛОГИЯ**

Не е известно точното разпределение по честота между МД1 и МД2. Преди идентифицирането на съответните им генетични мутации, комбинираната честота на МД1 и МД2 като цяло се оценява на един на 8000 (12,5 на 100 000 души), въз основа на клиничната диагноза на пациентите. Тъй като вероятно тази оценка се основава най-вече на по-тежко засегнатите пациенти с МД1, то този тип се счита и за най-честата мускулна дистрофия при възрастни (Harper P.S., 2001).

Въпреки това, при различните популации приблизителните оценки за разпространение варират в широки граници. В Италия сред населението от районите около Падова и Северозападна Тоскана, се отчита превес на 9.31 на 100 000 жители (Siciliano G. и съавтори, 2001), като се има предвид, че малко по-висока честота (11,95 на 100 000 души) е била съобщена в Северна Ирландия (Magee A., съавтори, 1999) и по-ниска в Белград (Сърбия) (5.3 на 100 000) (Mladenovic J., съавтори, 2006). В проучване, проведено в еврейските общности, се съобщава за средна честота на 15.7 на 100 000 души, включително 416 пациенти, от които 307 МД1 са били диагностицирани генетично и 109 клинично диагностицирани (Segel R., съавтори, 2003). В същото проучване се докладва, дори по-висока честота в две еврейски подгрупи: 20.0 на 100 000 при сефардими и 47.3 на 100 000 при Yemenite евреи. Сред евреите ешкенази има най-ниската честота с 5,7 на 100 000 души. Сравнително високо разпространение на МД1, се докладва в малък регион Истрия в Хърватия (18.1 на 100 000 души), на базата на клинично установяване и генетичното потвърждение (Medica I., съавтори, 1997). Най-висока, позната до момента честота е докладвана във френско-канадското население (1 на 475), въз основа на ефекта на основателя (founder- ефект) (Bouchard G., и съавтори, 1989). От неевропейски популации са наблюдавани много по-ниски темпове на разпространение, например честота от 0,46 на 100 000 души в Тайван, оценена въз основа на пациентите и семействата МД1, идентифицирани чрез генетичен анализ през 1990-2001 (Hsiao K.M., съавтори, 2003; Ashizawa T., съавтори, 1991). За периода 1975/1976 г. професор Янков в дисертационния си труд, разглежда заболяването чрез клинични подходи, с популационно

разпределение на заболяването по окръзи, като епидемиологичните му данни, сочат, че българската популация на дистрофична миотония се установява като средна – 4,957 +/- 0,240 на 100000 жители. Авторът съобщава и за неравномерно разпределение на дистрофичната миотония, което отдава на характерната за доминантните заболявания огнищност (семейства със заболяването създават по-голяма гено-географска гъстота), както и на засилените миграционни процеси на населението на България.

Честотата на МД2 остава неизвестна поради обхвата на клиничната тежест. Въпреки че са проведени едва няколко окончателни демографски изследвания, разпространението изглежда се различава в различни популации. По-висока честота на МД2 се наблюдава в Германия и Полша, и при индивиди от немски или полски произход (Udd B., съавтори, 2003). Във Финландия, честотата на МД2 (1:1830) е по-висока от тази на МД1 (Suominen T., съавтори, 2011). За МД2 се докладва в Афганистан и Шри Ланка, но не и в Китай, Япония, или Субсахарска Африка. Bachinski L.L, и съавтори считат, че поради общият наследствен хаплотип на основателя /founder-хаплотип/ при всички пациенти с МД2 от кавказката популация (Bachinski L.L, съавтори, 2003), няма априори причина да се очаква честотите на МД2 мутацията да бъдат силно променливи в различните европейски популации.

### **3. КЛИНИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА МИОТОНИЧНА ДИСТОРФИЯ ТИП 1**

МД1 е едно от най- променливите наследствени заболявания при човека, като фенотипната експресия варира от асимптомни възрастни до сериозно засегнати новородени с вродено начало на

заболяването (Harper P.S., съавтори, 2001).

### 3.1. Форми на заболяването:

Според възрастта на началото и тежестта на симптомите, основните клинични форми на МД1 са: с късно начало, класическа (умерена, с начало в зряла възраст), с начало в детска/ювенилна възраст и вродена форма (Harper P. S, съавтори, 2001; Udd В., съавтори, 2012). Въпреки че всяка форма представя конкретни клинични характеристики, няма абсолютно разграничение между тях, и те по-скоро образуват континуум.

МД1 форма с начало в зряла възраст най-често е с обща възраст на начало през второто или третото десетилетие от живота и клинична картина типична за МД1 (P.S. Harper, съавтори, 2001; Udd В., съавтори, 2012). Мускулните симптоми включват прогресивна мускулна дегенерация, водеща до слабост и загуба на мускулна маса на лицето, шията и дисталните мускули на крайниците, с обхващане на по-късен етап и на проксималните мускули на крайниците и тялото. Миотонията, клинично е представена като забавяне на релаксацията при нормална мускулна контракция, обикновено засяга дисталните части на крайниците, както аксиални и мускули в областта на главата. Най-честите системни усложнения са катаракта, сърдечни нарушения в проводимостта и аритмии, ендокринни, стомашно-чревни и дихателна дисфункция, челно оплешивяване, периферна аксонна невропатия, невроповеденчески прояви и когнитивно нарушение (Harper P.S., съавтори, 2001; Delaporte С., 1998). Продължителността на живота е значително намален при пациенти с начало в зряла възраст, особено тези с ранна поява на симптомите, като най-честите причини за смърт са пневмония и сърдечни аритмии (de Die-Smulders С. Е. М., съавтори, 1998; Mladenovic J., съавтори, 2006).

Наличието на по-голям брой повтори може да доведе по-ранно начало и по-тежка изява на симптомите, познато като конгенитална форма на МД1 (De Temmerman N, съавтори, 2004; Rakosevic-Stojanovic V, съавтори, 2005).

Почти винаги преноса на по-голям брой повтори се осъществява чрез майката, въпреки че има данни за трансмисия и по бащина линия (Zeesman S, съавтори, 2002).

### 3.1.1 Вродена форма на МД1:

Това е най-тежката форма и често се проявява още вътреутробно с полихидрамнион и с намалени фетални движения. След раждането, основните характеристики са тежка генерализирана мускулна слабост, хипотония и дихателни нарушения. При засегнатите новородени се наблюдава типичната обърната, V-образна горна устна, наречена още „палатковидна” или ”рибешка” уста, която е вследствие на значителна лицева слабост. Най-честата причина за смърт е дихателната недостатъчност. При тези които оцеляват постепенно се подобрява моторната функция, като децата прохождат, а на по-късен етап се изявява и типичната за класическата форма, прогресивна миопатия (Harper P.S., 2001). При тях може да се развият всеки един от типичните симптоми за МД1 слабост, миотония, катаракти и сърдечни нарушения. Интелектуално затруднение присъства в 50% - 60% от индивидите с вродена МД1. Причината за това е неясна, но още след раждането се визуализират мозъчна атрофия и вентрикулна дилатация. Интелектуалното нарушение може да е резултат от комбинацията между началната дихателна недостатъчност и директния ефект на DMPK мутацията върху мозъчните структури (Spranger M, съавтори, 1997; Ekström A.B, съавтори, 2009). При вродената форма

МД1 може да се наблюдава нарушение от аутистичния спектър (Ekström A.B, съавтори, 2008). Douniol M. и съавтори, (Douniol M, съавтори, 2012) докладват чести нарушения в настроението, тревожност, нарушение на вниманието, както и необичайни визуално-пространствени способности. Деца с МД1 могат да имат ниска зрителна острота, далекогледство или астигматизъм (Ekström A.B, съавтори, 2010).

Възрастните индивиди с вродена форма са с 50% редуцирана преживяемост след третата декада. Бифазовото представяне на вродената форма и етиологията на първоначалната хипотония, както и свързаните с това проблеми, са все още недобре проучени.

В продължение на много години се счита, че вродената форма може да бъде унаследена само от майка с МД1, но след въвеждане на молекулярния анализ, доказващ експанзия в предполагаеми носители, става ясно, че конгениталната форма на МД1 макар и в много по-редки случаи, може да бъде унаследена и по бащина линия (Bergoffen J., съавтори, 1994; Nakagawa M., съавтори, 1994; De Die-Smulders C.E., 2004; Zeesman S., съавтори, 2002).

3.1.2 Формата на МД1 в детска възраст се проявява между една и десет години и по-ясно се свързва с когнитивни и поведенчески отклонения, като например трудности в обучението и социализацията в училище (Echenne B., съавтори, 2008). В юношеството, миотонията често присъства в клиничната картина като може да се развие и дистална мускулна слабост. През второто десетилетие от живота, при лица с начало на заболяването в детството се явяват много от симптомите, наблюдавани при формата с начало в зряла възраст.

3.1.3 Формата на МД 1 с късно начало се представя след петото десетилетие от живота само с леки симптоми, които често остават незабелязани от пациентите (Arsenault M. E., съавтори, 2006). Катаракта и фронтално оплешивяване могат да бъдат единствените симптоми. Мускулната слабост може да е късна проява, а миотонията да бъде установена само чрез електромиография.

#### 3.1.4 Умерената форма на МД1:

Индивиди с умерена форма на МД1 могат да проявят заболяването само под формата на умерено изразена миотония, катаракти или захарен диабет. При тази форма пациентите могат да имат напълно активен живот с нормална или минимално скъсена продължителност на живота (Arsenault M.E, съавтори, 2006).

#### 3.1.5 Класическа форма на МД1.

В рамките на този диапазон на размера на СТG повторенията, съществува само груба корелация с тежестта на симптомите. При индивиди с размери на СТG повторенията в диапазона от 100 до 1000 обикновено се развиват класически МД1 с мускулна слабост и хипотрофии, миотония, катаракти, както и често сърдечни проводни нарушения. Въпреки че възрастта на начало за класическата форма на МД1 е обикновено в 20-те и 30-те години (и по-рядко след 40 години), класическата МД1 може да бъде проявена и в детството, когато се наблюдават едва доловими признаци като миопатен фациес и миотония.

## 3.2. Системи на засягане:

### 3.2.1 Мускулна система.

Характеристиката на скелетната мускулатура и при двата типа МД включва прогресивна слабост, дистрофични промени при мускулна биопсия и миотония. Мускулна болка може да има и при двата типа МД. Класическият модел на мускулна слабост при МД1 включва лицеви мускули – птоза без офталмопареза, слабост при затваряне на очите и устата; дъвкателни мускули, темпорални мускули; шийни флексори и дистална мускулатура на горни крайници – дълбоки флексори на палеца и на латералните пръсти, повече отколкото на медиалните. С прогресията на заболяването има типично засягане на трицепса и дорзифлексорите на стъпалото. На по-късен етап могат да бъдат обхванати и раменният пояс и тазобедрената мускулатура; също така се развива дифузно изразена слабост на булбарна, вентилаторна и мускулатура на тазовото дъно. Като най-ранен и най-чест компонент на заболяването се приема атрофията на воларната част предмишницата - тенар, хипотенар (Янков, Я., 1977; Day J.W., съавтори, 2003). Миотоничните прояви са по-изявени при МД1 отколкото при МД2, но като цяло са по-слабо изразени от тези, наблюдавани при хлорните каналопатии. Миотоничният феномен (при перкусия и при свиване на ръката в юмрук) е по-отчетлив при МД1, като електрофизиологичната миотония се наблюдава при почти всички пациенти в зряла възраст и при двете форми на МД. При повтарящи се контракции, при свиване на ръката в юмрук, намалява миотонията, подобрява се мускулната сила, т.нар. феномен

на „загриване” (Logigian E.L, съавтори, 2005). Този феномен може да подобри и дизартричният говор (de Swart VJ, съавтори, 2004). Клиничната и електрофизиологична миотония липсват при деца с конгенитална форма на МД1. От електромиографията и при двата типа МД, миотонията не е единствената абнормна спонтанна активност, установяват се също така и фибрилационни потенциали, които обаче са по-скоро вторични, вследствие на директното засягане на скелетната мускулатура, а не белег на денервация или моторна невропатия (Day J.W., съавтори, 2003; Harper P.S., 2001). Някои автори (Khoshbakht R., съавтори, 2013), изследват зависимостта между размера на експанзията и електромиографската находка за миогенна увреда, но при изследваните от тях пациенти с МД1 не се открива такава. Хистологичната находка при МД1 и МД2 е сходна и неспецифична. При двете заболявания засегнатата мускулатура се характеризира със значително нарастване на разликите в диаметъра на мускулните влакна, вариращи, от 10 до 100 мкр. Тежко атрофиралите мускулни влакна имат пикнотични ядра с минимални остатъчни контрактилни елементи и са сходни със засегнатите мускулни влакна при неврогенна атрофия. При МД1 е налице типична атрофия на мускулни влакна тип 1 (Vihola A., съавтори, 2003).

### 3.2.2. Сърдечна система.

Проводни нарушения в сърдечната система са признати като важен компонент на МД1 фенотипа. Тези дефекти са сериозна причина за преждевременна, понякога и за внезапна смърт при МД1. По-рядко може да възникне кардиомиопатия (Bassez G, съавтори, 2004; Chebel S, съавтори, 2005; Dello Russo A, съавтори, 2006; Gagnon C,

съавтори, 2013; Sovari A.A, съавтори, 2007; Breton R, съавтори, 2009; Mörner S, съавтори, 2010; Petri H, съавтори, 2012; Turkbey E.B, съавтори, 2012). Правени са много опити да се намери възможна корелация между броя на STG повторите и тежестта на клиничните прояви на МД1. Въпреки предходни противоречиви резултати, се натрупват все повече доказателства в подкрепа на корелация между сърдечното усложнение и STG експанзията (Antonini G, съавтори, 2006; Arsenault M.E, съавтори, 2006; Awater C, съавтори, 2012) Всъщност изглежда броят на STG повторите, като цяло имат отношение към времето на поява, на сърдечните усложнения (Bae J.S, съавтори, 2008), предвиждането за наличие и прогресия на ЕКГ аномалиите (Awater C, съавтори, 2012), както и риска от големи сърдечни инциденти (Bassez G, съавтори, 2004), но чрез тях не могат да предскажат абнормните резултати от електрофизиологичното изследване (Bellini M, съавтори, 2006). Анализът на STG повторенията е с ограничена предиктивна стойност при отделните пациенти, поради припокриването между размерите на експанзията, наблюдавани в различни фенотипни групи, соматичният мозаицизъм и поради факта, че ДНК анализът на STG повторенията се извършва чрез левкоцити от периферната кръв, вместо от напречнообразените мускули и сърдечния мускул (Antonini G, съавтори, 2006). Данните за локализация на DMPK в интерцилираните (вмъкнатите) дискове на сърдечния мускул, наред с изследвания на животински модели с редукцията на DMPK, са доказателство за смутено провеждане, както на ниво атриовентрикуларен възел така и на ниво Хис-Пуркиние системата (Argov Z, съавтори, 2009) Това предполага увреждане на импулсната междуклетъчна пропация като възможен механизъм на болестта.

С цел проучвания на патологичните механизми при сърдечните нарушения, са проведени ендомиокардни биопсии и аутопсии, върху пациенти с МД1, които документират различни степени на неспецифични промени, като интерстициална фиброза, мастна инфилтрация, хипертрофия на миокардиоцити и фокален миокардит. Най-често се наблюдава селективно и обширно увреждане на проводната система (Breton R, съавтори, 2009). По време на 10 годишно проследяване на 367 пациенти МД1 (Annane D, съавтори, 2006), смъртността е била 7.3 пъти по-висока от тази в същата възраст сред населението, като средната възраст на настъпване на смъртта е 53 години и се наблюдава положителна корелация между възрастта на начало на МД1 и възрастта на смъртта. В тази серия, дихателната недостатъчност и сърдечно-съдовите заболявания са най-разпространените причини за смърт, което съответно представлява около 40% и 30% от смъртните случаи. Сърдечната смъртност настъпва поради прогресивна левокамерна дисфункция, исхемична болест на сърцето, белодробна емболия, или в резултат на неочаквана внезапна смърт. Относителният дял на внезапна смърт варира от около 2-30% в различните публикувани серии, в съответствие с критериите за подбор. Хипотезата, че сърдечните аритмии могат да представляват най-разпространените причина за внезапна смърт при пациенти МД1, се поддържа от липсата на други причини за внезапна смърт при аутопсионните проучвания. Внезапната сърдечна смърт може да бъде причинена от камерна асистолия, камерна тахикардия, камерно мъждене или електромеханична дисоциация. Доказателствата за дегенерация на проводната система при МД, генерират хипотезата, че брадиаритмията вероятно е най-разпространеният механизъм в

основата на внезапната смърт. Въпреки това, камерните тахиаритмии са все по-често определяни като всеобща причина при тези пациенти, което може да обясни някои случаи на внезапна смърт след имплантиране на пейсмейкър (Annane D, съавтори, 2006).

При МД1 сърдечното заболяване е често, но е трудно да се определи точно неговото разпространение, като в литературата са използвани различни дефиниции. Невромускулните промени обикновено са първоначалната клинична проява на МД1 (със или без субклинично сърдечно участие), но понякога сърдечните симптоми могат да се проявят първи. Сърдечното усложнение се характеризира с нарушения в проводимостта, надкамерни и камерни аритмии и по-рядко, миокардна дисфункция и исхемична болест на сърцето. В противоречие с други нервно-мускулни заболявания, пациентите с МД1 рядко имат явни клинични прояви на кардиомиопатия - "миотонична" болест на сърцето (Canavese F, съавтори, 2009). Нарушенията в проводната система на сърцето при МД1, могат да обхванат всяка една нейна част, но най-често ангажирана е Хис- Пуркиние системата. При асимптоматични МД1 пациенти, в ранните стадии на болестта, често присъстват, в 12 каналната ЕКГ, незначителни нарушения на проводимостта. Прогресията им към по-тежките нарушения на проводимостта може да предизвика недостиг на въздух, виене на свят, прилошаване, синкоп, и внезапна смърт. Скоростта на прогресия на проводните нарушения обикновено е бавна (Cerghet M, съавтори, 2008), но при отделни пациенти се наблюдава и бързо прогресиране, което прави клиничното протичане по-скоро непредвидимо. Забавената пропация на импулса по проводната система може да бъде свързана с

удължения PR интервал (честота в диапазона от 20-40% в различни изследвания, в зависимост от критериите за подбор на пациентите) и/или с широк комплекс QRS (честота в диапазона 5-25% в различни проучвания, в зависимост от критериите за подбор на пациентите). За съжаление, наличието на удължен PR интервал не дава никаква представа за мястото на забавяне на проводимостта, тъй като това може да се случи на всяко ниво от атриума, към снопчето на Хис, през атриовентрикуларния възел. Въпреки това, когато е налице и един широк QRS (например ляв или десен бедрен блок), вероятността от блок в проводимостта под снопчето на Хис е по-висока (Breton R, съавтори, 2009; Chebel S, съавтори, 2005).

При пациенти с МД1, анализът на късните потенциали има важна стойност. Късните потенциали са израз на забавено миокардно активиране, обикновено вследствие на абнормна тъкан (например, фиброза на миокарда или некроза, които се наблюдават при исхемична болест на сърцето след инфаркт на миокарда), и се разглеждат като предиктори на вентрикуларни аритмии. Забавеното миокардно активиране при МД1 не е следствие на нехомогенна проводимост през разпръснати области на фиброза, а по-скоро на забавено активиране по Хис-Пуркиние системата (Cigliano B, съавтори, 2005). Абнормните късни потенциали по-този начин са прояви на дефект в проводимостта, както и представляват важна неинвазивна представа за наличието на удължен HV интервал (времето, за което импулса преминава през Хис-системата).

При пациенти МД1, надкамерните тахиаритмии са честа находка на 12 канална ЕКГ или на 24 часа Холтер мониторинг, и могат да бъдат асимптомни. Най-често срещаните аритмии са предсърдно мъждене или фибриляция, наблюдавани при 25% от пациентите.

Предсърдното мъждене и предсърдната тахикардия са лесно индуцируеми при електрофизиологични изследвания /EPS/, дори при липса на документирани предходни, спонтанни епизоди, трябва обаче да се отбележи, че клиничното значение в случая е все още непотвърдено. Камерните аритмии са чести. Описани са дори спонтанни епизоди на двете мономорфна и полиморфна камерни тахикардия и фибрилация (Cobo A.M, съавтори, 1995). Затова при пациенти с клинични симптоми, предполагащи наличието на камерна тахикардия (например липотимия, синкоп) и/или с фамилна анамнеза за внезапна смърт, електрофизиологично изследване е силно препоръчително (Bassez G, съавтор, 2004; Bellini M, съавтори, 2006). Прогнозната стойност на индуцирана камерна тахикардия при пациенти без анамнеза за спонтанни епизоди и без симптоми, правят предположението за камерна тахикардия несигурно. При пациенти с МД1 може да се наблюдава камерна тахикардия с участие на проводните бедра или тип bundle branch re-entry (BBRVТ), вследствие на забавяне в провеждането по снопа на Хис (Cudia P, съавтори, 2009). Явната сърдечна дисфункция (миотонично сърдечно заболяване) не се среща често, но могат да бъдат открити субклинични и леки сърдечни нарушения. Симптомите на сърдечна недостатъчност са редки поради ограниченото ниво на активност на пациентите и затрудненията в съобщаването на симптомите, вследствие на умствена изостаналост. Наличието на сърдечен еквивалент на миотонията в скелетната мускулатура (миокардна миотония) е била потвърдена от оценка на Доплер-ехо параметрите на диастолната функция (Dauvilliers Y.A, съавтори, 2012). Ишемична болест на сърцето понякога е наблюдавана като хронична стабилна стенокардия, нестабилна стенокардия и остър миокарден инфаркт . Микроваскуларна дисфункция също се описва

при пациенти с МД1, страдащи от болки в гърдите, показващи положителна талий сканиране и нормални коронарни артерии (Day J.W, съавтори, 2005). Пропалс на митралната клапа се съобщава при 25-40% от МД1 (Breton R, съавтори, 2009). Хипертрофична кардиомиопатия и левокамерна хипертрабекулация са описани в отделни случаи.

### 3.2.3. Дихателна система.

Невромускулните клинични прояви на болестта включват миотония и прогресираща мускулна слабост, с дистрофични промени в скелетните мускули, включително на диафрагмата, краниалните мускули и мускулите на крайниците (Harper, P. S., 2001). Дихателни и сърдечни проблеми, които са доказани като усложнения, са и основните фактори, допринасящи за смъртността при пациенти с МД1. В изследване, базирано на кохорта от 115 пациенти с вродена миотонична дистрофия, се докладва преживяемост до третото десетилетие на само около 50% от пациентите, като причините за смъртност, при около 66% от тях, се дължат на респираторни усложнения (Reardon, W., съавтори, 1993). Други по-големи кохортни проучвания сочат дихателните нарушения като водеща причина за смърт (около 40%) при МД1 в зряла възраст (de Die-Smulders C. E., съавтори, 1998; Groh W. J., съавтори, 2008; Mathieu J., съавтори, 1999). Прогресивната дихателна мускулна слабост води до смущение в прочистването на дихателните пътища, недостатъчна вентилация и дихателна недостатъчност (Berry J. K., съавтори, 1996), при липса на редукция в калибъра на централните дихателни пътища при МД1 с начало в зряла възраст (Fodil, R., съавтори, 2004). При тези пациенти, особено в по-късните етапи на

заболяването, често се развиват пневмония и дихателна недостатъчност в резултат на алвеоларна хиповентиляция (Bogaard J. M., съавтори, 1992; Jammes Y., съавтори, 1986). Въпреки многобройните клинични изследвания, показващи, дихателна недостатъчност при МД 1 пациентите, все още не са напълно известни патологичните механизми, лежащи в основата на това нарушение. Няколко проучвания показват, че причините за дихателна недостатъчност са разнообразни и може да се дължи както на ангажиране на дистрофични и миотонични промени в дихателните мускули (Bogaard J. M., съавтори, 1992; Jammes, Y., съавтори, 1985; Serisier D. E., съавтори, 1982; Zifko U. A., съавтори, 1996), така и на аномалии в нервната система, генерираща и контролираща дихателния процес (Kilburn K. H., съавтори, 1959; Ono S., съавтори, 1996; Takasugi T., съавтори, 1995). Достъпът до засегнатата тъкан при невродегенеративните заболявания при хора, е като цяло ограничен до крайния етап на болестта и се свежда до провеждане на биопсии, това прави животинските модели изключително полезни (Gomes-Pereira M., съавтори, 2011; Wansink D.G., съавтори, 2003). Panaite и съавтори (Panaite P., съавтори, 2013) анализират DMSXL трансгенни мишки, животински модел на вродената форма на МД1. Установяват при DMSXL мишките нарушена дихателна функция, патологични промени в мускулните влакна и в диафрагмалните невромускулни връзки, както и намален брой аферентни миелинизирани нервни окончания на френикуса. В резултатите си като основна причина за дихателната недостатъчност, те разкриват освен нарушената връзка между диафрагмалните мускулни влакна и нервните окончания, също така и дисрегулацията на дишането.

Характерни за заболяването, но с по-късна изява са хиперсомнията и сънната апнея (Rubinsztein J.S, съавтори, 1998; Laberge L, съавтори, 2009). Експесивната дневна сънливост се счита че е вследствие на централна дисфункция на регулацията на съня, при МД1 са наблюдавани също така нарушения на съня и от друго естество (Dauvilliers Y.A, съавтори, 2012). Pincherle и съавтори изследват кохорта от МД1 пациенти и наблюдават при 50 % от тях обструктивна сънна апнея (Pincherle A, съавтори, 2012).

#### 3.2.4. Гастроинтестинална система.

Засягането на стомашно-чревната система е често наблюдавана при пациенти МД и храносмилателните оплаквания могат да бъдат първият признак на заболяването. Според Ronnblom и съавтори (Ronnblom A, съавтори, 1999), 25% от пациентите считат, техните стомашно-чревни проблеми, като най-затрудняваща активността им последица от заболяването, 28% имат изява на храносмилателни симптоми до десет години преди проявата на типичните мускулно-скелетни характеристики. Гастроинтестиналните функции могат да се засягат постепенно и пациентите да се адаптират към тях с компенсаторни механизми, като по този начин се замаскират симптомите (Costantini M, съавтори, 1996; Bellini M, съавтори, 1995), като може да се наблюдава дори развитие на по-висок праг на болка (висцерална хипоалгезия), подобно на диабетната гастропареза (Bortolotti M., съавтори, 1996). Засягане на гладките мускули води до дисфагия , запек , чревна псевдо - обструкция, или диария (Bellini M, съавтори, 2006). Ercolin и съавтори разглеждат орофарингеалната дисфагия и проблемите с преглъщането при пациентите с МД 1 (Ercolin B, съавтори, 2013). Камъни в жлъчката се

появяват в резултат на увеличаване на тонус на сфинктера на жлъчния мехур. Изследвания на чернодробната функция, установяват чест повишаване на стойностите на трансаминазите, но причините са все още неизяснени (Heatwole C.R, съавтори, 2006). Установена е слаба корелация между степента на скелетните мускулни увреждания и стомашно-чревните смущения (Modolell I, съавтори, 1999; Horowitz M, съавтори, 1987), докато изглежда да има връзка между тежестта на гастроинтестиналното засягане и продължителността на заболяването (Bellini M, съавтори, 2002). Въпреки това, патофизиологичните механизми на храносмилателните моторни нарушения показват наличието на увреждане на набраздени мускули в горните и долните части на стомашно-чревния тракт. Инсуфициентни и противоречиви са хистологичните доказателства за увреждане на гладките мускули (Modolell I, съавтори, 1999; Horowitz M, съавтори, 1987). Въпреки това други автори поддържат хипотезата, че засягането на гладката мускулатура може да се появи по-рано и да е по-тежко, отколкото промените в набраздената мускулна тъкан (Nowak TV, съавтори, 1982). Нещо повече, някои автори предполагат като общ механизъм генерирането на двигателни аномалии на гладките и набраздените мускули. Lecoïnte и съавтори (Lecoïnte-Besancon I, съавтори, 1999) анализират хранопровода и ректоаналната област при пациенти с МД и установяват, че промяната в гладката мускулатура е тясно свързана с тази в набраздената мускулна тъкан, поне що се отнася за храносмилателния тракт.

### 3.2.5. Зрителна система

Поради слабост на лицевите мускули, включително m. levator

palpebre и m. maseter много е характерно наличието на миотоничен феномен и „фациес миотоника“, водещи до птоза и т.нар „hatchet appearance“. Офталмоплегия се наблюдава по-рядко, като слабостта на очните мускули може да доведе до диплопия или дисконюгирани очни движения (Markowska E., съавтори, 2006; Rosa N, съавтори, 2009; Lanza M, съавтори, 2009).

Много характерен и специфичен симптом е наличието на катаракта, която се наблюдава при 95% до 100% от пациентите. Описани са няколко вида катаракта при това заболяване, като най-характерна е многоцветната катаракта, под формата на „Iridescent dust“ – „Многоцветен прах“ или под формата на много типичната катаракта за това заболяване тип „Christmas tree cataract“ – „Коледно дърво“ ( Kaliman P., съавтори, 2008; Kesler A., съавтори, 2008; Rosa N, съавтори, 2009; Yamashita T., съавтори, 2004). Описани са още и задна субкапсуларна катаракта, наблюдавана с честота 38% -40 %, и нарастваща с възрастта на пациента. По-рядко са описани „flecks cataract“, точковидни сивкави опацитати в кортекса на лещата, като има докладвани случаи на катаракта като единствен клиничен признак за заболяването (Markowska E., съавтори, 2006; Reiter C, съавтори, 2009; Zalewska R., съавтори, 2005). В началото катарактата не засяга сериозно зрението, но в хода на годините може да се наложи оперативното ѝ отстраняване. Атипичният пигментен ретинит се наблюдава рядко, но е признак, насочващ към тази диагноза. За разлика от типичния пигментен ретинит, той е в задния полюс, има бенигнен ход и не влошава зрителната острота (Amber C., съавтори, 2010; Giraudet S., съавтори, 2010; Kim U. S., съавтори, 2009; Kimizuka Y., съавтори, 1993). В литературата са описани различни находки на пигментни промени в ретината при

това заболяване. Наблюдавана е географски тип на депигментация на ретиналния пигментен епител и пигментни струпвания, ретикуларен тип дистрофия, както и промени описани като „spider dystrophy“, при която зоните на хиперпигментация и депигментация са в задния полюс под формата на „паяк“ или „butterfly-shaped dystrophy“ (Amber C., съавтори, 2010; Giraudet S., съавтори, 2010; Kim U. S., съавтори, 2009; Kimizuka Y., съавтори, 1993). Характерен е бенигният ход на атипичния пигментен ретинит при това заболяване, като никога не се достига до тежките периметрични дефекти и функционален дефицит, характерен за пигментния ретинит. Електроретинограмата е много важно изследване по отношение верифицирането на атипичния пигментен ретинит. При пациенти с миотонична дистрофия, е установено типичното за това заболяване намаляване на амплитудата на b – вълната (Kim U. S., съавтори, 2009).

### 3.2.6. Ендокринна система

При МД2 и МД1 пациенти се наблюдават изменение във функцията на тестисите като хипогонадизъм и олигоспермия (Antonini G, съавтори, 2011), ниски нива на тестостерон (Т), понижена сперматогенезата (Vazquez J.A, съавтори, 1990). В действителност, хипогонадизмът може да бъде причина и за еректилна дисфункция (ЕД), което е доказано в 25% от пациентите с МД1 (Gomez Saez J.M, съавтори, 1994). Появата на ЕД зависи от възрастта на пациента, но може да бъде свързана с други фактори присъщи на МД1 като продължителност и тежест на болестта и СТГ експанзията (Mastrogiasomo I, съавтори, 1996; Mahadevan M, съавтори, 1992). Също така, при тези пациенти се отчитат повишени нива на

фоликуло-стимулиращ хормон (ФСХ) и понижено ниво тестостерон в сравнение с контролни групи (Vazquez J.A, съавтори, 1990; Gomez Saez J.M, съавтори, 1994; Vazquez J.A, съавтори, 1990). Атрофия на тестисите е една от най-важните характеристики при около 80% от пациентите МД1 (Mastrogiasomo I, съавтори, 1996; Griggs RC, съавтори, 1986). Тестисите на пациенти с МД1 се характеризират с увеличаване на броя и размера на Лайдиговите клетки, както и атрофия на тубулите, хиалинизиране, фиброза на семенните каналчета и намалена сперматогенеза. Съобщава се, че 46% от пациентите с МД имат данни за интерстициална гонадна недостатъчност (Mastrogiasomo I, съавтори, 1996; Antonini G, съавтори, 2011). Пациентите с миотонична дистрофия имат изменения в метаболизма на глюкозата, и е докладвано, че при тях може да има ранна проява на инсулинова резистентност (Matsumura T, съавтори, 2009). Инсулиновата резистентност е основната причина за глюкозен интолеранс при МД1. Вследствие на това хиперинсулинемията е вид компенсаторен механизъм и по-късно може да доведе до появата на захарен диабет (Matsumura T, съавтори, 2009; Aitkens S, съавтори, 2005).

Въпреки това, честотата на диабет при пациенти МД1 не е доказана. Загуба на мускулна маса и ниската физическа активност може да влоши инсулиновата резистентност и да доведе до дисрегулация на белтъчния катаболизъм (Björntorp P, съавтори, 2000). Чрез някои хипотези се опитва да се намери обяснение на молекулно ниво за инсулинова резистентност при пациенти МД. Една от хипотезите е по отношение на инсулиновите рецептори и двете съществуващи изоформи: изоформа (IR-A), при която липсва екзон 11 и изоформа B (IR-B), която включва екзон 11 (Savkur RS, съавтори, 2001).

Инсулиновия рецептор В (IR-B) преобладава в инсулин-чувствителни тъкани като скелетните мускули. Интересното е, че пациенти с МД1/МД2 експресират предимно инсулинов рецептор тип А изоформа (IR-A) в скелетната мускулатура (Moller D.E, съавтори, 1989). При хистологична оценка на МД мускулни биопсии, е доказано, че промените в сплайсинга на инсулиновият рецептор предхождат хистологичните аномалии (Savkur R.S, съавтори, 2001). Резултатите показват, че промените в сплайсинга възникнат преди развитието на дистрофични промени, и този абнормен сплайсинг може да бъде резултат на нарушеното РНК-свързване поради експанзията на CUG в DMPK ген (Matsumura T, съавтори, 2009; Moller D.E, съавтори, 1989). Друго нарушение, свързано с метаболизма на глюкозата е абнормната секреция на инсулин при пациенти с МД и нормална чувствителност към инсулин (Matsumura T, съавтори, 2009). Предполага се увреждане на профила на  $\beta$ -клетъчната секреция. Това увреждане е представено от повишени плазмени концентрации на проинсулин и значително по-висока от нормата ранна секреторна реакция след орален глюкозотолерантен тест при МД1 пациенти (Walsh J.C, съавтори, 1970; Perseghin G, съавтори, 2003). Една вероятна причина за абнормната инсулинова секреция може да бъде свързано и с протеин-киназата и експанзията на CUG в DMPK гена (Perseghin G, съавтори, 2003). Протеин-киназа, е включен в модулирането на  $Ca^{+2}$  хомеостазата на калциевите йони/  $Ca^{+2}$  / в скелетните мускулни клетки, и хомеостазата на  $Ca^{+2}$ , която е от решаващо значение за  $\beta$ -клетъчната секреция (Bertuzzi F, съавтори, 1999). Ако промяната в калциевия метаболизъм на скелетните мускули също така засяга и  $\beta$ -клетката, тогава абнормната секрецията на инсулин, може да бъде свързана с

нефункциониране на протеин-киназата при МД1 (Bertuzzi F, съавтори, 1999 ).

### 3.2.7. Нервна система

Съществуват достатъчно доказателства за засягане на ЦНС при миотонична дистрофия тип 1 и 2 , макар и по-леко при тип 2 (Machuca-Tzili L, съавтори, 2005). При МД тип 1 и 2 са описани умствено изоставане, дизекзекутивни прояви, отбягващо поведение и интроверзен тип личностови черти, които се влошават с възрастта (Meola G, съавтори, 2003; Gaul C, съавтори, 2006; Modoni A, съавтори, 2008; Weber Y.G, съавтори, 2010). Сънливост и умора са сред основните оплаквания при МД тип 1 и 2 (Giubilei F, съавтори, 1999; Laberge L, съавтори, 2009a; Laberge L, съавтори, 2009b; Tieleman A.A, съавтори, 2010). Патогенезата на симптомите от страна на централната нервна система не е напълно изяснена. Неврофибриларна дегенерация, с натрупване в невроните на абнормно модифицирани микротубули - тау протеин, са наблюдавани при пациенти с МД тип 1 и 2 (Sergeant N, съавтори, 2001; Maurage C.A, съавтори, 2005; Itoh K, съавтори, 2010). Аномалната тау експресия, вследствие дисрегулацията на алтернативния сплайсинг, се доказва при МД, което ги определя като подтип на невродегенеративни заболявания, наречени таупатии. (Jiang H, съавтори, 2004; Maurage C.A, съавтори, 2005; Leroy O, съавтори, 2006; Dhaenens C.M, съавтори ,2008; Day J.W, съавтори, 2005; Ghanem D, съавтори, 2009). Засягането на мозъка при МД1 и МД2 е демонстрирано ин виво с помощта на различни техники на неврообразяващата диагностика.

Магнитнорезонансни изследвания разкриха лезии в бялото мозъчно вещество и дифузна мозъчна атрофия при МД тип 1 и 2. Лезиите в бялото вещество, разположени в областта на предните темпорални дялове, представляват характерна особеност при МД1 (Hund E, съавтори, 1997; Kornblum C, съавтори, 2004; Romeo V, съавтори, 2010). На магнитнорезонансната спектроскопия се установява редуциране на клетъчните маркери в окципиталните и темпоропариеталните кортикални области, както и във фронталното бяло вещество на пациенти с МД1 и МД2 (Vielhaber S, съавтори, 2006). Изследвания като единична фотонна емисионна компютърна томография /SPECT/ и позитрон емисионна томография /PET/ демонстрират хипоперфузия и хипометаболизъм на глюкоза във фронталните лобове при МД1, в по-голяма степен отколкото при МД2 (Meola G, съавтори, 1999; Weber Y.G, съавтори, 2010). В областта на целия главен мозък, на пациенти с МД1 и 2, се откриват лезии в бялото вещество, засягащи асоциираните влакна, комисуралните влакна (главно мазолестото тяло) и проектиращите влакна в мозъчния ствол, вътрешна и външна капсули, последната свързва префронтална и темпорална зони на кората със стриатума. Таламокортикалните пътища (напр. предната таламична радиация) и префронтални връзки, разположени в предните бедра на вътрешните капсули, са засегнати при МД 1 и 2 пациенти. Интересното е, че лезиите в предните бедра преди са се тълкували в контекста на поведенческите проблеми и когнитивната дисфункция (Mamah D, съавтори, 2010). Централните моторни пътища (например кортикоспиналните пътища, разположени в задните бедра на вътрешните капсули) са предимно засегнати при МД1. Minnerop и съавтори (Minnerop M., съавтори, 2011), показват, че увредата на

мазолестото тяло не е само налице при конгениталната форма на МД1. Наскоро (Minnerop M., съавтори, 2008) се демонстрира в проучване на пациенти с МД2, основно засягане на предните влакна на мазолестото тяло, свързващи фронталните дялове. Minnerop и съавтори (Minnerop M., съавтори, 2011) също така откриват дегенерация на основните пътища на лимбичната система (напр. формикс, цингулум) по-изразена при МД1 пациенти, в сравнение с МД2 пациенти. Това откритие би могло да се асоциира с поведенческите отклонения и емоционалните смущения, наблюдавани при миотоничните дистрофии. Лезиите в бялото вещество и атрофията на мозъка са добре познати при МД тип 1 и тип 2, но съвременни данни подчертават, че подлежащият патологичен процес, засяга в по-голяма степен бялото вещество, отколкото сивото (II), както и ангажирането на бялото вещество е отвъд границите, видими на T2-секвенцията на МРТ. Тези данни поставят миотоничната дистрофия в нарастващата група на мозъчни разстройства, дължащи се на дисконекция. Невропатологичната причина за промените в бялото вещество при МД1 е все още не напълно изяснена. Автори като Ota и съавтори (Ota M, съавтори, 2006), предлагат Валеровата дегенерация като основна причина за увредата на бялото мозъчно вещество при МД1. Загуба на корово сиво вещество се открива в областта на челен и париетален дял, докато субкортикално се засягат структурите на таламуса и базалните ганглии. Това е в съответствие с литературните данни за обширни кортикални и субкортикални увреди в сивото вещество при МД1 (Antonini G, съавтори, 2004 Weber Y.G, съавтори, 2010). Нарушение на двигателната функция, поради мускулно нарушение,

е един от най-характерните симптоми при миотонична дистрофия тип 1 и 2. Някои автори обаче описват също така и субклинична дисфункция на централната двигателна система при МД1 (Oliveri M, съавтори, 1997; Mitsuoka T, съавтори, 2003). В проучване на МД1 пациенти с функционален ядрено-магнитен резонанс се установяват активационни модели в области на централната двигателна система, наподобяващи на тези при здрави по-възрастни хора (Caramia F, съавтори, 2010). Тези данни доказват увреда във функционирането на централната двигателна система при МД, и евентуално рефлектират върху ускоряване процеса на стареене. Някои проучвания показват корелации на мозъчните морфологични промени с невропсихологични и клинични параметри, включително и с размера на CTG повторите при МД 1 (Ota M, съавтори, 2006; Куо Н.С, съавтори, 2008; Romeo V, съавтори, 2010; Weber Y.G, съавтори, 2010; Wozniak J.R, съавтори, 2011), но резултатите са силно противоречиви и повечето проучвания не успяват да открият подобни зависимости (Kassubek J, съавтори, 2003; Antonini G, съавтори, 2004; Di Costanzo A, съавтори, 2001). Това може да се дължи и на соматичният мозаицизъм на дължината на CTG повторите. Има значителни тъканни вариации в размерите на повторите, със сравнително по-малки размери на експанзиите в кръвта от тези в сърцето или скелетната мускулна тъкан. Факта, че се наблюдава през целия живот, увеличаване в размера на повторите дори и в постмитотични тъкани, подсказва, че размера на повторите в кръвта също може да не корелира с размера на повторите в мозъка и мозъчното засягане. Независимо от това, много изследвания с невроизобразяваща методика са показали по-сериозни

морфологични мозъчни промени при възрастни пациенти с по-големи експанзии (Ota M, съавтори, 2006; Romeo V, съавтори, 2010). В резултатите от невропсихологични изследвания, проведени сред пациенти с МД1 класическа форма и контролни групи, се отчитат разлики в тестовете, отчитащи внимание (Perini G.I, съавтори, 1999), екзекутивни способности (Meola G, съавтори, 2003), зрителнопространствени (Meola G, съавтори, 1999) и аритметични умения (Perini G.I, съавтори, 1999). Winblad S., съавтори (Winblad S., съавтори, 2006) потвърждават тези резултати, като също така показват и значителна корелационна зависимост между пациентите с ниски резултати от определени тестове, измерващи тези умения, и по-големият размер на CTG експанзията, измерена в кръвта. Други автори, вземайки предвид наличието на соматичен мозаицизъм в тъканите при МД1, (Martorell L, съавтори, 2000) оспорват предположението, че броят на CTG повторите, измерен в левкоцитите от периферната кръв, кореспондира с този в мозъка (а оттам и индиректно с когницията). Sergeant и съавтори (Sergeant N, съавтори, 2001) документират наличието на много голям размер на CTG експанзията в мозъчната тъкан на пациенти с МД1, които се характеризират с много по-малък размер на повторите в лимфоцитите. Те също така установяват и наличие на мозаицизъм в различни области на мозъка. Modoni и съавтори (Modoni A, съавтори, 2004) обясняват липсата на корелация между броя на CTG повторите в кръвта и резултатите от невропсихологичните тестове с мозаицизма. При МД1 и 2, увеличената дневна сънливост и умора са често срещани и несвързани с мускулното засягане симптоми

(Hilton-Jones D., 1997; van der Werf S, съавтори, 2003; Meola G, съавтори, 2007; Laberge L, съавтори, 2009a; Laberge L, съавтори, 2009b; Tieleman A.A, съавтори, 2010). Фактори, допринасящи за дневната сънливост, са считани слабостта в орофарингеалните и дихателни мускули, която води до обструктивна сънна апнея и алвеоларна хиповентилация. Нарастващ брой доказателства обаче сочат дисфункцията на ЦНС като първопричина за тази умора, а не толкова прогресиращата дихателна слабост (van der Meché F.G, съавтори, 1994; Park J.D, съавтори, 1995; Rubinsztein J.S, съавтори, 1998; Laberge L, съавтори, 2009a; Laberge L, съавтори, 2009b; Romigi A, съавтори, 2011; Yu H, съавтори, 2011). Разгледана е ролята на хипоталамичния неuropeптид хипокретин-1 по отношение на регулацията на цикъла сън-бодърстване, но данните са все още противоречиви (Martínez-Rodríguez J.E, съавтори, 2003; Ciafaloni E, съавтори, 2008). Умората, определяна като липса на енергия и чувство на изтощение (Shen J, съавтори, 2006), е изразена и общо оплакване при МД1 пациенти (Kalkman J.S, съавтори, 2005; Meola G, съавтори, 2007; Laberge L, съавтори, 2009b; Tieleman A.A, съавтори, 2010). Нарушение в активизиращата ретикуларна система в горната част на мозъчния ствол и/или в нейните кортикални проекции, се обсъждат като свързани със синдрома на хроничната умора (Dickinson C.J., съавтори, 1997). Морфологични промени в мозъчния ствол при МД1, включват неврофибриларни възли 1, телца на Маринеско, както и намаляване на серотонинергичните неврони в nucl. raphe и катехоламинергичните неврони в медуларната ретикуларна формация (Ono S, съавтори, 1987; Ono S, съавтори, 1998a; Ono S, съавтори, 1998b; Oyamada R, 2006).

Интересен е фактът, че разстройствата в съня и апатията са по-чести при МД1 пациенти, при които са открити по-малко неврофибрилерни включвания (Oyamada R, съавтори, 2006). При МД1 пациентите се наблюдават личностови характеристики като отбягващо, obsесивно-компулсивно и пасивно-агресивно поведение (Delaporte C., съавтори, 1998; Winblad S, съавтори, 2005). Тревожност и депресия са също сред често срещаните симптоми при МД1 пациентите, като могат сериозно да влошат качеството им на живот (Antonini G, съавтори, 2006). В по-редки случаи при МД1 наред с мускулната слабост може да се засегне и периферната нервна система, по типа на аксонална периферна невропатия (Krishnan A.V, съавтори, 2006; Bae J.S, съавтори, 2008). Peric и съавтори (Peric S, съавтори, 2013) проучват кохорта от 111 пациента с МД1, като в една трета от тях, при изследвания за нервната проводимост, се установява при белези на невропатия. Авторите установяват асоциация с наличието на ПНП при МД1 и мъжкия пол, възрастта на пациентите, продължителността на заболяването и определени метаболитни параметри. Hermans MС, и съавтори, откриват значителна зависимост между засягането на периферните нерви и мускулната слабост и липсата на Ахилови рефлексии, но не откриват такава с възрастта или с продължителността на невромускулните симптоми (Hermans M.C, съавтори, 2011).

### 3.3 Лабораторни показатели:

Проява на мускулна увреда са и завишените стойности на мускулния ензим креатинфосфокиназа (КФК). При МД1 стойностите на КФК варират от норма до трикратно завишени, разлика от други мускулни дистрофии (Тип Дюшен и тип Бекер,

фацио-скапуло-хумерална мускулна дистрофия). При МД1 се наблюдават завишени стойности на гама-глутамилтрансфераза (ГГТ), което някои автори корелират с налични субклинични чернодробни нарушения (Ronpemaа T, съавтори, 1987; Franzini M., съавтори, 2010). Според други изследвания не се открива подобна връзка, а се акцентира върху възможната роля на оксидативния стрес в патогенезата на МД1, водещ до едновременното нарастване в ГГТ и АОРРs (разширено окисляване протеинови продукти) ( Siciliano G, съавтори, 2005).

Дефектът на клетъчната мембрана, който засяга контрактилитета на жлъчните пътища, се разглежда като етиологична причина за повишените стойности на ГГТ (Achiron A, съавтори, 1998). Други изследвания търсят връзка между стойностите на ГГТ и дисфункцията на хепатоцитите, както и между увеличените стойности на аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза и лактатдехидрогеназа и абнормната скелетна мускулатура при МД1 (Heatwole C, съавтори, 2006). В литературата не се съобщава за зависимост между нарушенията в чернодробните ензими с СТG експанзията, въпреки, че някои автори, като Heatwole и съавтори, търсят зависимост между тежестта на заболяването и нарушените стойности на чернодробният ензим. Те разделят голяма група от МД1 пациенти на такива с лека до умерена степен на засягане от заболяването, като демонстрират абнормни стойности на всички изследвани чернодробни ензимни нива (ЛДХ, ГГТ, АСАТ, АЛАТ и АФ), но не наблюдават зависимост с тежестта на заболяването (Heatwole C, съавтори, 2006).

Хипогамаглобулинемия е наблюдавана при част от пациентите с

МД. Установява се, че ИгГ дефицитът се дължи на нарушение в FcRn-свързания хиперкатаболизъм. Поради редукция в транскрипцията на гени в 3`DMPK гена в хромозома 19, намалява експресията на алфа-веригата на рецепторът- FcRn, свързан с ИгГ катаболизма. Теоретично това може да бъде и причина за ниските серумни нива на ИгГ при МД1 пациентите (Pan-Hammarstrom Q, съавтори, 2003). Авторите Kaminsky P. и сътрудници, откриват корелация между експанзията на СТГ повторите и ИгГ дефицитът (Kaminsky P., съавтори, 2011). Други автори като Nakamura A. и сътрудници (Nakamura A, съавтори, 1996) също наблюдават повлияване на имунологичните параметри от експанзията на СТГ повторите при пациенти с МД1. Те корелират дължината на СТГ повторите със серумните нива на имуноглобулините (ИгГ, ИгМ, ИгА) и с броя на лимфоцитите в периферната кръв. Отчитат, че нарастването на СТГ повторите корелира в значителна степен с намаляването на серумните нива на ИгГ, с намаляването на общия брой лимфоцити и с понижаването на броя CD2+, CD3+, и CD4+ клетки. Други автори не потвърждават подобна зависимост, при проучване на корелацията между СТГ повторите и нивата на FcRn транскриптите в мускулната тъкан и лимфоцитите, и серумните нива на ИгГ (Pan-Hammarström, съавтори, 2003).

#### 3.4.Риск от неоплазми

В няколко проучвания се съобщава за бенигнени и малигнени неоплазми при пациенти с МД1. Най-често срещани при тези пациенти са пиломатриксомите, които наред с епителиомите са с предилекционна локализация на скалпа, и могат да бъдат объркани с

мастните кисти (Geh J.L ,съавтори, 1999; Cigliano B, съавтори, 2005). Множество други неоплазми са описани също така при МД1 като: тимом; базален клетъчен карцином; инсулином; левкемия; лимфом; спинален хемангиобластом; одонтома на горна челюст; аденом на паротидна, паратиреоидна, тиреоидна и питуитарни жлези; рак на стомаха, дебелото черво, тестисите, овариите, бъбреците, ларинкса и щитовидната жлеза. Средната възраст на диагностициране на туморите е около 44 г. (Azurdia R.M, съавтори, 1999). Генетичните механизми и патофизиология, отговорни за туморогенезата, при пациенти с миотонична дистрофия, не са все още напълно проучени. Експанзията на тринуклеотидният повтор CTG в DMPK гена и на тетрануклеотидният повтор CCTG в CNBP гена е в некодиращите участъци на тези гени: те се транскрибират, но не засягат протеин-кодиращите региони на тези гени. Променената РНК се секвестрира в ядрото, като е доказано, че това променя нормалната функция на РНК сплайсинг-факторите, което от своя страна вероятно засягат голям брой обекти по нататъка във веригата. Изследванията показват, че „основният молекулен механизъм е прекъсване на и РНК метаболизъм , който има важни ефекти върху много други гени. "(Machuca-Tzili L., съавтори, 2005). Въз основа на клинични и ин витро данни , Mueller и съавтори (Mueller С.М., съавтори, 2009) разработват хипотеза за предразположение към неоплазми и за прогресия на тумора при миотонична дистрофия, която се позовава на регулацията на  $\beta$  - катенин чрез сигналния път на Wnt и евентуално чрез действието на РНК-сплайсинг фактори (например, CUG - BP1, MBNL и вероятно много други), които могат да засегнат много други гени надолу по веригата. Механизмите на дисфункция,

предизвикани от болестотворни тринуклеотидни и тетрануклеотидни експанзии съответно в DMPK и CNBP са все още много слабо разбрани, но подлежат на по-нататъшни изследвания. Забелязва се липсата на повишен риск от рак при други заболявания, дължащи се на експанзия на повтори, като например чуплива-X синдром (Sund R, съавтори, 2009) и болест на Хънтингтън (Sorensen S .A, съавтори, 1999). Възможно е ключов фактор за риска от рак да е размера на експанзията, тъй като броят на нуклеотидните повтори при МД пациентите е много по-голям в сравнение с този при болестта на Хънтингтън или чуплива-X синдром (Brouwer J.R, съавтори, 2009). Докладвани са и няколко случая с по-голям размер на експанзията в туморната тъкан при МД1 пациенти, в сравнение с експанзията в нормалната им тъкан (Osanaï R, съавтори, 2000; Akiyama M, съавтори, 2008). Ако се потвърдят тези случаи то можем да очакваме, че пациентите с МД2, за които се знае, че са с най-големите размери повтори, ще имат и съответно по-висок риск от рак, хипотеза, която се нуждае от по-нататъшно разследване. Наблюдаваните различия в риска от рак между различните заболявания с увеличени повтори, може да се свърже с точната локализация на експанзията на повторите в рамките на засегнатия ген. Експанзията при МД, за разлика от болестта на Хънтингтън, е в некодиращата област, което е по-вероятно да доведе до токсично медирано РНК функции на натрупване и да повлияе на веригата ефекторни гени (Ranum L.P, съавтори, 2002; Thornton C.A, 1997), някои от които може би тумор супресорни гени, например, MMR-гени (mismatch repair genes).

Допълнителни анализи на нормални и туморни тъканни проби, от добре характеризирани МД пациенти, може да хвърли повече светлина върху връзката между размера на експанзията и риска от рак при МД.

#### **4. КЛИНИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИ МИОТОНИЧНА ДИСТРОФИЯ ТИП 2**

Миотонична дистрофия тип 2 (МД2) е мултисистемно разстройство, характеризиращо се с миотония (90%) и мускулната дисфункция (слабост, болка и скованост) (82%), както и констелацията от, привидно несвързани клинични прояви: нарушена сърдечната проводимост (19%), иридесцентна задна субкапсуларна катаракта (36% -78%, нарастваща с възрастта), и определен набор от ендокринни промени, като инсулинова резистентност (25% -75%, нарастваща с възрастта) и тестикуларна хипофункция (29% - 65%). Началото на симптомите е обикновено през третото десетилетие, най-често с проява на оплаквания като мускулна слабост и болки, като се съобщава за миотонични прояви и през първото десетилетие (Day J.W, съавтори, 1999 ; Day J.W, съавтори, 2003; Udd B, съавтори, 2010). Трябва да се отбележи, че за разлика от МД1, която може да се прояви като дегенеративно разстройство в зряла възраст или като вродена форма с променливо тежки характеристики, МД2 не е асоциирана с аномалии в развитието и не причинява тежки симптоми в детството (Udd B, съавтори, 2010). Липсата на дефекти в развитието, в някой от засегнатите членове на семейството с МД2 е надеждна и клинично значима разлика между двете форми на МД. При жени с МД2 може да има влошаване на симптоматиката по

време на бременността (Day J.W, съавтори, 1999; Newman B, съавтори, 1999; Rudnik-Schoneborn S, съавтори, 2006), но за разлика от МД1 , при тези пациенти не се наблюдава полихидрамнион.

#### 4.1. Системи на засягане

##### 4.1.1. Мускулна система

Индивидите с МД2 често се диагностицират във връзка с проявите на мускулна слабост, болка и миотония (Ricker K, съавтори, 1994; Moxley RT 3rd., 1996; Day J.W, съавтори, 1999; Ricker K., съавтори, 1999; Thornton C., съавтори, 1999; Harper P.S., 2001; 2001.; Day J.W, съавтори, 2003). Мускулите, засегнати в най-ранните етапи на болестта са флексорите на шията и флексорите на пръстите. Впоследствие, слабост се наблюдава в екстензорите на предмишницата, флексорите и екстензорите на бедрото. В 30% от пациентите с МД2 слабостта в бедрената мускулатура се развива след петдесет годишна възраст. Мускулна слабост в дорзифлексорите на стъпалото и лицевите мускулни групи се наблюдават по-рядко Миотонията е налице при почти всички индивиди с МД2, но само редки случаи причинява тежки симптоми. За флукутиращи или епизодични болки в мускулите съобщават мнозинството засегнатите индивиди и могат да са инвалидизиращи симптоми (George A, съавтори, 2004; Auvinen S, съавтори, 2008; Tieleman A.A, съавтори, 2008; Suokas K.I, съавтори, 2012). Както вече се спомена по-горе хистологичната находка при МД1 и МД2 е сходна и неспецифична,но относително специфична находка при МД2 е атрофията на втори тип мускулни влакна с пикнотични ядра (Vihola A., съавтори, 2003).

#### 4.1.2 Сърдечна система

Въпреки, че сърдечното усложнение при МД2 изглежда е по-леко изразено, в сравнение с това при МД1, (Meola G, съавтори, 2002; Sansone V.A, съавтори, 2012), МД2 може да се асоциира с атриовентрикуларни и интравентрикуларни нарушения в проводимостта, аритмии, кардиомиопатии и внезапна смърт (Nguyen H.H, съавтори, 1988; Colleran J.A, съавтори, 1997; Merino J.L, съавтори, 1998; Philips A.V, съавтори, 1998; Day J.W, съавтори, 2003; Schoser B.G, съавтори, 2004). Изследване на Wahbi и съавтори показва, че МД2 по-често води до левокамерна дисфункция, отколкото първоначално се е прогнозирано (Wahbi K, съавтори, 2009). Усложнения по време на анестезия не са наблюдавани при МД2 и вероятно се появяват по-рядко, отколкото при МД1, където интраоперативни и следоперативни сърдечни аритмии, потискане на дишането и отслабена защита на дихателните пътища се определят като възможни причини за възникване на висок процент заболяемост и смъртност (Kirzinger L, съавтори, 2010; Weingarten T.N, съавтори, 2010).

#### 4.1.3. Гастроинтестинална система

По отношение на гастроинтестиналния тракт, при МД2 се наблюдават усложнения като констипация, дисфагия и абдоминална болка (Tieleman A.A, съавтори, 2008).

#### 4.1.4. Зрителна система

Иридесцентните задни субкапсуларни катаракти, визуализирани чрез изследване с биомикроскоп, се проявяват към второто десетилетие от живота. Day J.W. и съавтори отчитат възрастов диапазон 28-74 години за поява на катаракта при МД2 (Day J.W, съавтори, 2003).

#### 4.1.5. Ендокринна система

Описани са и ендокринни нарушения при индивиди с МД2, като неинсулинозависим захарен диабет тип 2 и тестикуларна хипофункция, водеща до безплодие при мъжете (Day J.W, съавтори, 2003; Savkur R.S, съавтори, 2001).

#### 4.1.6. Нервна система

Аномалии на централната нервна система, докладвани при индивиди с МД2, включват промени в бялото вещество, отчетени на МРТ и понижен мозъчен кръвоток във фронталната и темпоралната област, визуализирано чрез PET сканиране (Hund E, съавтори, 1997; Meola G, съавтори, 1999; Franc D.T, съавтори, 2012). При пациенти с МД2 наскоро се демонстрира засягане, както на мазолестото тяло, така и редуция на сивото вещество, предимно в областта на хипоталамус, таламус и мозъчен ствол (Minnerop M, съавтори, 2008; Weber Y.G, съавтори, 2010). Тези анатомични промени вероятно оказват ефект върху когнитивните способности, поведение и личност, въпреки че за разлика от МД1, МД2 не е било свързано с интелектуални затруднения (Meola G, съавтори, 2002; Meola G, съавтори, 2003). Нарушения на съня, включително сънливост през деня, безсъние, REM поведенческо нарушение и синдром на неспокойните крака са били наблюдавани в доклади за отделни случаи и серия от изследвани лица с МД2 (Day J.W, съавтори, 1999; Bhat S, съавтори, 2012; Chokroverty S, съавтори, 2004; Shepard P, съавтори, 2012).

#### 4.2. Лабораторни показатели

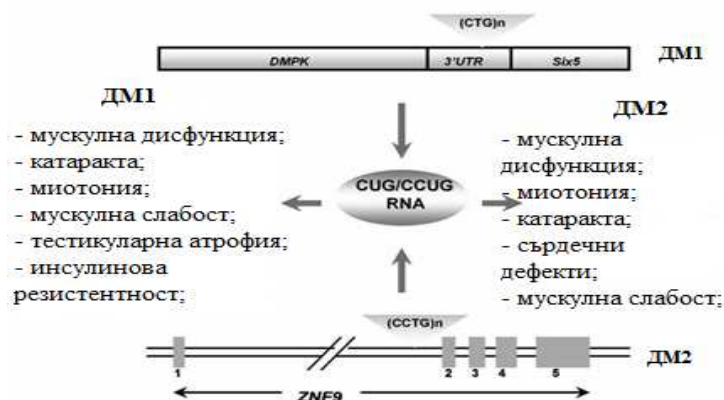
Подобно на МД1 и при МД2 се отчитат повишени стойности на гама-глутамилтрансфераза, завишена серумна креатинкиназа, хипогамаглобулинемия, с понижени нива на ИгГ и ИгМ (въпреки че

не се наблюдава клинична изява), общия холестерол, лактат дехидрогеназа, и аланин аминотрансфераза (АлАТ), включително и нисък абсолютен брой на лимфоцитите (Day J.W., съавтори, 2003; Harper P.S., 2001; Heatwole C, съавтори, 2011).

#### 4.3. Риск от неоплазми

Последните ретроспективни проучвания са показали, че индивиди с миотонична дистрофия е тип 2 като цяло са с по- висок риск от развитие на рак. МД2 пациенти могат да развият рак на дебелото черво, мозъка, щитовидната жлеза, панкреаса, яйчниците и ендометриума (Gadalla S.M, съавтори, 2011; Win A.K, съавтори, 2012).

Фигура№ 1А Обобщена клинична картина на МД1 и МД2



## 5. ГЕНЕТИЧНИ МЕХАНИЗМИ ПРИ МИОТОНИЧНА ДИСТРОФИЯ ТИП 1

### 5.1. Общи характеристики

Модел на унаследяване: МД1 е автозомно доминантно, с непълна перентрантност и вариабилност в експресията мултисистемно заболяване.

Ген: DMPK-\*605377 DYSTROPHIA MYOTONICA PROTEIN KINASE (по OMIM). DMPK гена е разположен на дългото рамо на 19q13.2-q13.3, и е единственият познат досега ген, асоцииран с МД1. DMPK има приблизително 14 екзона, покриващи около 13kb геномна ДНК. Нормални алелни варианта: броят на триплетите варира в нормалната популация, като нормалните алелни варианта са от 5 до 34, в този диапазон, алелите се предават непроменени в поколението. Алели с 35-49 CTG повтора са нормални, но са така наречените премутагенни алели. Индивиди с тази форма на алела нямат клинична проява на заболяването, но поради нестабилността на повторите е възможна експанзия по време на мейозата. В резултат на това има повишен риск за поколението им от унаследяване на по-голям брой повтори и съответно изява на МД фенотип (Martorell L, съавтори, 2001; IMDC, 2000; Moxley R.T, съавтори, 2008). Нормален генен продукт: DMPK (миотонин-протеинкиназа) е 69-kd серин-треонин протеинкиназа, локализирана в специализирани клетъчни структури в сърдечният мускул и скелетната мускулатура, и асоциирана с вътреклетъчната проводимост и импулсна трансмисия. DMPK е тясно свързан с цикличната АМФ-зависима протеинкиназа и с Rho-свързваща киназа. DMPK може да взаимодейства и с GTP-свързващ протеин, който е регулаторна субединица на миозин-фосфатазата. Транскрипцията на гена води до образуването на няколко алтернативно съединени форми, които съдържат киназо-каталитичният домейн. Алтернативно свързаните изоформи имат различна експресия в различните тъкани. Тринуклеотидният повтор (CTG) се намира на 3'нетранслируем регион (UTR), кореспондиращ с последният екзон.

Патогенни алелни варианта: мутацията при МД1 се изразява в увеличен брой на СТG тринуклеотидният повтор (>49) в 3' UTR на DMPK гена. За разлика от други мускулни дистрофии (тип Дюшен, Бекер, мускулни дистрофии тип пояс-крайник и тип фацио-скапулохумералис, дистални миопатии), дължащи се на генетични мутации като: делеции, дупликации, точкови мутации, инсерции, при МД1 се касае за динамична мутация, включваща антиципация и отклонение в предаването по майчин път при вродените форми. Това е първият описан случай на доминантно заболяване, причинено от експанзия на мотив в некодиращ участък. Мутацията се транскрибира в РНК, но не се превежда на белтъчно ниво. Пациенти с умерена степен на клинична изява имат от 50 до 100 повтора, като при тях единствени симптоми могат да бъдат катаракта или леката форма на миотония. При наличие на брой повтори от 100 до 1000 има фенотипната изява на класическата форма. Размера на повторите може да достигне до няколко хиляди, което най-често се наблюдава при пациенти с конгениталната форма на заболяването (Day J.W., съавтори, 2005; Martorell L., съавтори, 2001; IDMC, 2000; Rakosevic-Stojanovic V., съавтори, 2005).

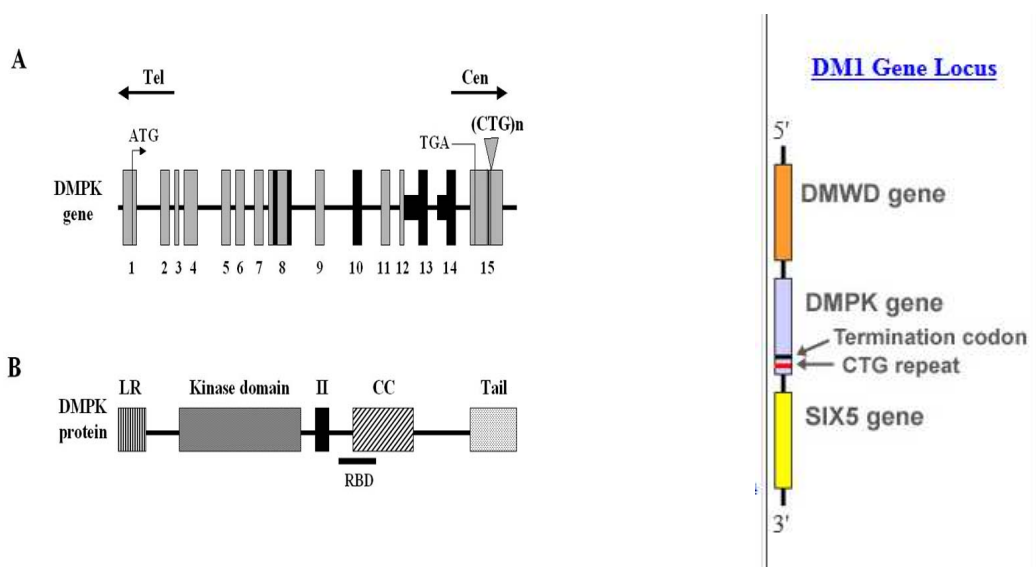
Абнормен генен продукт: ефектът на СТG повторите е комплексен и някои техни специфики са все още не напълно изяснени (Fischer A, съавтори, 2013). Експанзията на СТG повторите оказва влияние чрез абнормният процесинг на РНК-транскрипта. Идентифицирани са две хомоложни РНК-CUG-свързващи протеини (CUGBP и MBNL1 [muscleblind]). Тези протеини са взаимно антагонистични медиатори на подгрупа процеси на алтернативен сплайсинг, нарушени при МД, в които преобладават ембрионалните форми на някои протеини. Тези протеини включват хлоридният канал, които е в основата на

миотонията; инсулиновият рецептор, което води до повишен риск от захарен диабет и микротубулно-свързан тау-протеин, кодиран от МАРТ, ген свързан с когнитивното функциониране (Savkur R.S, съавтори, 2001; Mankodi A, съавтори, 2002; Kanadia R.N, съавтори, 2003; Ranum L.P, съавтори, 2004; Day J.W, съавтори, 2005; Cooper T.A, съавтори, 2006; Leroy O, съавтори, 2006; Wheeler T.M, съавтори, 2007).

Таблица № 1А/А МД тип 1: Гени и база данни.

| Генетичен символ | Хромозомен локус | Име на протеина                         | Специфичен локус                                   | HGMD        |
|------------------|------------------|---|--|-------------|
| <u>DMPK</u>      | <u>19q13.32</u>  | <u>Myotonin-<br/>protein<br/>kinase</u> | <u>DMPK<br/>homepage -<br/>Mendelian<br/>genes</u> | <u>DMPK</u> |

Фигура № 1 А ОМIM – Миотонична дистрофия тип 1



Разбирането на разнообразните характеристики в МД1 родословията и голямата клинична вариация на болестта, става възможно след разкриването на основната мутацията (Brook J.D, съавтори, 1992; Fu

У.Н, съавтори ,1992). Оказа се, че принадлежи към вид мутация, определена като динамична. Динамичните мутации са нестабилни промени (предимно увеличаване на размера /експанзии) в броя на копията на ДНК повтори (Richards R.I, съавтори, 1992). Към тях се отнасят най-малко 22 наследствени неврологични заболявания (например, болест на Хънтингтън, чуплива-Х синдром, спинална и булбарна мускулна атрофия), известни като "заболявания с нестабилни експанзии на повторите" (Gatchel J.R, съавтори, 2005; Wells R.D, съавтори, 2006; La Spada A.R, съавтори, 2010).

## 5.2 Антиципация

Тринуклеотида е мейотично нестабилен със склонност към нарастване на дължината при всяко следващо поколение, така при децата на засегнатите индивиди, включително и тези с пре-мутация, се наблюдава тенденция за потезка и в по-ранна възраст на проява на симптомите, в сравнение с техният родител. Тази амплификация на броя повтори от родител към дете е така нареченият феномен на антиципация. Молекулярната причината за антиципацията се основава на нестабилността на дългите секвенции от нуклеотидни повтори. Обикновено броят копия на ДНК повторите варира при нормалните индивиди и са стабилно предавани със средна степен на мутиране от  $\sim 10^{-3}$  за локус, за гамети, за поколение (Brinkmann В, съавтори, 1998). Локуси, подложени на динамични мутации, експанзиите започват, когато дължината на ДНК повтори надвишава прага на 100-150 бази. След преминаване на този праг, все по-голяма е вероятността да настъпят допълнителни експанзии, което води до натрупването на десетки до хиляди повторения само в рамките на няколко поколения (Richards R.I, съавтори, 1992; Mirkin

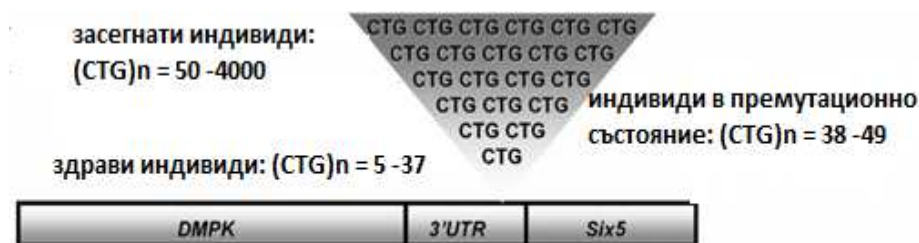
S.M, съавтори, 2007). Скоростта на мутация е свързана с първоначалното копие брой повтори и дори може да достигне стойността от един на локус, на гамети, на поколение, което означава, че копието брой повтора се променя при всяко предаване между поколенията.

Значителен брой "заболявания с нестабилна експанзия на повторите" се характеризират със специфичен генотип-фенотип корелация, така че по-дългите повторни масиви са свързани с по-ранна възраст на начало и с по-тежки симптоми (Richards R.I, съавтори, 2001). Прогресивният характер на процеса на експанзия между поколенията, заедно с характеристиката генотип-фенотип корелация, осигурява биологична основа за дълго дискутирания феномен на генетична антиципация, наблюдавана в по-голямата част от „заболяванията с нестабилна експанзия на повторите" (R. I. Richards R.I, съавтори, 1992; Richards R.I, съавтори, 2001).

Копието на броят CTG повтори в гена DMPK е полиморфно в общата популация, от 5 до 35 и претърпява изразено нарастване при МД1 индивидите, вариращо от 50 до няколко хиляди (IMDC, 2000). Размерът на нестабилните CTG повтори е приблизително свързан, както с възрастта на начало, така и с общата тежест на заболяването (Brook J.D, съавтори, 1992; Harley H.G, съавтори, 1993; Lavedan C, съавтори, 1993). Често безсимптомно или с късна проява са МД1 индивиди, имащи от ~ 50 до 80 CTG повтора и тези сравнително малки разширения се наричат премутации (Barcelo J.M, съавтори, 1993). Горната граница на размера на експанзията, при МД1 лица с късна проява, е около 150 CTG повтора (IDMC, 2000; Lavedan C, съавтори, 1993). МД1 индивиди с изява в зряла възраст имат широка гама от брой CTG повтори, грубо между 100 и 1000 (средно ~ 650

повтора), докато вродена и в детска възраст форма на МД1 имат повече от 1000 повтора (средно~1200), (IDMC, 2000; Lavedan C, съавтори, 1993). Експанзии с повече от 80 CTG повтора са известни като асоциирани със заболяването (пълни) мутации. DMPK алели, които са между нормалният и промутационният диапазон (от 35 до ~50 повтора) са много редки. Те обикновено не са свързани с болестта и се наричат премутации (Yamagata H, съавтори, 1994).

Фигура № 2А. Зависимост между броя на повторите и изязвата на заболяването МД1. (Ashizawa T, Baiget M. at al, 2000; Schoser B, Timchenko L. at al, 2010).



Доскоро реда от CTG повторенията в DMPK гена, се е приемал за непрекъснат участък, за разлика от повечето други ДНК повтори, свързани със "заболявания с нестабилна експанзия на повтори". Но е установено, че 4-5 % от МД1 индивидите с увеличени алели са с множество прекъсвания от CCG триплети, CCGCTG хексамери или CTC триплети, всички разположени в 3' края на участъка с CTG (Musova Z, съавтори, 2009; Braidă C, съавтори, 2010)

5.3. Промяна в броя повтори в поколенията и ефект на пола на родителя.

От описаното по-горе става ясно, че в МД1 родословията промяната

в броя повтори между поколенията обуславя по нататъшната експанзия (Brunner H.G, съавтори, 1999; Harley H.G, съавтори, 1993; Lavedan C, съавтори, 1993; Tsilfidis C, съавтори, 1992; Ashizawa T, съавтори, 1994), но в по-редки случаи може да се наблюдават и „свиване” (O'Нoy K.L, съавтори, 1993; Ashizawa T, съавтори, 1994), и изключително рядко „връщане” към нормата (Brunner H.G, съавтори, 1993). Посоката и степента на промяна в броя на повторите, между поколенията, зависи както от размера на родителската експанзия така и от пола на родителя, предаващ мутацията. Съществува широка корелация между размера на увеличения алел на родителя и промяната в размера на експанзията при предаването в поколението.

Премутация и промутация се унаследяват стабилно или с по-малки промени в броя повтори, в следващите няколко поколения, ако бъдат предадени от жени. Когато се предават от мъжете, премутацията показва по-голяма нестабилност по отношение на експанзията, дори до достигане на пълна мутация в едно поколение, докато промутацията почти неизменно води до голямо увеличение в броя повтори (Brunner H.G, съавтори, 1993; Barcelo J.M, съавтори, 1993; Martorell L, съавтори, 2001; Simmons Z, съавтори, 1998; Savić D, съавтори, 2006).

Алелите, свързани с МД1 са почти винаги нестабилно, предавани и от двата пола. Алели, с вариращи между 200-600 повтора, най- често се увеличават с още повече брой повтори (Harley H.G, съавтори, 1993; Lavedan C, съавтори, 1993). Абсолютното увеличение в броя копия повтори е по-голямо при предаване от жените (средно в размер от ~500-600 повтора), отколкото при предаване от мъжете (средно в размер от ~260-280 повтора) според Harley H.G и

съавтори, 1993; Lavedan С и съавтори, 1993. Когато експанзията в поколенията се изразява като процент от размера на експанзията в родителя, тогава разликата между половете не е видима (Harley H.G, съавтори, 1993). Все пак, в проучване на най-голямата кохорта на МД1 индивиди (~1500 пациента) с размера на експанзията в диапазона 200-800 повтора, показва, че 66% от майчините предавания водят до увеличаване на размера на повторите, докато по-голямата част (69%) от предаваните по бащина линия водят до стабилни трансмисии или контракции (Salehi L.B, съавтори, 2007). Най-големите експанзии, свързани с вродената форма на болестта, са почти изцяло предавани по майчина линия (Lavedan С, съавтори, 1993; Tsilfidis С, съавтори, 1992), въпреки че са докладвани и няколко случая на предаване по бащина линия (Bergoffen J, съавтори, 1994; de Die-Smulders С.Е.М, съавтори, 1997). Майките на индивиди с вродена МД1 имат по-голям размер на алела с експанзия, от майките, чиито потомство не е с вродена форма на МД1 (среден размер ~ 600 повтора, в сравнение с ~250 повтора) - Harley H.G, съавтори, 1993; Lavedan С, съавтори, 1993; Tsilfidis С, съавтори, 1992). Въпреки това, по-малко от 10% от засегнатите майки раждат, деца с конгенитална форма (Koch M.C, съавтори, 1991). В почти всички случаи, засегнати сестри имат засегнати деца с една и съща форма МД1 (форма в зряла възраст или вродена форма), както и засегнатите индивиди от едно потомство са с проява на една и съща форма на болестта, при различен размер на експанзията (Lavedan С, съавтори, 1993). Това показва наличието на все още неизвестни (генетични) фактори, които увеличават риска от конгениталната форма на МД1. Изключително редките случаи на

вродена форма МД1, с предаване по бащина линия, могат да бъдат свързани с наблюдението, че бащите с ~650 повтора, в някои случаи могат да предадат по-голяма експанзия на потомството си (Harley H.G, съавтори, 1993). Очакваната честота на повторните контракции в МД1 родословията е 4.2-6.4% (Ashizawa T, съавтори, 1993; Salehi L.V, съавтори, 2007). Те обикновено са свързани с промяната към по- лека проява на симптомите или дори безсимптомно протичане, но в някои двойки родител-дете антиципацията все още е налице (Ashizawa T, съавтори, 1994; Monckton D.G, съавтори, 1995). Контракциите са по-често предавани по линия на бащата, и появата на такъв феномен при член на семейството, увеличава вероятността от контракция в друг член от МД1 родословието.

За алели с подобен размер на експанзията, ефектът на родителския пол е сравним с този при различните "заболявания с нестабилна експанзия на повторите". Например, експанзии от премутация до пълна мутация при болестта на Хънтингтън и големи експанзии (до ~100 повтора), свързани с тежка ювенилна форма на болестта, се осъществява главно при предаване по мъжка линия (Goldberg Y.P, 1993; Trottier Y,1994; Chong S.S, 1997), подобно на предразположените за нестабилност по мъжка линия премутации и промутации при МД1. Големите експанзии в некодиращите области, свързани с чуплива-X синдром (Malter H.E, съавтори, 1997) и спиноцеребрална атаксия тип 8 (Koob M.D, съавтори, 1999), както и вродената форма на МД1, се предават по женска линия. Промените в броят на повторите между поколенията са кумулативен резултат на изразена зародишна линия и соматична нестабилност на СТГ участъка в DMPK ген (Monckton D.G, 1995; Jansen G,1994; Wong L.J.C, 1995).

5.4. Герминативна нестабилност на експанзираните алели. Герминативната и соматичната нестабилност на МД1 алелите се изследва с помощта на „малък басейн“ PCR (SP -PCR), метод за подробна количествена оценка на степента на вариация в размера на повторите в дадена проба (Jeffreys A.J, съавтори, 1994). SP -PCR анализ на проби от спермата на пациенти, които са с формата на МД1 в зряла възраст или са били асимптомни, разкрива високо ниво на хетерогенност в размера на повторите, със степен на мутацията почти 1 на гамета и ясно изразена тенденция към експанзия (Monckton D.G, Wong L.J.C, 1995; Martorell L, съавтори, 2000). Степента на вариация е силно променлива между изследваните лица, и очевидно не корелира с размера на прогениторния алел, първоначално унаследен от зиготата и определян като долна граница в разпределението на размера на алел в кръвта (Monckton G, съавтори, 1995; Martorell L, 2000). Двама асимптомни МД1 индивида с относително стабилни промутации в кръвта (75 и 90) показват най-висока степен на хетерогенност в размер на повторите в сперматозоидите (дори превишаващи 1000 повтора) и увеличение на най-големия размер алел (средно по 180 повторения в един индивид и 700 в другия). Четири лица с относително малки експанзии в кръвта (среден размер от 200 до 300 повторения) и размер на прогениторния алел 150-200 повтора, имат средно увеличение 30-120 повтора в сперматозоидите. Други две лица с подобни размери на прогениторните алели (210 и 390 повторения), но с по-висок среден размер в кръвта (630 и 700), показват средно увеличение от около 250 повтора в сперматозоидите. Накрая, един човек с високо променливо разпределение в кръвта (в диапазона от ~ 190-700 повторения) е показал относително ниско ниво на промяна в

сперматозоидите с среден размер от 150 повтора. Във всички изследвани проби сперматозоиди, алели с повече от 700-800 повтора са много рядко срещани (Monckton D.G, съавтори, 1995; Jansen G, съавтори, 1994).

Изследвания върху пост-преимплантационен диагностичен материал, дават възможност да се проучи нестабилността в женските гамети. Те показват значително увеличение в дължината на повторите в незрели и зрели овоцити, което е около 10 пъти по-голямо, отколкото в сперматозоиди от МД1 пациенти с подобен размер на алела: 22 МД1 индивида с размер на прогениторния алел, вариращ от 42 до 428 повтора, показват средно увеличение от ~300 повтора в овоцити, а минималното увеличение е ~100 повтора, а максималното 950 повтора (de Temmerman N, съавтори, 2004). За разлика от сперматозоидите, контракции не са наблюдавани в овоцитите.

Все още не са напълно изяснени механизмите за настъпване на герминативната нестабилност в локусите, асоциирани със „заболявания с нестабилна експанзия на повторите”. В МД1 се наблюдава в яйцеклетката увеличение в броя на повторите преди завършване на мейозата, също по време на премиотичната пролиферация на овогония или по време на профаза I (de Temmerman N, съавтори, 2004). В спиноцеребрална атаксия тип 1 (SCA1) трансгенни мишки, нестабилност на броя на повторите настъпва по време на задържането на яйцеклетките в мейоза I, след мейотичната репликация на ДНК (Kaytor M.D., съавтори, 1997). В МД1 трансгенни мишки, които са с голям човешки геномен сегмент, съдържащ повече от 300 повтора (Seznec H, съавтори, 2000),

експанзиите са налице в сперматогони и сперматозоиди, което показва, че те са настъпили в началото на сперматогенезата и мейозата и постмейотичните механизми вероятно не участват в зародишните експанзии (Savouret C, съавтори, 2004).

Молекулният механизъм на герминативната нестабилност на увеличените алели и като цяло на динамичните мутации, е все още неясен. Тенденцията на повторният участък да се увеличава или свива, изглежда е функция от неговата основна секвенция, което позволява образуването на вторична фуркета-подобна /hairpin/ структура (Gacy A.M, съавтори, 1995; McMurray C.T, съавтори, 1999). Това междинно съединение може да се образува по време на процеси, които включват разделяне на веригите на ДНК: ДНК репликацията, ДНК поправка и рекомбинация, и всеки от тях е въввлечен в нестабилността на повторите (Mirkin S.M, съавтори, 2007; Pearson C.E, 2005). Различните динамични процеси в МД, нестабилността в мъжката и женската зародишни линии, не се влияят само от абсолютния размер на повторите, но също могат да бъдат регулирани и от специфични за пола фактори, които са включени в поправката на ДНК и / или репликация и са важни за мутационния път. Предложена е хипотеза, че чрез някакъв вид селекция се изключват експанзии с повече от 1 000 повтора в сперматогенезата (Lavedan C, съавтори, 1993; Jansen G, съавтори, 1994), но все още е неясно защо МД1 премутацията и промутацията остават стабилни при преминаване през женската мейоза, докато при същите условия пълната мутация претърпява драматична експанзия.

#### 5.5. Соматична нестабилност на експанзиралите алели.

Хетерогенността в размера на МД1 повторите в соматичните тъкани

(соматичен мозаицизъм) е специфична за всяка тъкан (Jansen G, съавтори, 1994; Anvret M, съавтори, 1993; Ashizawa T, 1993), както и предразположение към допълнително увеличение, непрекъснато през целия живот на индивида (Monckton D.G, съавтори, 1995; Wong L.J.C, съавтори, 1995; Martorell L, съавтори, 1998).

Соматичният мозаицизъм се наблюдава сред редица различни тъкани , а по отношение на тези, които съответстват на МД1 патологията , много по-големи експанзии (2 - до 13 - кратно по-високи) са открити в скелетните мускули (Monckton D.G, 1995; Anvret M, 1993; Ashizawa T, 1993; Thornton C.A, съавтори, 1994), сърдечният мускул (Wong L.J.C, съавтори, 1995), периферната кръв, докато най-малките експанзии присъстват в челната кора и таламуса (Jansen G, съавтори, 1994). В МД1 човешки фетус най-големите експанзии настъпват в сърцето, кожата, скелетните мускули, мозъка и бъбреците, а най-малки в кръвта (Lavedan C,1993; Jansen G,1994; Ashizawa T, 1993; Wöhrle D, 1995; Martorell L, съавтори, 1997). Наблюдава се между тъканите хетерогенност в размера на повторите още от 16-седмична възраст на плода (Martorell L, съавтори, 1997) и не е открит мозаицизъм в нито един от засегнатите ембриони, получени като пост-преимплантационния диагностичен материал (de Temmerman N, съавтори, 2004). Тези резултати водят до заключението, че соматичният мозаицизъм в засегнатите фетуси започва още по време на втория триместър на бременността (Wöhrle D, 1995). Wöhrle D. и съавтори (Wöhrle D, 1995) изказват становище че, това време корелира с периода на появата на бърз растеж на плода, като се предполага, че по време на периода на диференциация в първия триместър , броят на повторите по някакъв начин се стабилизира.

Соматичния мозаицизъм на МД1–експанзираните алели в рамките на една тъкан, се разглежда като дифузна лента или намазка на Southern blot анализ, или като отделни, хетерогенни по размер ленти на SP-PCR анализ (Monckton D.G, съавтори, 1995; Wong L.J.C, съавтори, 1995). Количественото измерване на хетерогенността на размера на повторите в кръвни проби от SP-PCR показва висока степен на вариация, с честота на мутация от 50% до над 90% и разпределение на размера на алела, насочено към по-големи алели с по-ниска граница, под която вариациите на алели са рядкост (Monckton D.G, съавтори, 1995). Данните от населението, на базата на математическо моделиране на експанзираните при МД1 алели в кръвта, показват, че склонността към експанзия е кумулативен ефект от многобройни и чести процеси на увеличаване и свиване, които са вероятно ежедневни (Higham C.F, съавтори, 2012). Разпределението насочено към експанзии е в съответствие с увеличаването на хетерогенността на алелния размер и със средният за възрастта на пациента размер на алела, наблюдаван при лонгитудинални проучвания (Martorell L, съавтори, 1998). Заедно показват, че соматичната нестабилност се характеризира с непрекъснатост през целия живот на индивида и със склонност към експанзия. Предпоставка за различието в разпределението на МД1 алелния размер между кръвта и мъжката герминативна линия е съответно различието в мутационната динамика в тези тъкани.

Основните фактори, които влияят на нивото на соматична нестабилност, през целия живот, са размера на прогениторният алел и възрастта на вземането на проба (Martorell L, съавтори, 1998), които заедно представляват 89% от наблюдаваната вариация (Morales F, 2012). Останалата част от вариацията е в резултат на

индивидуален специфичен и наследствен количествен признак, което е насочено срещу ролята на осъществяване на връзки с фактори - модификатори на соматичната нестабилност (Morales F, съавтори, 2012). Най-очевидните кандидати за такива връзки с модификатори са компоненти от пътят на възстановяване на ДНК, тъй като mismatch-repair гените са показали, че са от съществено значение за генериране на соматични CTG-CAG разширения на повторите при мишки (van den Broek W.J.A.A, 2002; Manley K, 1999; Gomes-Pereira M., 2004). Оценката, че многобройните събития на експанзии и контракции са най-често ежедневни, допълнително подкрепя ролята на възстановителните механизми на ДНК, или транскрипция, а на ДНК репликацията за соматичната нестабилност (Higham C.F, съавтори, 2012).

#### 5.6. Генотип-фенотип корелация при МД1

Значителни корелации са докладвани между генотип и възрастта на поява на МД 1 (Harley H.G, 1993; Salehi L.B, 2007; Hamshere M.G, 1999; Hsiao K.M, 2003). Корелации със специфични симптоми на МД1, като например невромускулното (Gennarelli M, 1996; Marchini C, 2000), сърдечното (Finsterer J, 2001; Merlevede K, 2002; Rakočević-Stojanović V, 2003), когнитивното увреждане (Modoni A, 2004; Winblad S, 2006), смъртността (Groh W.J,2011), както и периферната невропатия (Rakočević-Stojanović V, 2002), често са инсуфициентни или липсват. Въпреки това, в проучване на една от най-големите кохорти от пациенти с МД1 (2650 индивиди) се разкрива връзката между размера на експанзията и цялостният МД1 клиничен фенотип: (I) пациенти с експанзия до 100 повтора имат почти 100% вероятност да останат безсимптомни, с променено или нормално ЕМГ (F0 фенотип) или с минимални признаци на миотония ЕМГ (F1

фенотип), (II) пациенти с 100-350 повтора имат ~ 95% вероятност да развият F1 фенотип или по-изявен фенотип F2, характеризиращ се с миотония и дистална слабост, ЕКГ аномалии, дисфункция на половите жлези, лека умствена изостаналост, нарушен глюкозен толеранс и катаракта; (III) пациенти с 450-1800 повтора имат 85-95% вероятност от развитие на F2 фенотип или най-тежкия F3 фенотип, белязан от проксимална слабост, сърдечно засягане, ендокринна дисфункция, умствена изостаналост и катаракта; (IV) пациенти с повече от 2000 има ~ 90% вероятност за развитие на F3 фенотип (Salehi L.B, съавтори, 2007). Независимо от това, генотип-фенотип корелации в МД1 могат да са компроматирани поради възможни неточности във фенотипните данни (Udd B, съавтори, 2012) и от тъканно-специфичната експанзия, увеличаване, предразполагащо към соматична нестабилност на мутантните алели през целия живот на пациентите (Monckton D.G, съавтори, 1995; Wong L.J.C, съавтори, 1995; Martorell L, съавтори, 1998). А именно, по-големите мутантни алели се намират основно в засегнатата скелетна мускулна тъкан, в сравнение в кръвта (Anvret M, съавтори, 1993; Thornton C.A, съавтори, 1994), като тук е затруднено елиминирането ефекта - възраст на пациента при вземането на проби. Освен това, соматичните експанзии се предполага, че допринасят за тъканната специфичност и прогресивният характер на симптомите (Martorell L, 1998; Morales F, 2012; Fortune M.T, 2000; Savić D, съавтори, 2002). Съществуват технически трудности за точна оценка на броя на CTG повторите при използване Southern blot хибридизация на геномна ДНК, както и несъответствие в публикуваните данни. Това може да се преодолее чрез прилагане на SP-PCR анализ и използване на долната граница на разпределението на алелния размер в кръвта

като прогениторен алел. Това е добра оценка за размера на прогениторния алел, тъй като долната граница се запазва между тъканите и е специфична за всеки МД1 индивид и кръвта е очевидно една от най-стабилните тъкани (Monckton D.G, съавтори, 1995; Martorell L, съавтори, 2000). Дори с този подход може да се наблюдава при някои по-възрастни индивиди, с по-големи алели, увеличаване на МД1 алелите, във всички клетки, извън дължината на прогениторният алел (Martorell L, съавтори, 1998). Също така е възможно при някои по-млади индивиди, долната граница на разпределението да падне под прогениторния алел, вследствие на контракции (Higham C.F, съавтори, 2012).

С помощта на SP-PCR се осъществява дефинирането на МД1 експанзията в кръвта в три параметъра: прогениторни, средни и с най-голям размер алели, като е отчетена отрицателна линейна корелация с възрастта на начало и средният размер на експанзията при ювенилна- възрастна форма МД1, при която прогениторния алел е с дължина по-малко от 245 повтора (Savić D, 2002). Този резултат подкрепя хипотезата за съществуването на праг, отвъд който увеличаването на повторите не влияе на възрастта на начало (Hamshere M.G, 1999). Като цяло по-големият размер експанзия на СТG повторите корелира с по-ранно начало и по-тежка проява на заболяването (табл.№ 2А). Според Gharehbaghi и съавтори броят СТG повтори, свързан в по-голяма степен с възрастта на начало и тежест на симптомите, е под 400 СТG повтора (Gharehbaghi-Schnell E.B, 1998). Едно от обясненията за по-слабата корелация между фенотипа и размерът на повторите над 400, е това че в DMPK дължината на СТG тринуклеотидният повтор е митотично нестабилна при индивиди с МД1. Именно тази нестабилност води и

до соматичен мозаицизъм на размера на CTG експанзията (Hamshere M.G, съавтори, 1999). Наблюдавания размер на CTG повторите в една тъкан (например в кръвта), често не съвпада с клиничната тежест и с размера на CTG повторите в други органи (например в мускулите). Размерът на повторите често е стабилен в някои постнатални тъкани (например кръвта), за разлика от други (например скелетна и сърдечна мускулна тъкан). Соматичната нестабилност се наблюдава при митотични и пост-митотични тъкани, което предполага че причината за тази нестабилност са промените в механизмите за репарация на ДНК. Няма корелация между размера на CTG повторите, отчетени в мускулите, и степента на мускулна слабост. В клиничната практика се измерва дължината на CTG експанзията в кръвта, като не се открива допълнително клинично предимство в изследването на повторите в мускулната тъкан (Lavedan C, съавтори, 1993).

Таблица №.2А Фенотип, клиника и брой CTG повтори при МД1

| Фенотип                          | Клиника  | Брой CTG  | Възраст на начало | Преживяемост    |
|----------------------------------|--|-----------|-------------------|-----------------|
| Премутация                       | Няма   | 38-49     | -                 | -               |
| Умерен, късно начало, асимптомен | Катаракти, умерена миотония  | 50-100*** | 20-70             | 60- до нормална |
| Класически                       | Слабост, миотония, катаракти, ритъмнопроводни нарушения, инсулинова резистентност, оплешивяване                            | 50-1000   | 1.10.1930 г.      | 48-60г.         |
| Начало в детска възраст          | Дихателна недостатъчност, лицева слабост, миотония, психосоциални проблеми, умствено изоставане, ритъмнопроводни нарушения | 50-1000   | 1-10г.            | -               |
| Вродена                          | Инфантилна хипотония, дихателна недостатъчност, кардиореспираторни и усложнения  | >1000*    | От раждането      | 45г.**          |

\* Корелацията между дължината на CTG повторите и клиничният фенотип може да варира, при някои тежко засегнати пациенти с CTG повтори между 50 и 100, при други асимптоматични на средна възраст пациенти с брой повтори между 300 и 500. Адаптирано от Die-Smulders; Mathieu; Cobo; и Second IDMC 2000; \*\* Redman и съавтори докладват за няколко случая с вродена форма на МД1 с брой на повторите между 730 и 1000;\*\*\* Не е включена неонаталната смърт.

Въпреки това неотдавнашно проучване на голяма кохорта от МД1 лица показва, че прогнозираната дължина на прогениторния алел е основен модификатор за възраст на проява на заболяването, което представлява 64% от вариацията, без праг на дължината на повторите, над който да оказва влияние върху възрастта на начало (Morales F, съавтори, 2012). Възрастта на начало е допълнително модифицирана от нивото на индивидуалната специфична соматична нестабилност: пациенти, при които броят на повторите се увеличават по-бързо, имат по-ранна възраст на начало (Morales F, съавтори, 2012). Соматичната нестабилност на експанзираните алели по време на целия живот, се предполага, че също допринася за развитието на невромускулни симптоми при ювенилна – възрастна форма на МД1 (Savić D, съавтор, 2002). Соматичната нестабилност също така компрометира опитите за точно измерване на динамиката на повторите между поколенията. Промяната в дължината на повторите между поколенията, определена чрез измерване на алелния размер в кръвта на родителя и поколението, обикновено се свързва с наблюдаваната антиципация. Въпреки че, при относително голям дял от случаите се наблюдава „свиване” на дължината на повторите, има проявяване на антиципация (Ashizawa T, 1994; Martorell L, съавтори, 2000). В тези случаи прогресивната и зависима от възрастта, соматична нестабилност в кръвта, замаскира истинската герминативна експанзия, и такава промяна между поколенията се означава като „псевдосвиване” (Monckton D.G, съавтори, 1995).

5.7. Прекъсванията на повторите и техният ефект върху стабилността и фенотипното проявление на МД1.

Прекъсвания (CCG, CTGCCG, CTC повори или дори нерепетативни ДНК последователности) в 3 'края на CTG алелния участък, с повече от 35 повторения могат да имат значителни последици за мутационната динамика и могат да повлияят на фенотипните прояви (Musova Z, 2009; Braida C, 2010; Axford M.M, 2011). След предаване, прекъсванията в МД1–еспаназиралите алели показват нестабилност и значителна интрафамилна променливост, както по брой, така и по локализация сред роднините (Musova Z, 2009; Braida C, съавтори, 2010). Изключение прави едно родословие, където комплекса от прекъсвания се предава стабилно (Braida C, съавтори, 2010). Прекъсванията могат да имат стабилизиращ ефект върху соматичната и герминативната нестабилност, при наблюдавани между поколенията относително малки експанзии по майчина линия. Прекъсванията дори могат да предразполагат към герминативни „свивания”, тъй като честотата на контракциите в поколенията е по-висока, отколкото се очаква за МД1 и е с предаване по майчина линия (Musova Z, 2009; Braida C, 2010). Това може да обясни липсата на вродена форма в изследваните семейства с прекъснати МД1 алели, където болестта е била наследена от майката. МД1 увеличените алели с прекъсвания могат да бъдат свързани с атипичен фенотип, като пример за това е описаното семейство с косегрегация на МД1, Шарко-Мари Тут невропатия, енцефалопатия и ранна загуба на слуха (Braida C, съавтори, 2010). В семейства, проучени от Musova и съавтори, (Musova Z, 2009) фенотипът на пациентите не се различава значително от типичната

клинична картина на МД1. Въпреки това, в някои случаи мускулната дистрофия отсъства, като се наблюдава едва в по-късна възраст от очакваното според размера на експанзията. Двама от пациентите също така имат изява на полиневропатия. Интересен е фактът, че прекъсванията се наблюдават при изключително редки премутации, дори и при четирима пациента от мъжки пол. Индивидите с прекъснати премутации, би трябвало да са незасегнати, основано само на дължината на повторите им, но това е така само случая на един мъж с 37 прекъснати повтора (Leeflang E.P, съавтори, 1995). При други двама мъже, с 37 и 43 прекъснати повтора, се наблюдава невромускулнен фенотип (Musova Z, 2009). Въпреки склонността на премутациите да се увеличават при трансмисията по мъжка линия (Martorell L, съавтори, 2001), алел с 43 прекъснати повтора се предава стабилно. Необходим е анализ на по-голям брой индивиди, за определяне на честотата на прекъснатите МД1 алели и да се определи възможната причинна за модифициращият им ефект върху МД1 фенотипа. Идентифициране на тъканно-специфична, свободна от СТG конфигурацията в експанзирания алел при юношески-възрастен индивид МД, допълнително разширява възможната, необичайна конфигурация на експанзираните МД1 алели (Axford M.M, съавтори, 2011). Описани са инсерции, довели до пълно нарушаване на СТG участъка, като се запазват само първите СТG и TG на последният СТG повтор в мозъчната кора, скелетните мускули, и малкия мозък. Въпреки това, клиничната значимост на тази отделна конфигурация в МД1–експанзиран алел изисква по-нататъшен анализ.

## 6. ГЕНЕТИЧНИ МЕХАНИЗМИ ПРИ МИОТОНИЧНА ДИСТРОФИЯ

### ТИП 2

#### 6.1. Общи характеристики

Модел на унаследяване: МД 2 е автозомно доминантно заболяване с мултисистемен характер.

Ген: CNBP ген (преди известен като ZNF9), локализиран на 3q13.3-q24., кодиращ ZNF9 (zinc finger protein 9), протеин-свързваща клетъчна нуклеинова киселина, е единственият познат ген, мутацията на който се свързва с МД2. CNBP интрон 1 съдържа мотив от повтори,  $(TG)_n(TCTG)_n(CCTG)_n$ , като експанзията от CCTG повторите е причина за МД 2 (Liquori C.L, съавтори, 2001).

Нормални алели: Три участъка от повтори (TG, TCTG, и CCTG) са включени в сложен мотив както във всички нормални така и в патогенните алели. В допълнение участъка с CCTG повтори в нормалните алели има типични едно или повече тетрануклеотидни прекъсвания - TCTG или GCTG (Liquori, съавтори, 2003) /Фиг.№ 3А./. Като цяло дължината на комплексния повтор  $(TG)_n(TCTG)_n(CCTG)_n$  в нормалните алели е в диапазона от 104 до 176 двойки бази. Поради високата полиморфност на участъците с TG и TCTG повтори, както и използването на други методи, а не секвениране за определяне размера на алелите, се отчита по-скоро дължината на двойките -бази като цяло, отколкото да се определи броя на CCTG повторите. Liquori и съавтори (Liquori C.L, 2001; Liquori C.L, 2003), при секвенирането на 24 нормални алела, доказват следното: най-големият брой, непрекъснати CCTG повтори е девет; общо нормалният участък с CCTG повтори, включително и TCTG прекъсванията, е в диапазона от 11 до 26

тетрануклеотидни повтори; при 85% от незасегнатите индивиди между двата алела има отчетлива разлика в общата дължина на комплексният участък от повтори, което съответно ги и разграничава при анализа на PCR ампликоните.

#### Премутагенни алели

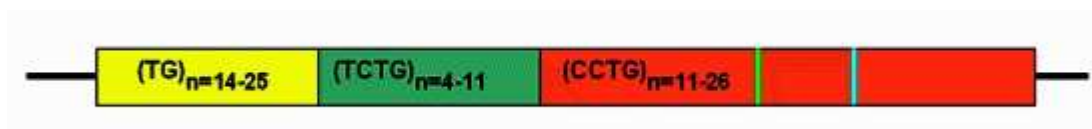
Не се докладва за размер на CNBP алелите в границите на 177-372 bp (еквивалентно на ~27-74 CCTG повтора). Все още не е известно дали нормалните алели при определена дължина, или особеностите на определена последователност, са със склонност към експанзия в патогенетичният диапазон. Секвенцията прекъсвания, която е налице в CCTG участъците на нормалните алели, не се открива в последователността от патогенната CCTG експанзия на CNBP алелите. Липсата на прекъсвания от нормалните алели може да увеличи нестабилността и предиспозицията на тези участъци към експанзия в следващите поколения, въпреки че този тип нестабилност е потвърдена при други заболявания, все още не е наблюдавана при индивиди с МД2.

В съответствие с тази хипотеза, обаче, е докладван и случай за алел при незасегнат индивид, в който 20 непрекъснати CCTG повтора са установени на хаплотип, идентичен на този, намиращ се при всички засегнати индивиди (Liquori, съавтори, 2003). Въпреки, че в този индивидуален случай не е наблюдавано увеличаване размера на експанзията при предаване в следващото поколение, е възможно, загубата на секвенцията прекъсвания да предразположи непрекъснатите участъци с CCTG повтори към експанзия в бъдещите поколения. Тъй като не беше потвърдено, че големи нормални CNBP повторни алели могат да се увеличат до патогенният обхват, то алели с 177-372 bp са посочени по-скоро като гранична експанзия, отколкото като премутации.

## Патогенни алели

В секвенираните по-малки патогенни алели, само в ССТG частта от комплекса повтори се установява експанзия. В големите експанзии, които не могат да бъдат секвенирани точно, алели по-голями от 372 bp (еквивалентно на 75 ССТG повтора) изглежда са с пълна пенетрантност в изявата на МД2. Патогенните алели варират по размер от 372 bp до повече от 44,000 bp (еквивалентно на ~75-11,000 ССТG повтора), със средна стойност приблизително 20,000 bp (еквивалентно на ~ 5000 повтора).

Фигура №.3А. Комплекса от повтори в МД2 локуса.



Участъка с МД2 повторите е комплекс, включващ повторите TG, TCTG и ССТG, в този ред. Всяко повторение може да варира по дължина. В нормалните алели, общата дължина на ССТG участъка е в диапазона от 11-26 тетрануклеотидни повтора и обикновено включва единични прекъсвания (представени на схемата като две вертикални линии). Те са променливи по брой (0-2), място в ССТG тракта, и в мотива на повторите, но обикновено са включени индивидуални GCTC и TCTG прекъсвания, разположени поотделно в ССТG тракта. В патогенните алели се наблюдава експанзия само на участъка с ССТG повторите, без прекъсвания. В резултат на което като цяло повторните дължини могат да бъдат от 75 до повече от 11 000 чисти ССТG тетрануклеотидни повтора.

## 6.2. Антиципация

При МД2 експанзията на повторите е с тенденция да бъде по-обширна от тази при МД1. Въпреки това обаче антиципацията е по-

слабо проявена, като не се наблюдава силно застъпена корелация между дължината на повторите и тежестта и ранното начало на симптомите на заболяването. Трябва да се има в предвид, че вероятно степента на антиципацията е подценена, поради изразения соматичен мозаицизъм при пациенти с МД2, което пречи на правилната оценка на явлението.

### 6.3. Соматична нестабилност

МД2 ССТГ експанзията показва , в много по-голяма степен от МД1, нестабилност при предаване в поколенията и динамичен соматичен мозаицизъм. Обстоятелството, че при пациенти с по-изразена експанзия не се наблюдава по-ранно начало на заболяването, допълнително усложнява клиничната интерпретация (Liquori C.L., съавтори, 2001; 2003).

### 6.4. Генотип-фенотип корелация

Не съществува значителна корелация между размера ССТГ повторите и възраст на поява на слабост или с други мерки за тежест на заболяването като възраст на екстракция на катаракта. Наблюдението, че фенотипните характеристики на лица с експанзия на ССТГ повторите в двата CNBP алела са в такава степен изразени като тежест, каквато е и проявата при техните хетерозиготни сибси и родители, допълнително демонстрира, че броят на ССТГ повторите, не оказва влияние върху клиничното протичане (Schoser B.G,2004a). Други автори установяват корелация между размера на повторите и възрастта на индивида с МД2, по време на която е измерен размера на експанзията, което показва, че повторите се увеличават с възрастта. (Schneider C, 2000; Liquori C.L, 2001; Day J.W, 2003).

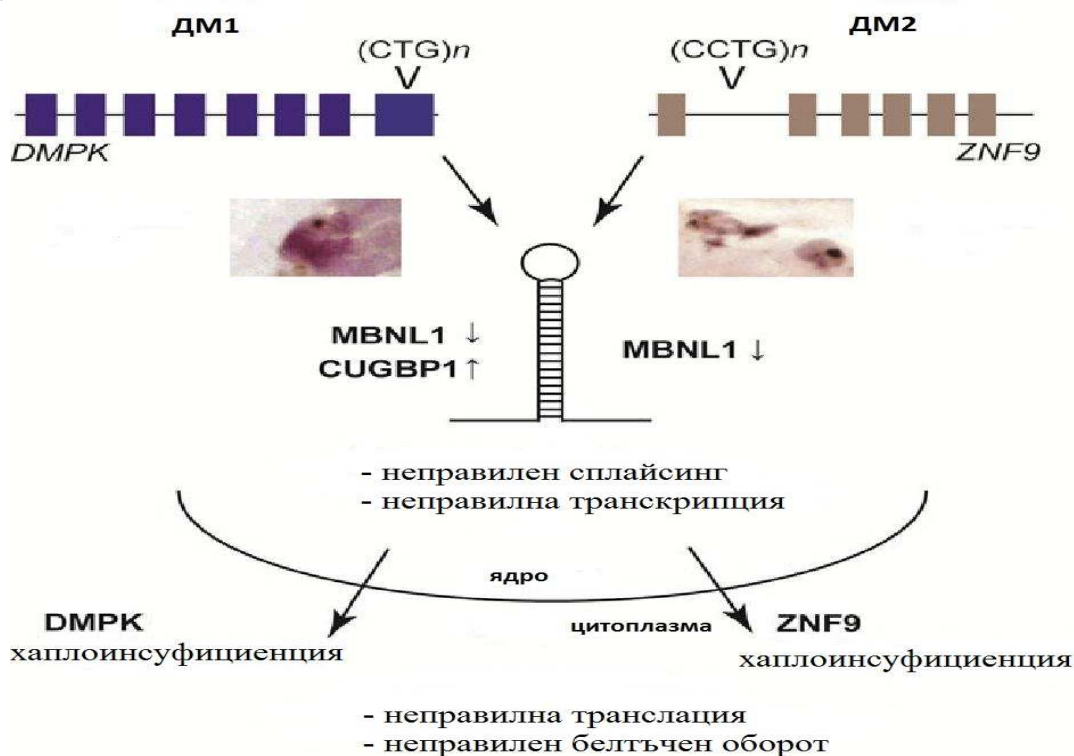
## **7. ПАТОГЕНЕТИЧНИ МЕХАНИЗМИ ПРИ МИОТОНИЧНИТЕ ДИСТРОФИИ**

Основния патомеханизъм при МД1 и МД2 е придобиване на РНК функция (Rapin, съавтори, 2005; Lee, съавтори, 2009; Liquori, съавтори, 2001). Мутационните експанзии от (CTG)<sub>n</sub> при МД1 и (CCTG)<sub>n</sub> при МД2, се транскрибират, но не се транслират. Мутантната РНК сама по себе си може да предизвика молекулярни събития, водещи до клинични симптоми. Мутантните РНК -и са задържани в ядрото, където те агрегират, оформят се рибонуклеарни включвания типични за МД1 и МД2 (Taneja, съавтори, 1995).

Мутантната РНК проявява токсичен ефект, нарушава разпределението, функция и равновесието между двата антагонистични сплайсинг фактора - MBNL1 (muscleblind - like 1) и CUGBP1 (CUG - свързващ белтък 1). Получава се нетипичен и РНК сплайсинг. Патомеханизмите включват нарушения в регулацията на сплайсинга, транскрипцията, трансляцията и белтъчния оборот (Huichalaf, съавтори, 2009).

Основните патомеханизми в МД са обобщени на фигура № 4 А.

Фигура 4 А Ключови патомеханизми при МД1 и



## МД2

Три различни модела обясняват как един тринуклеотиден повтор, в некодиращ регион на даден ген може да предизвика МД1:

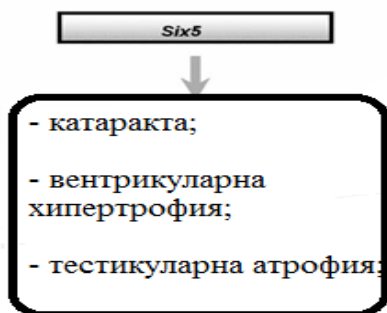
- 1) хаплоинсуфициенция на DMPK;
- 2) промяна в експресията на съседните гени;
- 3) РНК токсичност;

Моделите МД1 разкриват сложна картина, където трите отделни механизма вероятно допринасят едновременно за появата на всяка конкретна клинична характеристика на заболяването (Kaliman, съавтори, 2008.).

1) Хаплоинсуфициенцията се определя като наличието на само едно функционално копие на ген, другото копие е инактивирано чрез мутация. Единичното функционално копие на гена не произвежда достатъчно генен продукт. В МД1 СТГ експанзията се

транскрибира в РНК, съдържаща CUG експанзии и нивото на DMPK иРНК не се понижава (Krahe, съавтори, 1995), но тРНК-и се задържат в ядрото (Davis, 1997, Taneja,1995). По този начин има намаление в трансляцията на белтъка DMPK в цитоплазмата. Хаплоинсуфициенцията може да допринесе за фенотипа на МД1, особено на скелетните и сърдечните мускули, но не дава обяснение за всички клинични признаци на заболяването (Jansen, 1996; Reddy,1996).

2) CTG експанзията може да доведе до кондензация на хроматина и да промени транскрипцията на един от трите гена: самата DMPK, upstream DMWD и downstream SIX5 (Frisch, 2001; Klesert, 1997; Otten,1995; Thornton,1997). иРНК на SIX5 гена се експресира в тъкани като скелетните мускули, сърцето, очите и мозъка. DMWD се експресира в мозъка и тестисите. Подобно на първия модел, този втори модел обяснява някои, но не всички клинични признаци на заболяването. Значение на експресията на Six5 гена за МД1 патология./Фигура №.5А./.



3) РНК - токсичност се счита за основен патогенен процес в МД1. CTG-експанзията се транскрибира в иРНК-и, съдържащи CUG-повторения, чиито експорт от ядрото е блокиран. (Davis, 1997; Taneja,1995). Колкото по-голяма е експанзията, толкова по-вероятно

е образуването на силно стабилни „hairpin” структури (Napierala, 1997). По-късите експанзии формират единични нишки от CUG повтори. Мутантната РНК нарушава регулацията на алтернативния сплайсинг (Mankodi, 2000; Tapscott, 2000). РНК - сплайсингът е процес, при който интроните се отстранява от pre-mRNA, а екзони се свързват заедно. Изборът на екзони, които да се включат в зрялата иРНК прави процеса гъвкав. Така един ген може да произведе множество иРНК. Процесът на сплайсинг се контролира от регулаторни белтъци. Промените в концентрацията на тези регулаторни белтъци повлияват върху честотата на включване или пропускане (skipping) на екзон (Black, съавтори, 2003). От съществено значение за патогенезата е, че с развитието регулирането на сплайсинга не успява да премине от ембрионалния към възрастния модел на сплайсинг. Анормалната експресия на ембрионалните изоформи не са в състояние да поддържат функционалната необходимост на възрастната тъкан. Контролът на сплайсинга на pre-mRNA се осъществява чрез регулаторни белтъци от две антагонистични семейства: muscle blind-like (MBNL) и CUGBP1/ETR-3-like factors (CELF) (Timchenko, съавтори, 1996).

### **7.1 ПАТОФИЗИОЛОГИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА MBNL1 - БЕЛТЪКЪТ**

MBNL семейството се свързва с големи CUG експанзии (Kino, съавтори, 2004; Miller, съавтори, 2000) в МД1 скелетната мускулатура. Другият сплайсинг регулаторен белтък (CUG - BP1) се свързва с едноверижните CUG-експанзии, които остават в

нуклеоплазмата. Свързването на MBLN и CUG - BP1 към CUG - експанзиите причинява потискане на първия и свръхрегулирането на последния белтък с неправилен сплайсинг на pre-mRNA (Timchenko, съавтори, 2001).

Транскрипти с по-малко CUG – повтора се задържат по-рядко в ядрото, което показва, че дължината на повторенията определя ядреното задържане. Мутантните DMPK транскрипти, съдържащи CUG – експанзия, са открити в големи количества в ядрото и по-малко в цитоплазмата (Dansithong, съавтори, 2008).

Генът за белтъка – muscleblind, при *Drosophila* кодира zinc finger мотив, съдържащ homeobox белтък, необходим за терминалната диференциация на мускулите и очите (Begemann, съавтори, 2000). При хората три гена (MBNL1, MBNL2 и MBNL3) кодират muscleblind - подобни белтъци, от които MBNL1 е основната изоформа, експресираща се в сърдечния и скелетните мускули (Fardaei, съавтори, 2002). MBNL2 е повсеместно експресиран, докато MBNL3 се намира само в плацентата. MBNL1 свързва dsRNA hairpin (фуркетна) структура. Свързването му е пропорционално на размера на (Miller, съавтори, 2000) експанзията. Всички MBNL изоформи са способни да се свързват в ядрените огнища и са в състояние да причинят алтернативен сплайсинг. Въпреки това, само MBNL1 се свързва с МД патофизиологията. MBNL2 също може да играе известна роля. При нормално постнаталното развитие, MBNL1 се пренася главно от цитоплазмата към ядрото, където контролира преминаването от ембрионални към възрастни изоформи, чрез алтернативен сплайсинг на някои екзони.

Местата на свързване на MBNL1 или CUGBP1 в някои видове

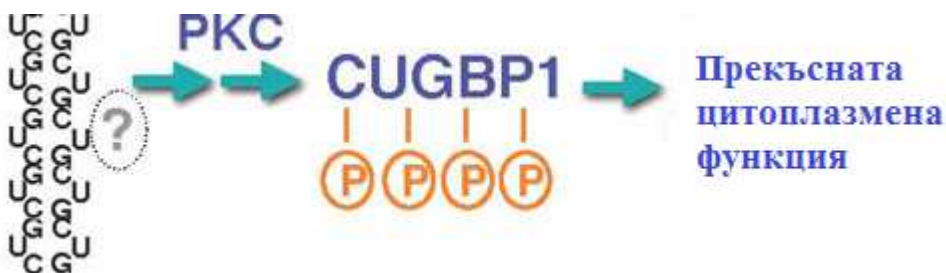
иРНК, както и молекулния ефект върху сплайсинга са известни. Например - MBNL1 свързва TNNT2 интрон upstream от екзон 5 и блокира достъпа на сплайсинг фактора U2AF65. Това води до пропускане на TNNT2 екзон 5 (Poulos M.G, съавтори, 2004).

В МД1 и МД2 , концентрацията на ядрен MBNL1 е намалена поради поглъщането му в рибонуклеарните огнища, което води до загуба на функция и непълно преминаване към възрастните изоформи на белтъка (Lin X, съавтори, 2006).

## 7.2 ПАТОФИЗИОЛОГИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА CUGBP1 - БЕЛТЪКЪТ

CUGBP1 принадлежи към семейството на CELF ( CUGBP и ETR - 3 like factors) белтъци. При нормални условия, CUGBP1 се регулира по време на мускулна диференциация, където има регулаторни функции, както в сплайсинга на pre - mRNA, така и в транслацията (Cooper, съавтори, 2007). При МД1 равновесните нива на белтъка CUGBP1 са повишени. Това се дължи на медираното му хиперфосфорилиране от протеин киназа С (PKC), което удължава полуживота на CUGBP1 и води до повишена активност.

Фигура № 6А. Хиперфосфорилиране на CUGBP1 от протеин киназа С.



Въпреки че точният механизъм на активиране не е известен. Има и други кинази, които фосфорилират CUGBP1. Това са: Akt киназа

при Ser28 (Salisbury, съавтори, 2008) и циклин D3/cdk4/6 на Ser302 (Timchenko L.T, съавтори, 2006). Фосфорилирането на различни места на CUGBP1 насочва афинитета му си към различни целеви иРНК-и. CUGBP1 се свързва специфично със стъблото на фуркетната РНК структурата при МД1. Както в ядро, така и в цитоплазмата се свързва предимно с мутантния (CUG)<sub>n</sub> транскрипт (Timchenko, съавтори, 2001). CUGBP1 не показва нарушена регулация в животински модели, които експресират експанзии от (CTG)<sub>n</sub> повтора от несвързани секвенции или в МД2, с едно изключение: CUGBP1 - eIF2 - комплекс е установено, че се увеличава в МД2 миобластите на пациентите и си взаимодейства с (CCUG)<sub>n</sub> повторите. CUGBP1 участва в дисрегулацията на сплайсинга на TNNT2 в МД1. CUGBP1 има и други функции - регулация на транслацията и иРНК стабилност. Чрез увеличаване транслацията на MEF2A (myogenic enhancer factor 2A) и p21 и последващото повишаване на други белтъци, като миогенин , CUGBP1 може да инхибира миогенезата и да забави развитието на мускулите при МД1 (Timchenko, съавтори, 2004).

## **8. ПОДХОДИ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ НА МИОТОНИЧНИ ДИСТРОФИИ**

Златния стандарт за МД1 и МД2 диагностика е Southern blot анализът.

В случай на МД1 симптомите и фамилната анамнеза са често ясни и достатъчни за клиничната диагноза. Отличителната мутация може да се потвърди с директен PCR в мястото на мутация (< 200 СТГ

повторения) или с Southern анализ за повторения по-големи от 100 повтора (Ashizawa, съавтори, 2000).

При МД2 симптомите показват такава голяма променливост, че клиничната диагноза е трудна да се постигне. Също и молекулярното диагностициране е голямо предизвикателство в МД2 поради изключително големия размер (средно около 5000 CCTG повтора) и обширна соматични нестабилност (Bachinski, 2003).

Стандартни молекулярни генетични методи, като PCR анализ не са достатъчни за проверка на мутацията. Следователно, разработването на надеждни и стандартизирани генетични тестове за потвърждаване на мутация е предизвикателство.

Repeat - primed PCR методът (RP - PCR) използва вътрешна сонда с окачена опашка, това предлага мощен инструмент за проверка на експанзиите при МД2. Няколко алтернативни, високо специфични и чувствителни метода са разработени в допълнение към RP- PCR. Модифициран Southern метод, използващ field - inversion electrophoresis (FIGE) е особено ефикасно при определяне дължината на мутация. Други Southern- базирани методи са разработени, например използване на солна киселина за обработка на гелове води до по-ефективно прехвърляне на мутантната ДНК върху попивателна мембрана.

Допълнителни методи, разработени за проверка на мутация МД2 включват long - range PCR и tetraplet - primed PCR (TP-PCR). Последният е бърз и надежден метод за диагностициране на миотонична дистрофия, както и за други заболявания с подобни мутационни механизми.

## 9. ТЕРАПЕВТИЧНИ ПОДХОДИ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С МИОТОНИЧНА ДИСТРОФИЯ

Заболяванията миотоничната дистрофия тип Щайнерт и проксимална миотична миопатия са нелечими, но има различни медикаменти и физиотерапия, които могат да облекчат някои от симптомите.

Кардиореспираторните нарушения представляват 70% от смъртността при МД1, подчертавайки необходимостта от активно наблюдение. Сърдечни аритмии по-рядко се наблюдават при МД2 (Meola, съавтори, 2006). Ранното поставяне на пейсмейкър при пациенти с МД1 може да предотврати някои от внезапните смъртни случаи.

Катарактата изисква хирургично отстраняване. Стомашно-чревни симптоми, като: коремна болка, дисфагия, повръщане и диария са често срещани при пациенти с МД1. Те могат да се появят и при пациенти с МД2 (Ronnblo, съавтори, 2002; Tieleman, съавтори, 2008). Някои от симптомите могат да бъдат облекчени с медикаменти. Лечението с креатин може да подобри мускулната сила при пациенти с МД2, но не и при пациенти МД1. Миотонията при МД1 може да бъде лекувана с мексилетин (Logigian E.L, съавтори, 2010). Изучаването на молекулярните патомеханизми при МД е довело до развитието на генни терапии и молекулярни стратегии на няколко нива. Те включват:

1. Отстраняване на експанзиите C / CUG РНК ;
2. Предотвратяване свързването на белтъци към мутантната РНК;
3. Промяна на аномалния сплайсинг;

4. Ядрен износ на мутантна РНК;

5. Свършекспресия на MBNL1 (Kanadia R.N, 2006);

6. Възстановяване на нормалните нивата на CUGBP1 от РКС дефосфорилиране (Wang G.S, съавтори, 2009).

Заглушаване на мутантната (CUG) п РНК може да се постигне по няколко метода. Използване рибозими (Penchovsky R, съавтори, 2012) или изкуствени транс- сплайсинг молекули, 3'участъка на мутантния транскрипт може да бъде заменен с редуциран брой на CTG повторенията (Chen H.Y, съавтори, 2009).

Антисенс стратегиите предизвикват деградация на мутантните транскрипти. Осъществяват се чрез въвеждане на допълнителни антисенс РНК молекули, насочени срещу DMPK 3'UTR. Това довежда до частично намаляване на патологичните ефекти при МД1. Антисенс олигонуклеотидите (AONs), които индуцират разграждането на ДНК - РНК хибрида от RNase H, са били използвани успешно в миобластите на пациенти с МД1 (Mulders S.A, съавтори, 2009).

Използването на рибозими предназначени да търсят и унищожават специфични РНК-молекули с определена дължина от напълно компютъризиран подход е иновативен метод за терапия на този тип заболявания (Penchovsky R, съавтори, 2012).

РНК интерференцията също може да се използва, за да се елиминира образуването на фуркетни структури в мутантните РНК-и. Използването на синтетични РНК, чиято цел е фуркетната РНК последователността, води до намаляване на мутантните DMPK транскрипти (Langlois M.A, съавтори, 2005).

Друг подход за избягване на патологичните ефекти на мутантните РНК е да се инхибират свързващите белтъци към фуркетните

структури, образувани от ( C/CUG )n. Група от малки молекули, като пентамидин, могат да освобождават MBNL1 от (C/CUG) повторенията.

Няколко изследвания на МД1 в миши модели показват, че патологичните ефекти на заболяването са обратими. Това прави развитието на генните терапии клинично полезно. Заболяването миотонична дистрофия продължава да е предизвикателство в молекулярната терапия.

## II. ПОСТАНОВКА НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

### 1. Въведение

През последните 105 години са събрани данни за мултисистемната характеристика на заболяването, която не може да се ограничи само на базата на клиничните неврологични изследвания. Натрупват се знания за голямата вариабилност във фенотипната изява на МД, интер- и интрафамилни различия, включително и на индивидуално ниво, в хода на развитие на болестта, чиито характеристики излизат извън рамките на разделянето им на вродена, детска, юношеска и в зряла възраст форми. Прецизната диагностика на заболяването днес изисква използването на съвременен интердисциплинарен подход, характеризиращ се със съвместните усилия на молекулярната генетика, клиничната неврология, кардиология, офталмология и други клинични дисциплини. Вече е известно, че МД се предизвикат от мутации в два гена, кодиращи различни белтъци, които обуславят двата типа на заболяването МД1 и МД2, с промени в мускулната система, с прояви на постепенно прогресираща слабост и атрофии съответно по-застъпени в дистални и проксимално отдели на крайниците. Интердисциплинарният подход осигурява диагностицирането на формите с неизявена невромускулна симптоматика и причисляването им към групата на миотоничните дистрофии, както и спомага за отдиференцирането им от други невродегенеративни заболявания. Поради съществуващата клинична и генетична хетерогенност на МД, преобладаващото схващане на изследователите е, че на този етап не може да се открие категорична

корелация между даден размер на експанзията и строго определени клиничен фенотип. Същевременно е налице и голяма интер- и интрафамилна вариабилност на клиничната картина при една и съща експанзия.

## **2. Цели, хипотези и задачи**

**Цел** на настоящото проучване е фенотипното характеризиране и изясняването на геннотип-фенотип корелациите при миотонични дистрофии и установяване размера на експанзията, с оглед прогнозиране на клиничната изява на болестта и определяне на риска от антиципация- по-тежка и ранна изява в следващите поколения. Литературният обзор, данните от предварителните клинични изследвания и нарастващият брой генетично верифицирани пациенти и фамилии с миотонична дистрофия в България позволяват да се формира следната **хипотеза**: Предполага се зависимост между размерът на експанзията и вида и тежестта на мултисистемното засягане, както и между отделните клинични изяви.

### **Задачи:**

1. Детайлно фенотипизиране на пациенти с миотонична дистрофия с използването на клинични и функционални методи.
2. Генеалогично проучване на засегнатите фамилии с оглед изясняване наличието на антиципация.
3. Събиране на кръвни проби и насочване за молекулярно-генетично изследване.
4. Разглеждане на интра- и интерфамилните вариации в клиничното протичане на миотоничните дистрофии,

причинени от сходен размер на експанзията.

5. Отдиференциране на вида и тежестта на засягане на следните системи: мускулна, сърдечна, дихателна, зрителна.
6. Сравняване на вида и тежестта на мултисистемните засягания с броят на CTG повторите.
7. Изработване на клинични насоки за диференцирано генетично изследване на Миотонични дистрофии тип 1 и 2 при фамилни и спорадични случаи в България.

### **3. КОНТИНГЕНТ НА ИЗСЛЕДВАНЕ**

За период от три години /2009-2012/ са изследвани общо 92 болни и представители на техните семейства. В проучването са включени пациенти от клиники по неврология в УМБАЛ "Александровска", УМБАЛ «Св. Иван Рилски», УСБАЛНП «Св. Наум», УМБАЛ «Царица Йоанна», както и такива от амбулаторни прегледи. Всички те са били насочени с приемна диагноза Миотонична дистрофия. Клинично и генеалогично изследвания са осъществени при всички болни. При 90 от тях са установени история на заболяването и промени в неврологичния статус, съвместими с посочената диагноза. Молекулярно-генетичното изследване е потвърдило диагнозата при 84 в 23 фамилии. Установени са мутации в гените, отговорни за МД1 и МД2. От тях при 79 с МД1 и при 5 с МД2. Според разпределение по пол съответно 41 мъже и 43 жени.

От генетично потвърдените 84 пациента с МД, се описва анамнестично фамилност при 66, генетично доказана е фамилността при 55. На потвърдените клинично и генетично пациенти с МД са

осъществени следните изследвания и консултации: лабораторни изследвания, мануално мускулно тестване, ЕМГ, ФИД, ЕКГ, ЕхоКГ, Холтер ЕКГ, невроофтальмологична консултация, невропсихологична консултация.

#### **4. МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ:**

##### 1. Клинични методи:

1.1. Снемане на анамнеза и изследване на неврологичен статус.

1.2. Невроофтальмологично изследване.

1.3 Мануално-мускулно тестване ММТ чрез МРС (Medical research council).

##### 2. Неврофизиологични изследвания:

2.1. ЕМГ и ЕНГ.

2.2. Функционално изследване на дишането.

2.3. ЕКГ, Холтер-ЕКГ, ЕхоКГ.

3. Лабораторни изследвания на серум.

4. Невропсихологично изследване.

5. Родословен метод – генеалогично проучване с оглед търсене на антиципация в засегнатите фамилии.

6. Молекулярно–генетични методи: Short PCR; TP-PCR; PCR/Southern blot за МД1 и PCR, Long range; PCR/Southern blot за МД2.

7. Статистически методи за обработка на резултатите от клиничните, както и от генотип–фенотип корелациите:

1) Дескриптивна статистика:

2) Вариационен анализ (количествени променливи) – средни стойности (средна аритметична, медиана), стандартно отклонение, минимална и максимална стойност;

- Честотен анализ (номинални и рангови променливи), абсолютни и относителни честоти;

2. Графични изображения.

2) Непараметрични методи за проверка на статистически хипотези:

- Тест на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) и тест на Шапиро-Уйлк (Shapiro-Wilk) – проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива.

- Тест на Ман-Уйтни (Mann-Witney) – сравняване на две независими групи, когато разпределението не е нормално.

- Хи-квадрат тест (Chi-square test) или точен тест на Фишер (Fisher's exact test) – търсене на връзка между две качествени променливи.

Използваното критично ниво на значимост е  $\alpha=0.05$ . Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато Р стойността (P-value) е по-малка от  $\alpha$ . За обработка на данните от проучването е използван специализирания статистически пакет SPSS версия 13.0.

При снемането на анамнезата са отчитани: възраст на първите прояви на заболяването, възраст при изследването, характеристика на първите оплаквания, настоящи оплаквания, ход на заболяването, способност за самостоятелно придвижване и необходимост от използване на помощни средства, както и възраст, на която се появява необходимост от подпомагане при придвижването. При изпращането на биологични проби (кръв) за генетично изследване са попълвани специални протоколи.

Като основни клинични инструменти за определяне на тежестта на заболяването и степента на инвалидизация при пациентите с МД е

използвана десетстепенната скала на Walton, отчитща степента на инвалидизация чрез критерии, засягащи способностите за самообслужване и справяне с ежедневните дейности (Walton и сътр., 2006); Оценъчната скала е представена в приложение №2. Използвани са данните от проведените хематологични и биохимични изследвания, серумна електрофореза. Функционално изследване на дишането (ФИД), електромиографско изследване (ЕМГ), провеждано на Dantes–Keypoint електромиограф (Natus, Copenhagen, Denmark), 12-канална ЕКГ, стандартна трансторакална Ехо КГ – М-mode, двуразмерна /2D/; пулсов /PW/ и непрекъснат доплер /CW/ и тъканен доплер /TDI/. Невроофтальмологичните са осъществявани в УМБАЛ «Александровска». Молекулярно-генетичният анализ е проведен в Национална генетична лаборатория МУ – София и Медико диагностична лаборатория «Геника» - София.

**ДНК диагностика на МД1** е изработена в Национална генетична лаборатория МУ и Медико диагностична лаборатория «Геника» и включва: **Short PCR** – обикновена амплификация чрез полимеразна верижна реакция за определяне рязмера на нормалните алели, съдържащи СТG повтора в DMPK гена (19q13.32). Получените фрагменти се оценяват по големина на автоматичен секвенатор спрямо стандарт ROX500. Пациенти, при които се детектират два нормални алела (5-50 СТG повтора) се изключват от последващи тестове и се интерпретират като нормални за МД1.

**TP-PCR/ Triplet Repeat Primed PCR/-** специфична амплификация чрез полимеразна верижна реакция, при която се използва специфичен химерен праймер-опашка, който е комплементарен на повторения СТG регион и хибридизира върху него. Получените

фрагменти се оценяват по големина на автоматичен секвенатор спрямо стандарт ROX500. Пациентите, при които се детектира опашка от фрагменти с химерния праймер, се диагностицират като болни с експанзия.

**PCR/Southern blot-** този тест се използва за приблизително оразмеряване на експандирания алел. След електрофоретично разделяне на фрагментите по молекулна маса, те се оразмеряват спрямо маркер с известни дължини на фрагментите. Ако е необходимо се използва маркирана сонда с дигоксигенин.

**ДНК диагностика на МД2** е изработена в Национална генетична лаборатория МУ и Медико диагностична лаборатория «Геника» и включва: **PCR** амплификация на маркер CL3N58 за директна оценка на CCTG повтори в интрон 1 на ZNF 9 гена (3q21). Получените фрагменти се оценяват по големина на автоматичен секвенатор спрямо стандарт ROX500. Пациенти, при които се детектират два нормални алела (<30 CCTG) се изключват от последващи тестове и се интерпретират като нормални за МД2.

**PCR** амплификация на маркер CL3N59 за индиректен анализ. Този маркер се намира на 119 кб разстояние в 3` посока на ZNF 9 гена. Получените фрагменти се оценяват по големина на автоматичен секвенатор спрямо стандарт ROX500. Пациенти, при които се детектира алел~ 280 повтора се диагностицират като засегнати, тъй като този алел е скачен със заболяването.

**Long range PCR/ Southern blot-** за оценка размера на експанзията. Фрагментите се разделят електрофоретично и се хибридизират със специфична комплементарна сонда, маркирана с дигоксигенин.

На потвърдените клинично и генетично осемдесет и четири пациенти с МД са осъществени следните изследвания и консултации, видни от табл. №3.А

**Таблица №3 А Проведени изследвания при пациенти с МД**

| <b>№</b>  | <b>Вид изследване</b>              | <b>Брой пациенти (n=84)</b> | <b>%</b>   |
|-----------|------------------------------------|-----------------------------|------------|
| <b>1</b>  | Анамнеза, вкл. фамилна             | <b>84</b>                   | <b>100</b> |
| <b>2</b>  | Неврологичен статус                | <b>84</b>                   | <b>100</b> |
| <b>3</b>  | Лабораторни изследвания            | <b>69</b>                   | <b>82</b>  |
| <b>4</b>  | Мануално мускулно тестване         | <b>75</b>                   | <b>89</b>  |
| <b>5</b>  | ЕМГ                                | <b>79</b>                   | <b>94</b>  |
| <b>6</b>  | ФИД                                | <b>52</b>                   | <b>62</b>  |
| <b>7</b>  | ЕКГ                                | <b>70</b>                   | <b>83</b>  |
| <b>8</b>  | ЕхоКГ                              | <b>70</b>                   | <b>83</b>  |
| <b>9</b>  | Холтер ЕКГ                         | <b>44</b>                   | <b>52</b>  |
| <b>10</b> | Невроофтальмологична консултация   | <b>68</b>                   | <b>81</b>  |
| <b>11</b> | Невропсихологична консултация      | <b>48</b>                   | <b>57</b>  |
| <b>12</b> | TR-PCR- МД1                        | <b>23</b>                   | <b>27</b>  |
| <b>13</b> | PCR/Southern blot- МД1             | <b>56</b>                   | <b>67</b>  |
| <b>14</b> | Long range PCR/ Southern blot- МД2 | <b>5</b>                    | <b>6</b>   |

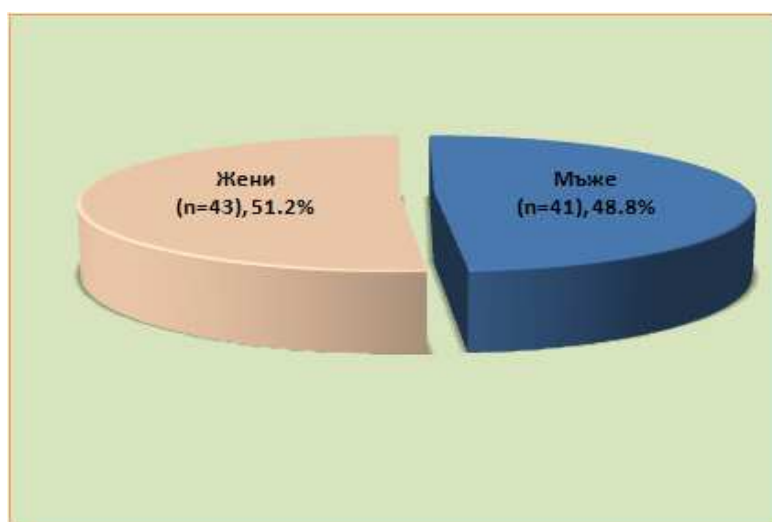
### III. КЛИНИЧНИ РЕЗУЛТАТИ

За период от три години (2009-2012) са изследвани общо 92 болни и представители на техните семейства, насочени към клиниката с диагноза: „Миотонична дистрофия” или идентифицирани при амбулаторен преглед. Клинични и генеалогични изследвания са осъществени при всички болни. При 90 (98%) от тях е установена история на заболяването и промени в неврологичния статус, съвместими с посочената диагноза. Молекулярно-генетичното изследване е потвърдило диагнозата при 84 от изследваните, в 23 фамилии (таблица № 1). Според разпределение по пол съответно 41(49%) мъже и 43 (51%) жени (графика №1).

**Таблица №1 Клинично и генетично диагностицирани пациенти с МД**

| № | ДИАГНОСТИЧНА ИДЕНТИФИКАЦИЯ            | БРОЙ ПАЦИЕНТИ (n=92) | %   |
|---|---------------------------------------|----------------------|-----|
| 1 | Насочени към НК с приемна диагноза МД | 92                   | 100 |
| 2 | Клинично потвърдена диагноза МД       | 90                   | 98  |
| 3 | Генетично потвърдена диагноза МД      | 84                   | 93  |

**Графика №1 Разпределение по пол на пациентите с МД**



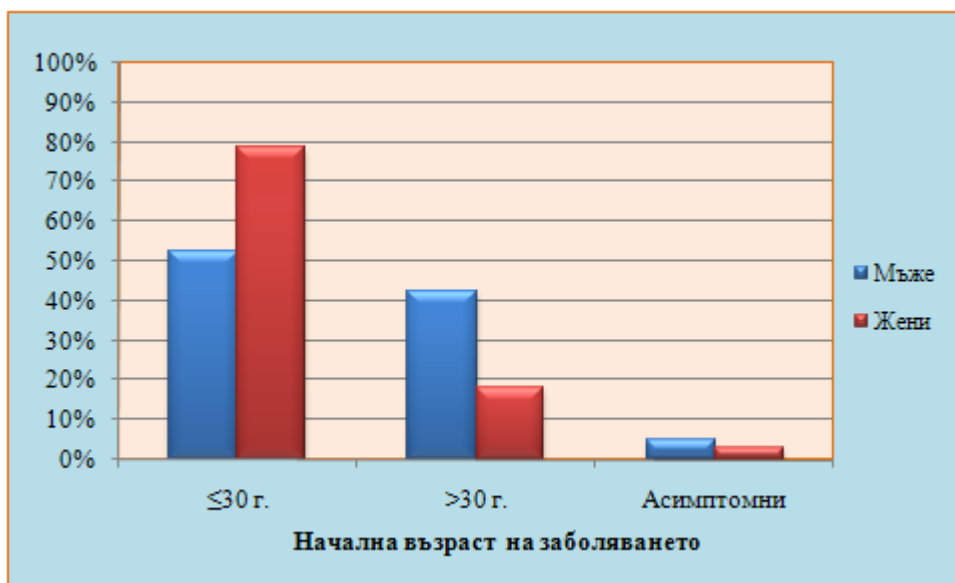
## 1. КЛИНИКО - ДИАГНОСТИЧЕН АНАЛИЗ НА ПАЦИЕНТИ С МД1

Мутации в DMPK гена се установяват при 79 пациента, 53 от тях произхождащи от 21 семейства, клинично и генетично верифицирани. От общия брой пациенти с МД1, 40 са мъже и 39 са жени. Възрастовия диапазон на пациентите към момента на прегледа варира от 8г. до 65г., средна възраст – 39.6г (SD+/- 13.92). Възрастта на изява на първите симптоми обхваща период от първата година от живота до 58г. Средна възраст на първоначална изява на заболяването – 24.8г.(SD+/-14.53). Трина пациенти са клинично асимптомни. Средната продължителност на заболяването е 14.1г.(SD+/-10.42). Установяваме следните, аналогични на литературните данни, форми: с начало в детска и ювенилна възраст, съответно при девет (11.4%) от пациентите, които са с начало на заболяването до десет годишна възраст, при 17 (21.5%) са с начало до 20 годишна възраст, а трима (4%) са диагностицирани като вродени форми на заболяването. По-голяма част (n=45, 57%) са пациенти с възрастов период на симптоматична изява от 20 до 50г., представляващи класическата форма МД 1, с начало в зряла възраст. Предвид средната възраст на първоначални изяви на заболяването (24.8г.), пациентите с МД1, обект на настоящото изследване, са условно разделени на две групи, със симптоми преди 30 годишна възраст и след нея. (таблица №2)

**Таблица №2 Възраст на начало на заболяването при МД1**

| Пол  | Начална възраст на заболяването |      |        |      | Асимптомни |   | Общо |     |
|------|---------------------------------|------|--------|------|------------|---|------|-----|
|      | ≤30 г.                          |      | >30 г. |      |            |   |      |     |
|      | n                               | %    | n      | %    | n          | % | n    | %   |
| Мъже | 21                              | 52.5 | 17     | 42.5 | 2          | 5 | 40   | 100 |
| Жени | 31                              | 79   | 7      | 18   | 1          | 3 | 39   | 100 |
| Общо | 52                              | 66   | 24     | 30   | 3          | 4 | 79   | 100 |

**Графика № 2. Възраст на начало на заболяването при МД1**



В изследваната група докато при мъжете, този процент е по-нисък е почти равен на групата над 30г. Наблюдава се статистически значима връзка между пола и възраст на начало ( $p=0.019$ ).

Пациентите с МД1 са групирани според периода на продължителност на заболяването (таблица №.3)

**Таблица №.3 Разпределение на пациентите според продължителността**

| Години | Брой пациенти | %   |
|--------|---------------|-----|
| 0-5    | 20            | 25  |
| 6-10   | 18            | 23  |
| 11-20  | 19            | 24  |
| 21-30  | 14            | 18  |
| над 30 | 8             | 10  |
| Общо   | 79            | 100 |

**Графика № 3 Относителен дял на пациентите по продължителност на заболяването**

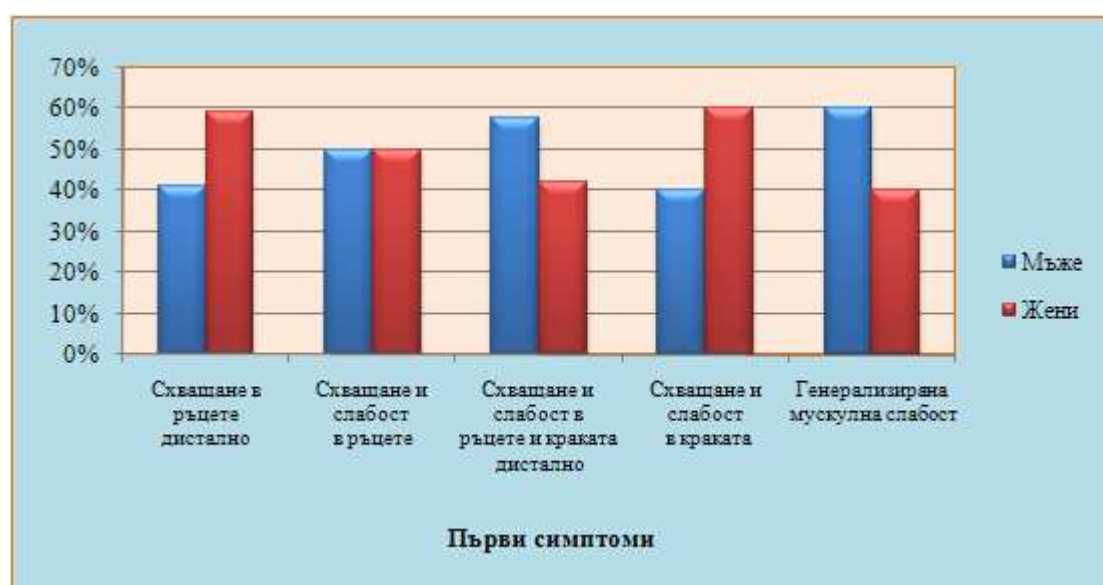


При всички пациенти с МД1 първите прояви, с инвалидизиращ ефект впоследствие, са мускулната слабост, атрофията и миотонията. Мускулната слабост се обективизира чрез проведеното мануално-мускулното тестване. От ММТ се изследва мускулната сила на проксимални групи мускули в областта на раменни, лакътни, тазобедрените, коленни стави, както и на дисталните групи в областта на глезенни, карпални, метакарпални и интерфалангеални стави. МД1 пациентите съобщават основно за следните мускулни прояви: изолирано схващане в ръцете, дистално; слабост и миотония в ръцете, едновременно; схващане и слабост и в четирите крайника, дистално; схващане и слабост изолирано в краката; генерализирана мускулна слабост, обхващаща крайници, аксиална мускулатура, лицева и дъвкателна. Резултатите са групирани и представени в табличен вид, съответно спрямо пола (таблица № 4) и възрастта на начало на заболяването (таблица № 5).

**Таблица № 4. Разпределение на пациентите по първи симптоми и пол**

| Първи симптоми                                 | Мъже |    | Жени |    |
|--|------|----|------|----|
|  | n    | %  | n    | %  |
| Схващане в ръцете дистално                     | 9    | 41 | 13   | 59 |
| Схващане и слабост в ръцете                    | 10   | 50 | 10   | 50 |
| Схващане и слабост в ръцете и краката дистално | 14   | 58 | 10   | 42 |
| Схващане и слабост в краката                   | 2    | 40 | 3    | 60 |
| Генерализирана мускулна слабост                | 3    | 60 | 2    | 40 |

**Графика №4. Разпределение на пациентите по първи симптоми и пол**



В групата на мъжете като начална симптоматика се наблюдава предимно ангажиране на дисталните отдели на четирите крайника под формата на миотонични прояви и мускулна слабост (n=14, 58%). След тях като водещи симптоми се подреждат миотония и слабост в ръцете (n=10, 50%) и проява само на схващане в горни крайници, дистално (n=9, 41%). При двама от пациентите като начална изява на заболяването се наблюдават миотонични симптоми и слабост само в долните крайници, а при трима, които са с вродена форма на заболяването е описана генерализирана мускулна слабост като

проява още от първите години на живота и изоставане в моторното и нервно-психичното развитие.

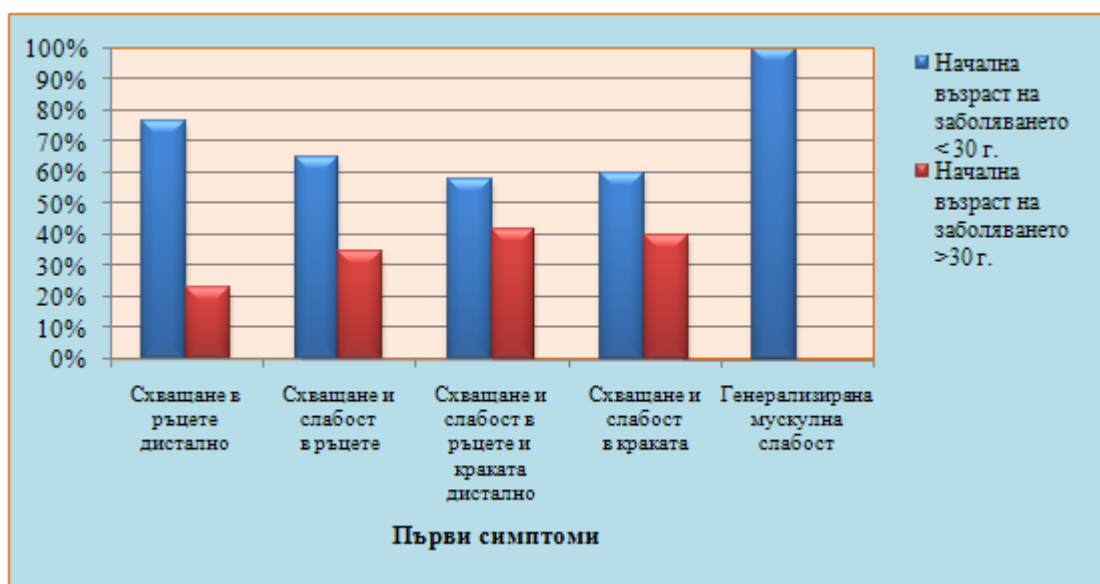
В групата на жените първоначално се наблюдават миотонични прояви в ръцете, дистално (n=13, 59%), а на второ място – схващане и слабост в горни крайници (n=10, 50%) и миотонични прояви и слабост в четирите крайника, дистално (n=10, 42%). При три от жените, първи симптоми се извяват изолирано само със схващане на краката. Две от тях са с данни за начало на заболяването в ранна детска възраст и изоставане в моторното и нервно-психичното развитие. Въпреки, че не се открива статистически значима зависимост на първите симптоми от пола (p=0,813), от таблица № 4. може да се види, че броя на засегнати мъже и жени по отношение на началните прояви на заболяването, не е равнозначен. Миотонията в горни крайници при жените е 59% , а при мъже – 41% или 59% - 41%=18 процентни пункта разлика в относителните дялове на засегнатите. Обратно, при миотония и слабост в четирите крайника – при мъже 58%, а при жени – 42% или 58%-42% =16 процентни пункта. Данните за първите симптоми на заболяването са съотнесени и спрямо условно разделените възрастови периоди (под и над 30г.), (таблица №5.)

**Таблица № 5. Разпределение на пациентите по първи симптоми и начална възраст на заболяването.**

| Първи симптоми                                 | Начална възраст на заболяването |     |     |    |
|--|---------------------------------|-----|-----|----|
|  | < 30                            |     | >30 |    |
|  | n                               | %   | n   | %  |
| Схващане в ръцете дистално                     | 17                              | 77  | 5   | 23 |
| Схващане и слабост в ръцете                    | 13                              | 65  | 7   | 35 |
| Схващане и слабост в ръцете и краката дистално | 14                              | 58  | 10  | 42 |
| Схващане и слабост в краката                   | 3                               | 60  | 2   | 40 |
| Генерализирана мускулна слабост                | 5                               | 100 | 0   | 0  |

\*В таблицата не са включени асимптомни пациенти с МД1 /3- ма на брой/

**Графика № 5 Разпределение на пациентите по първи симптоми и начална възраст на заболяването.**



Водещи симптоми при пациенти с начална проява  $\leq 30$ г., са схващане в горни крайници, дистално ( $n=17,77\%$ ), както и схващане и слабост в ръцете ( $n=13, 65\%$ ) и в четирите крайника, дистално ( $n=14, 58\%$ ). Трима от пациентите в тази група са с миотонични прояви и слабост в краката. Изводимо от възрастта на проява под 30г., е че към тази група спадат и пациентите с вродена и ранна детска форма на заболяването, при които се наблюдава изразена мускулна хипотония от първите години на живота ( $n=5,100\%$ ). Водещи симптоми при пациенти с начална проява  $>30$ г., са схващане и слабост в четирите крайника, дистално ( $n=10, 42\%$ ). Въпреки гореилюстрираната процентна разлика, не се доказва статистически значима зависимост на вида първи симптоми от възрастовия период на изява ( $p=0,691$ ).

### **1.1. Разпределение на мускулната слабост, установена от ММТ, за четирите крайника дистално и проксимално според средна продължителност на заболяването.**

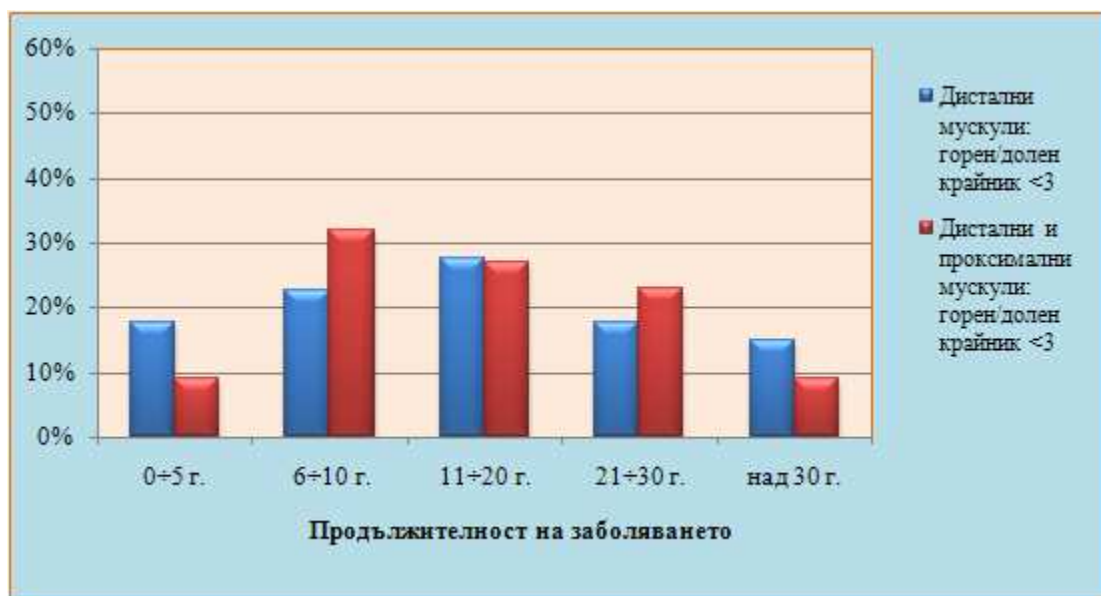
Характерно при МД1 е първоначалното, дистално засягане на мускулите на крайниците с прояви на миотония и слабост, като се наблюдава прогресия с обхващане на проксималните им отдели. В таблица №.6 е изложено разпределението на мускулната слабост според средната продължителност на заболяването. За проява на умерена до изразена мускулна слабост, се считат стойности от тестването по-ниски от три точки, като тук се включват и пациентите с пълна инвалидизация (0 точки.). Пациентите са разделени в следните периоди: 0-5г., 6-10г., 11-20г., 21-30г., над 30г. Не се наблюдава правопрпорционална връзка между нарастване на продължителността на заболяването и прогресиране на мускулната слабост и по-тежко въвличане на проксималните мускулни групи. Наблюдава се известно нарастване на процента пациенти с по-дифузно ангажиране на мускулите, в периода след петата (32%) до двадесетта (27%) година продължителност на заболяването. В по-големите периоди на развитие на заболяването не се установява значителна разлика между относителният дял на пациентите с изолираното дистално засягане и този на пациентите с по-генерализираното обхващане на крайниците. Не е открита и статистически значима разлика между мускулните прояви, разгледани във всички периоди на заболяването ( $p=0.368; 0.424; 0.984; 0.617; 0.509$ )

**Таблица №.6 Разпределение на пациентите по мускулна слабост и продължителност на заболяването**

| Продължителност на заболяването | Дистални мускули: горен/долен крайник <3 (n=40) |      | Дистални и проксимални мускули: горен/долен крайник <3 (n=22) |    | p     |
|---------------------------------|---|------|---|----|-------|
|                                 | n   | %    | n   | %  |       |
| 0÷5 г.                          | 7   | 17,5 | 2   | 9  | 0,368 |
| 6÷10 г.                         | 9   | 22,5 | 7   | 32 | 0,424 |
| 11÷20 г.                        | 11  | 27,5 | 6   | 27 | 0,984 |
| 21÷30 г.                        | 7   | 17,5 | 5   | 23 | 0,617 |
| над 30 г.                       | 6   | 15   | 2   | 9  | 0,509 |

\*В таблицата не са включени асимптомни пациенти и тези, които са със стойности от ММТ >3 /n= 17 /.

**Графика №.6.Относителен дял на пациентите по продължителност на заболяването и мускулна слабост.**



В таблица № 7 се разглежда разпределението на степените на инвалидизация при пациентите с МД1, отчетени чрез десетстепенната скала на Walton, отчитаща степента на инвалидизация чрез критерии, засягащи способностите за самообслужване и справяне с ежедневните дейности (Walton и съавтори, 2006) (виж приложение №.2).

**Таблица №.7 Разпределение на степента на инвалидизация**

| <b>Степен</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>Общо</b> |
|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-------------|
| <b>Брой</b>   | 2        | 7        | 23       | 24       | 8        | 1        | 12       | 2        | 0        | 0        | 0         | 79          |
| <b>%</b>      | 3        | 9        | 29       | 30       | 10       | 1        | 15       | 3        | 0        | 0        | 0         | 100         |

Трийсет процента от МД1 пациентите са отчетени със степен 3 на инвалидизация по десетстепенната скала на Walton. Те са с изразена мускулна слабост дистално за горни и долни крайници, но също така и вече с ангажиране на проксималните мускулни групи в четирите крайника. При тях се установяват стойности от ММТ под или равно на 3т. в бедрена мускулатура и раменен пояс, с проява на затруднено изкачване на стълби и необходимост от опора, Гауерс+ от неврологичния статус, както и слабост при отвеждане на ръцете над хоризонталата. В почти същият процент (29%) са оценени и пациенти на степен 2, където основните прояви са в малките мускули на ръцете, с хипотрофии на тенар, хипотенар, интересеини мускули; антебрахиална; тибиаална и перонеална мускулатура, в повечето случаи с перонеална и тибиаална пареза, със симетрични хипотрофии на подбедриците, с невъзможно стъпване на пети и пръсти, тип степенна затруднена походка. И в двата случая пациентите са със затруднено придвижване, но са без необходимост от ползване на помощно средство. В 15 % от МД1 пациентите се описва невъзможна самостоятелна походка без ползването на едно или две помощни средства, в този случай инвалидизацията е оценена на степен 6. При двама от пациентите, в единия от случаите завършил и с екзитус, е дадена оценка на степен 7, пациентите са на инвалиден стол, но със съхранена способност да се самобслужват с ръце и да приемат твърда и течна храна.

**Сърдечно засягане:** При МД1 се наблюдава, като част от мултисистемния характер на заболяването, кардиологично засягане, проявяващо се предимно като ритъмно проводно нарушение. Групата пациенти с МД1 (n=66) е изследвана кардиологично с неинвазивни инструментални методи\*: ЕКГ, ЕхоКГ и Холтер ЕКГ. От тях: с 12-канална ЕКГ (n=66), със стандартна трансторакална ЕхоКГ (n=66), и с Холтер ЕКГ (n=42). Абнормна ЕКГ е дефинирана като наличие на един или повече белези: различен от синусов ритъм, проводни нарушения – десен бедрен блок (ДББ), ляв бедрен блок (ЛББ), предсърдно-камерен блок (AV блок), ляв преден хемиблок (ЛПХБ), отклонения в ST-сегмента и T-върната, патологичен Q-зъбец или патологична прогресия на R-зъбеца, удължаване на QT-интервала. Чрез стандартна трансторакална Ехо КГ са оценени: левокамерна систолна функция, фракция на изтласкване, диастолна функция и състояние на клапния апарат.

Пациентите с МД1, при които и проведено ЕКГ (n=66) при 47 (71.2%) от тях ЕКГ записът е без отклонения. Един от пациентите е с хронично предсърдно мъждене, а при друг има анамнестични данни за пристъпно, предсърдно трептене. Синусова брадикардия (СЧ<60) е установена при трима пациенти (4.5%). При 6 пациенти (9.1%) е установен AV блок I степен, при 3 пациенти (4.5%) - пълен ЛББ, при четири (6.1%) ЛПХБ, при един пациент непълен ДББ, и при 10 пациенти (15.1%) - нарушена вътрекамерна проводимост (QRS>100ms). При трима пациенти (4.5%), са регистрирани реполяризационни промени. При първия – отрицателни T-вълни в III AVF, V1-V3, при втория – ST елевация в II-III AVF, V5-V6. Третият пациент е с данни за ST елевация, с отрицателни T-вълни в

прекордиалните отвеждания. ST елевацията е по типа на ранна реполяризация. При един пациент е отчетен патологичен Q-зъбец в III AVF, както и отрицателни T-вълни във V1-V3. При 40.4% (n=17) пациенти от общо 42 пациента изследвани с 24- часов Холтер ЕКГ са с данни за промени в записа. При изследваните лица, от общо отчетените ритъмно-проводни нарушения в 82.3% (n=14) се регистрират: редки надкамерни (<100/24ч.) и камерни (<30/час), екстрасистоли. При един пациент се регистрира хронично предсърдно мъждене, а при друг – краткотраен пристъп от предсърдно мъждене. При друг пациент е отчетена минимална СЧ от 16 уд./мин. с паузи от 4.5 сек. и е имплантиран постоянен електрокардиостимулатор. При трима се регистрира синусова брадикардия с основна честота между 50 и 60 уд./мин. и минимална СЧ 32 уд./мин. При трима пациенти (7.1%) са регистрирани несигнификантни паузи (<3 сек.).

От проведената при 66 от пациентите Ехо КГ при оценка на ЛК функцията се установяват: лекостепенна ЛК систолна дисфункция при четирима (6.1%) пациенти при запазена като цяло ФИ; увеличена ЛК мускулна маса при липса на хипертония в 8 (12.1%) от пациентите. При 11 (16.6%) от изследваните пациенти се наблюдава диастолна дисфункция по типа на нарушена ЛК релаксация. Показателите на ДК са нормални. Двайсет и четири (36.4%) от пациентите са данни за митрална регургитация, а 15 (22.7%) с трикуспидална регургитация. При 13 (19.7%) се установява пролапс на митрална клапа. Изчисление на базата на пациентите с митрална регургитация (n=24), относителният дял на тези с пролапс на митралната клапа е 54.2%. Резултатите от

кардиологичните изследвания на пациенти с МД1 показват, че при един пациент се среща повече от едно патологично отклонение. (*\*Провел изследванията д-р М. Господинова, Клиника по кардиология, УМБАЛ „Александровска“* )

### **Клинични примери:**

1. Пациентка на 64г. е с данни от Ехо КГ за запазена ЛК функция и контрактилитет, с дегенеративни клапни промени, с метрална и трикуспидална регургитации и с данни от Холтер ЕКГ за предсърдно мъждене без сигнификантни паузи. Назначена е антикоагулантна терапия.

2. Друга пациентка на същата възраст е с данни от Ехо КГ за: ЛК хипотрофия, ЛК митрална инсуфициенция II степен, трикуспидална инсуфициенция I степен, както и данни за аритмия е екзитирала от миокарден инфаркт. От фамилната анамнеза, тя има дъщеря с прекаран инфаркт на 35г.

3. Трета пациентка с МД1 на 58г. с Ехо КГ данни за запазена ЛК функция при диастолна дисфункция, както и ритъмно-проводни нарушения като: AV блок I степен, синусова брадикардия и многократни паузи под 3 сек. е насочена за постоянна електростимулация. При синът и (35г.), също диагностициран с МД1, е установен преходен AV блок I степен, но без сигнификантни паузи.

8. Следващ клиничен случай е на пациентка на 37г., при която има данни от Ехо КГ за гранична ЛК систолна функция във връзка с ЛББ и асинхронно съкращение на септума, с фракция на изтласкване

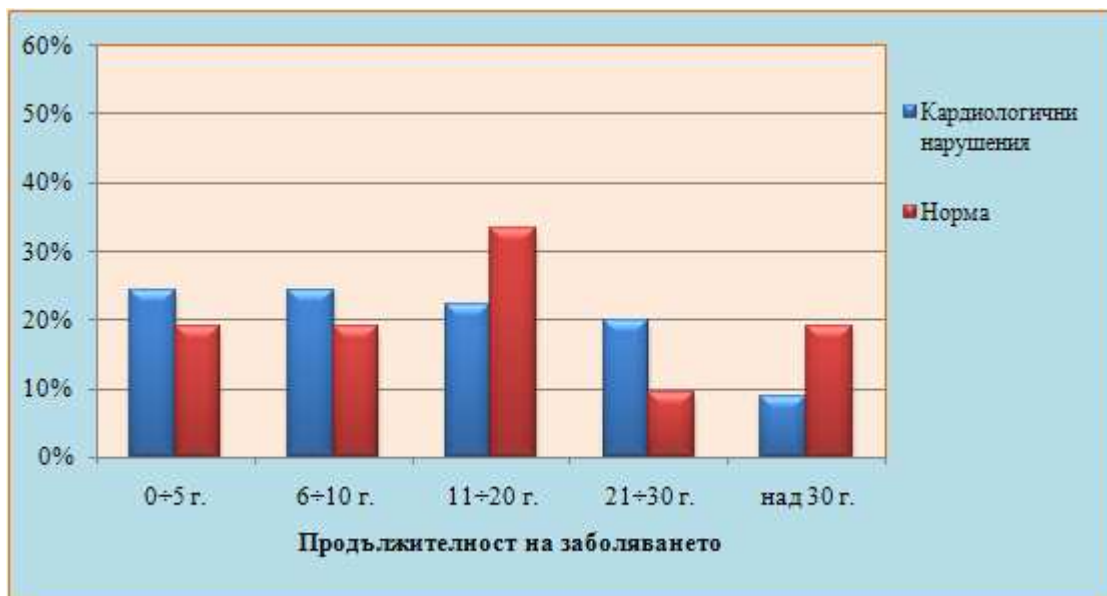
53% (при норма >55%) и групирани надкамерни екстрасистоли. Назначена терапия с бетаблокер.

В търсене на процентно съотношение при пациентите с кардиологични прояви и рестриктивен тип дихателна недостатъчност е направено сравнение между клиничните показатели за сърдечно засягане и дихателна слабост, както и съотнасянето на всеки един от тях спрямо средната продължителността на заболяването. По отношение на кардиологичните нарушения проявата им е разпръсната, като не се наблюдава нарастване на броят пациенти в по-големите периоди на продължителност на заболяването (таблица №8 А). Не се откриват статистически значими разлики между кардиологичните нарушения и разгледаните периоди.

**Таблица № 8 Разпределение на пациентите с МД1 по продължителност на заболяването и кардиологични нарушения**

| Продължителност на заболяването | Кардиологични нарушения |      | Норма |      | p     |
|---------------------------------|-------------------------|------|-------|------|-------|
|                                 | n                       | %    | n     | %    |       |
| 0÷5 г.                          | 11                      | 24,4 | 4     | 19   | 0,624 |
| 6÷10 г.                         | 11                      | 24,4 | 4     | 19   | 0,624 |
| 11÷20 г.                        | 10                      | 22,2 | 7     | 33,3 | 0,337 |
| 21÷30 г.                        | 9                       | 20   | 2     | 9,5  | 0,289 |
| над 30 г.                       | 4                       | 8,9  | 4     | 19   | 0,238 |
| Общо                            | 45                      | 100  | 21    | 100  |       |

**Графика №.7** Относителен дял на пациентите по продължителност на заболяването и кардиологични нарушения



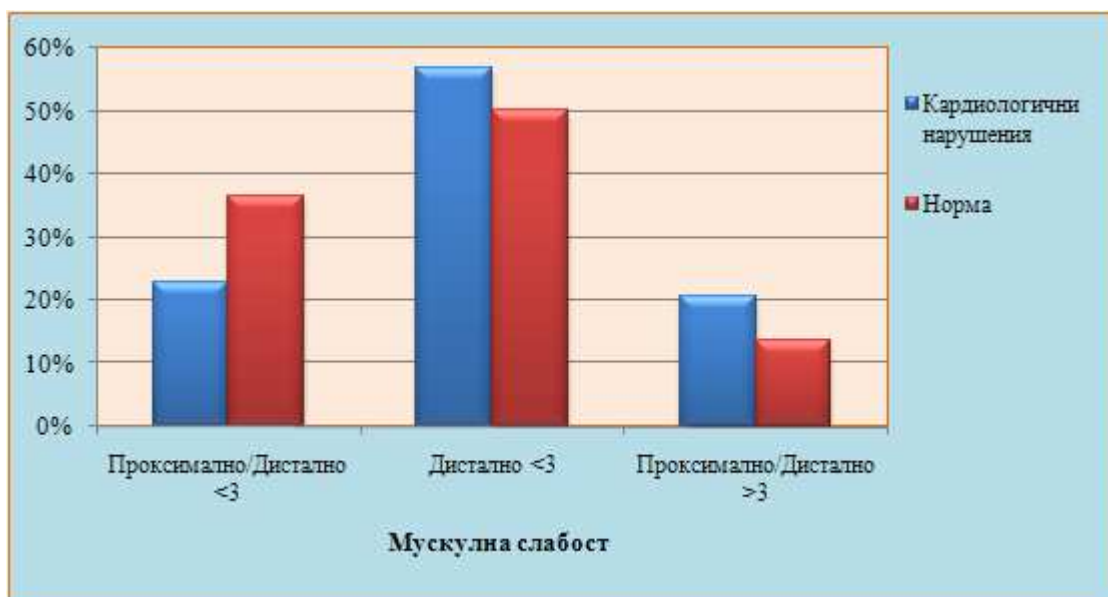
В таблица № 9 е представено разпределението на пациенти с мускулна слабост изолирано в дистални отдели на крайниците и такива с обхващане и на проксимални на степен под 3т., които са със съпътстващи кардиологични нарушения. Взети са под внимание следните кардиологични нарушения: ЛК хипертрофия; нарушена ЛК релаксация; дилатирана ЛК, дилатирана ДК; систолна, диастолна дисфункция; асинхронно съкращение на септума, хиперкинетизъм, върхова хипокинезия; холосистоличен пролапс на митрално платно, миксоматозна митрална клапа и други дегенеративни промени на клапния апарат, съответно с прояви на митрална и трикуспидална регургитация; AV блок I степен, ЛББ, ЛПХБ; синусова брадикардия, предсърдно мъждене; групирани надкамерни екстрасистоли, единични камерни екстрасистоли; сигнификантни паузи >3 сек. и несигнификантни паузи <3сек.

От изследваните МД1 пациенти, които са с данни за кардиологични нарушения (n=44) при 35 (79.5%), са с умерена и изразена мускулна слабост (<3т.). В 56.8% (n=25) от случаите са ангажирани предимно дистални отдели на четирите крайника. В 22.7% (n=10) от тях са със умерена и изразена мускулна слабост (<3т.), както дистално, така и проксимално и в четирите крайника. Както е видно от таблица №. , при останалите 20.5% (n=9) от пациентите са отчетени стойности от ММТ >3 и за четирите крайника. Не се открива и статистически значима разлика между кардиологичните нарушения и по-изразените и генерализирани прояви на мускулна слабост (p= 0.242).

**Таблица № 9 Разпределение на пациентите по мускулна слабост и кардиологични нарушения**

| Мускулна слабост            | Кардиологични нарушения |      | Норма |      | p     |
|-----------------------------|-------------------------|------|-------|------|-------|
|                             | n                       | %    | n     | %    |       |
| Проксимално/Дистално<br>< 3 | 10                      | 22,7 | 8     | 36,4 | 0,242 |
| Дистално < 3                | 25                      | 56,8 | 11    | 50   | 0,603 |
| Проксимално/Дистално<br>> 3 | 9                       | 20,5 | 3     | 13,6 | 0,497 |
| Общо                        | 44                      | 100  | 22    | 100  |       |

**Графика № 8 Относителен дял на пациентите по мускулна слабост и кардиологични нарушения.**



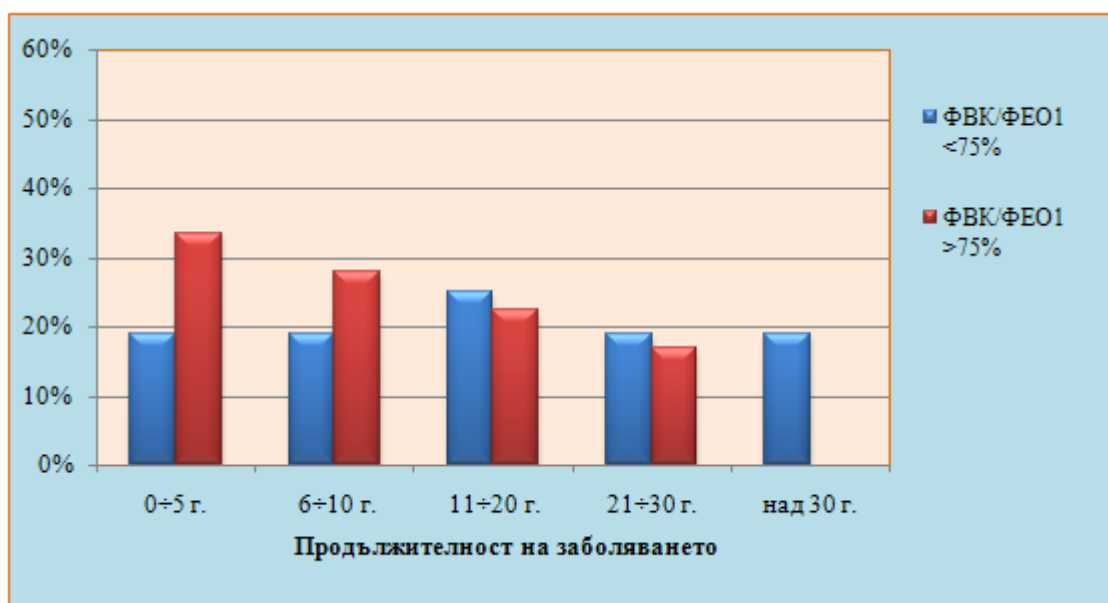
**Вентилаторна слабост.** Дихателните мускули, като диафрагма и интеркосталните мускули, се въвличат в дистрофичния процес с прогресията на заболяването. Стойности на ФВК и ФЕО1 по-ниски от 75% се асоциират с проява на вентилаторна слабост. От проведените при общо 52 пациента ФИД, се установяват стойности на ФВК и ФЕО1 под нормата при 32 (61.5%) от МД1 пациентите. Представените в таблица №10 резултати, очертават нарастване на пациентите, със стойности на ФВК и ФЕО1 под нормата, аналогично на увеличаващата се продължителността на заболяването. Като в групата на МД1 пациенти, с продължителност на заболяването над 30 години, при всички изследвани, се отчитат снижени показатели на дихателните функции. Отчете се и статистически значима разлика ( $p= 0.049$ ). Сравнено с параметри на по кратките периоди (от 0-5г. и 6-10г.), където процентът пациенти в норма (ФВК и ФЕО1 >75%) обхваща по-голяма част от изследваните, и в двете групи без статистически значима разлика

( $p=0.238$ ;  $p=0.459$ ). В групата на пациенти с продължителност на заболяването 11-20г. ФИД беше компроментирано в една част от случаите поради различни причини. В три от случаите поради неразбиране на указанията и несъдействие от страна на пациенти с ментална ретардация. Докато при друга част не са отчетени резултати поради инсуфициентно изпълнение на указанията за провеждане изследването, вследствие на изразена слабост на лицевите мускули и по-специално на м. орбикуларис орис .

**Таблица № 10** Разпределение на пациентите с МД1 по продължителност на заболяването и вентилаторни нарушения.

| Продължителност на заболяването | ФВК/ФЕО1 <75% |      | ФВК/ФЕО1 >75% |      | p     |
|---------------------------------|---------------|------|---------------|------|-------|
|                                 | n             | %    | n             | %    |       |
| 0÷5 г.                          | 6             | 18,8 | 6             | 33,3 | 0,238 |
| 6÷10 г.                         | 6             | 18,8 | 5             | 27,8 | 0,459 |
| 11÷20 г.                        | 8             | 25   | 4             | 22,2 | 0,825 |
| 21÷30 г.                        | 6             | 18,8 | 3             | 16,7 | 0,857 |
| над 30 г.                       | 6             | 18,8 | 0             | 0    | 0,049 |

**Графика № 9** Относителен дял на пациентите по продължителност на заболяването и ФВК/ФЕО1

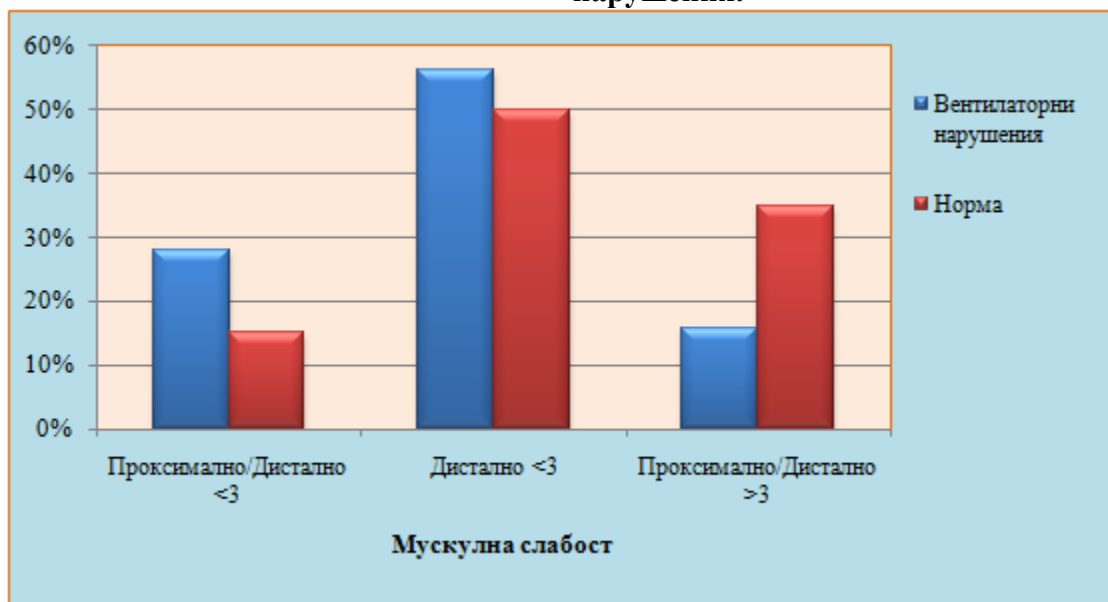


Прогресията на мускулната слабост води до ангажиране по-изразено и на проксимална мускулатура, включително и дихателните мускули. От проведеното ФИД в 32 от случаите стойности на ФВК и ФЕО1 са под нормата (<75%). При тези пациенти данните от ММТ показват генерализирана слабост, с по-изразено обхващане и на проксимални отдели на мускулите (<3 т.), при 28.1% (n=9) от пациентите. В най-голям процент (56.3%) са тези с по-тежко засягане на дистални (<3т.), при по-умерено ангажиране на проксималните мускули (>3т.). В изследваните групи не се открива статистически значима разлика (p=0.452; p=0.874; p=0.202), (табл. №11).

**Таблица №11** Разпределение на пациентите с МД1 по мускулна слабост и вентилаторни нарушения

| Мускулна слабост         | Вентилаторни нарушения |      | Норма |      | p     |
|--------------------------|------------------------|------|-------|------|-------|
|                          | n                      | %    | n     | %    |       |
| Проксимално/Дистално < 3 | 9                      | 28,1 | 3     | 15.0 | 0.452 |
| Дистално < 3             | 18                     | 56.3 | 10    | 50.0 | 0.874 |
| Проксимално/Дистално > 3 | 5                      | 15,6 | 7     | 35.0 | 0.202 |
| Общо                     | 32                     | 100  | 20    | 100  |       |

**Графика № 10** Относителен дял на пациентите по мускулна слабост и вентилаторни нарушения.



Четиридесет и девет кардиологично изследвани пациенти са и с проведен ФИД, като при 32 (65.3%) с данни за вентилаторна недостатъчност. Потърсена е зависимост и между проявата на кардиологични и дихателни нарушения при пациентите с МД1. От пациентите с установени данни за вентилаторна слабост, са разгледани поотделно показателите ФВК и ФЕО1 под 75% спрямо това това дали са асоциирани с кардиологични нарушения. Относителният дял на тези с ФВК<75%, но без кардиологични нарушения (64.3%) е равнозначен с този на пациентите комбинирани с кардиологични прояви (60.5%), съответно не се отчита и статистически значима разлика (p=0.805). Подобна зависимост не се открива и при разглеждане на ФЕО1 показателя (p=0.866).

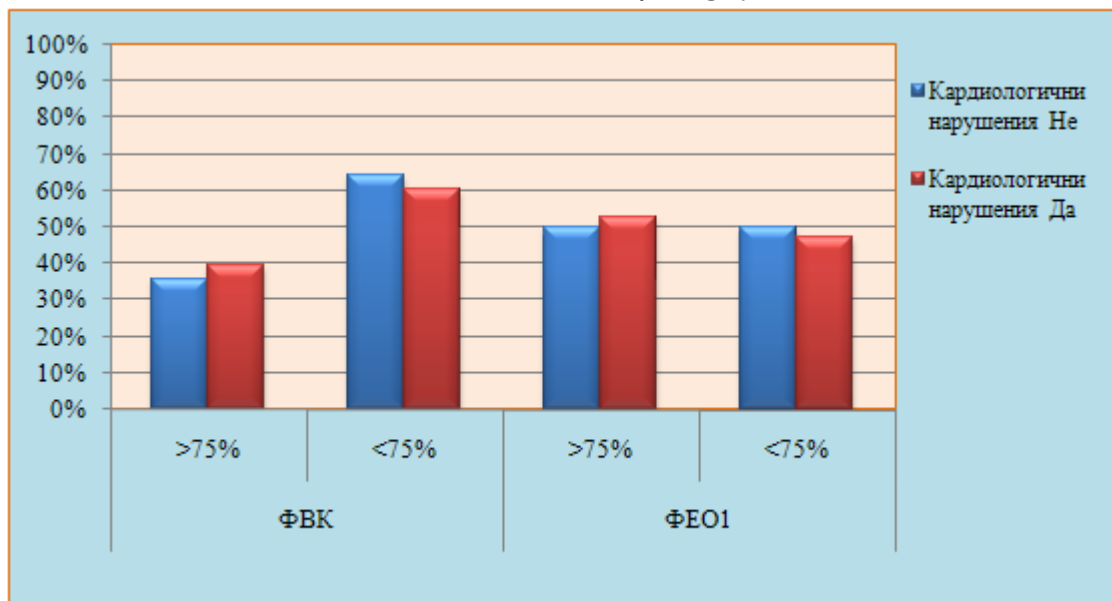
**Таблица № 12 Зависимост между кардиологични нарушения и ФВК<75%**

| ФВК  |      | Кардиологични нарушения |      | Общо | p     |
|------|------|-------------------------|------|------|-------|
|      |      | Не                      | Да   |      |       |
| >75% | Брой | 5                       | 15   | 20   | 0,805 |
|      | %    | 35,7                    | 39,5 | 38,5 |       |
| <75% | Брой | 9                       | 23   | 32   |       |
|      | %    | 64,3                    | 60,5 | 61,5 |       |
| Общо | Брой | 14                      | 38   | 52   |       |
|      | %    | 100                     | 100  | 100  |       |

**Таблица № 13 Зависимост между кардиологични нарушения и ФЕО<75%**

| ФЕО1 |      | Кардиологични нарушения |      | Общо | p     |
|------|------|-------------------------|------|------|-------|
|      |      | Не                      | Да   |      |       |
| >75% | Брой | 7                       | 20   | 27   | 0,866 |
|      | %    | 50,0                    | 52,6 | 51,9 |       |
| <75% | Брой | 7                       | 18   | 25   |       |
|      | %    | 50,0                    | 47,4 | 48,1 |       |
| Общо | Брой | 14                      | 38   | 52   |       |
|      | %    | 100                     | 100  | 100  |       |

**Графика № 11 Относителен дял на пациентите по кардиологични нарушения и ФВК/ФЕО1.**



#### **1.4. Невроофтальмологични нарушения при пациенти с МД1**

От проведени при 68 пациенти невроофтальмологични изследвания при 44 (65%) се открива офталмологична симптоматика \*\*. Като най-чести и специфични за заболяването нарушения са промените в лещата, слабост на м. леватор палпебре супериор и мм.орбикуларес окули, както и в някои случаи – засягане на екстраокуларните мускули. Специфична за заболяването находка, е атипичен пигментен ретинит. В детайли резултатите са както следва: катаракти при 44 пациенти на възраст от 13 до 64г., ср.в.=39.6г.. Нарушение в околомоториката, включващи двустранна птоза се диагностицират при 23 пациенти, като при един от тях е тя е унилатерална. Хипофункция на екстраокуларните мускули, се наблюдава при 6 пациента, инсуфициенция на конвергенцията при двама. Откриват се ретинални промени при директна

офтальмоскопия в три от случаите, като при един от тях е налице атипичен пигментен ретинит. Установени са следните лещени промени: типична картина на „*Christmas tree cataract*” (СТС) – катаракта тип „коледно дърво”, се визуализира при 4 пациента; докато промени в лещата по типа на катаракта тип „*iridescent dust*” (цветен прах) е наблюдавана при 13 пациента. Тип posterior subcapsular cataract (задна субкапсуларна катаракта) е намерена при 3 от пациентите; тип задна субкапсуларна катаракта плюс иридесцентен прах или комбинирана катаракта е налична при 9 пациенти. Оперирани от катаракта към момента на изследването се 12 пациенти, на възраст под 60г., като най-ранна е 30г.

**Таблица № 14 Най-чести невроофтальмологични нарушения при МД1**

| Тип         | Катаракти                  |                        |             |           | Птоза     | Хипо функция |
|-------------|----------------------------|------------------------|-------------|-----------|-----------|--------------|
|             | СТС/<br>iridescent<br>dust | задна<br>субкапсуларна | комбинирани | оперирани |           |              |
| <b>N=44</b> | <b>17</b>                  | <b>3</b>               | <b>9</b>    | <b>12</b> | <b>23</b> | <b>6</b>     |
| <b>%</b>    | <b>39</b>                  | <b>7</b>               | <b>20</b>   | <b>27</b> | <b>52</b> | <b>14</b>    |

Изнасят се клинични примери със специфична и комбинирана симптоматика: **1.** Пациентка на 59г. с описана манифестна инсуфициенция на *м.м.орбикуларис окули* двустранно и с *лагофталм*; със слабост на *м.леватор* палпебре и двустранна, умерено изразена симетрична птоза. Пациентката е с данни за двустранна предна и задна кортикална катаракта и иридесцентен прах. **2.** Пациентка на 45г. е с промени в преден очен сегмент, изразяващи се в катаракта тип иридесцентен прах в едното око и *спицовидна катаракта*, както и данни за инсуфициенция на *м.м.орбикуларис окули* двустранно и изразен *лагофталм*. **3.** Пациент

на 35г. е с двустранно субкапсуларно помътняване на лещите, с единични сивкави, точковидни опацитати; двустранна симетрична птоза и с данни при изследване на ретините за леко разместване на пигмента в заден полюс, без да се очертават пигментни струпвания или атрофия на ретинопигментния ендотел. **4.** При пациентка на 37г. се открива спицовидна, предимно кортикална катаракта, тип СТС с множество иредисцентни частици, както и цветна, задна субкапсуларна катаракта. Наблюдава се птоза с клепачна цепка 8 милиметра. **5.** Мъж на 48г. с данни за лимитация на абдукцията, двустранно и инсуфициенция на конвергенцията; с умерено изразена птоза (клепачна цепка 8 милиметра в дясно и 7 милиметра в ляво, при норма – 12 мм). С хомогенно уплътнена структура на лещите и дифузни, сивкавобелезникави, праховидни опацитати. **6.** Пациентка на 48г. е с данни за иредисцентен прах, многоцветен прах, заднокапсуларна катаракта в едната око и оперативно отстранена в другото на 37г. В този случай, при изследване на очните дъна се установяват чрез електроретинография\*\*\* характеристики на атипичен пигментен ретинит. В приложение №1 се представят електроретинограми на пациент със специфичната за заболяването находка - атипичен пигментен ретинит. На представените електроретинограми се визуализира демонстративна парафовеоларна активност, по-голяма отколкото тази във фовеата, особено в ляво око и спад във функционалната активност на фовеата вляво. (\*\*Провели изследването проф. С.Черникова,дмн; д-р В. Бориславова; \*\*\*д-р Р. Георгиев)

### **1.5 Неврофизиологични изследвания при МД1**

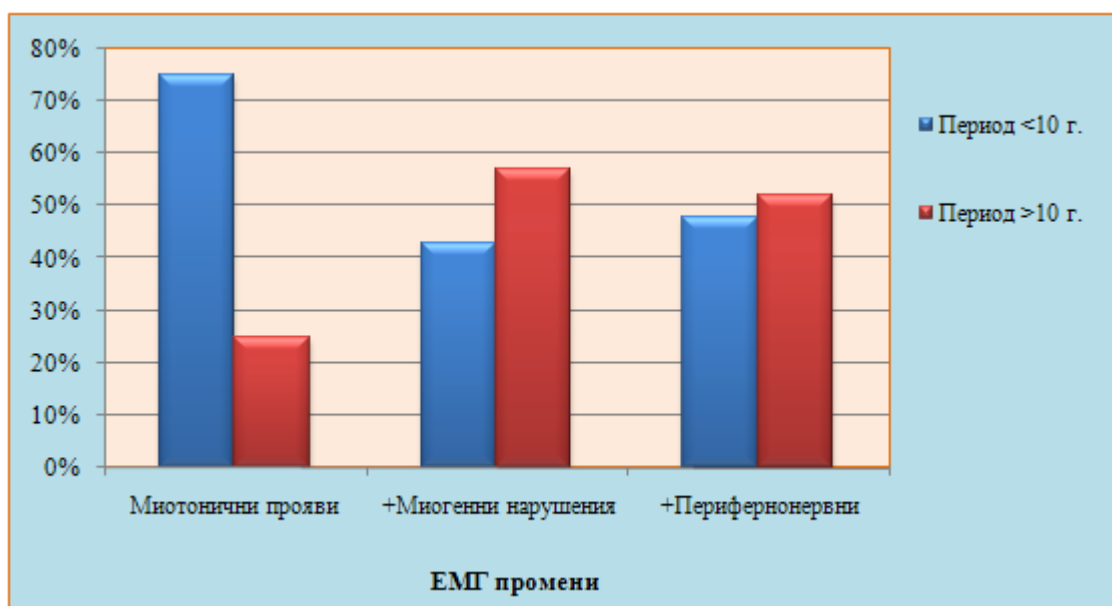
Проведени са електромиографии (ЕМГ) при 75 пациенти, както и електроневрографии (ЕНГ) в търсене на перифернонервна увреда. При 75 от пациентите, 97% (n=73) от тях чрез иглено ЕМГ са установени миотонични залпове, миогенни промени, данни за перифернонервна увреда на сетивни и двигателни влакна в четирите крайника. Двама от пациентите (2.6%) са с нормален ЕМГ запис. Миогени увреди са търсени в горни крайници: м. абдуктор полицис бревис, м.бицепс брахии, м. делтоидеус, в долни крайници: м. вастус латералис, м.тибиалис anteriор, а при част от пациентите и лицевите мускули, като м. орбикуларис окули, м. орбикуларис орис. Промените в записите, характерни за миогенна увреда на изследваните групи мускули, с преобладаващи ниски и тесни – със скъсено времетраене, полифазни акционни потенциали, патологичен интерферентен тип трасе с ниска амплитуда, се наблюдавани при 87% (n=65) от пациентите с МД1. В 11% (n=8) се установяват миотонични прояви без данни за миогенни увреди. В един от случаите се има данни за миотонични залпове и аксонна периферно-стволова увреда на двигателните влакна в крайниците. От проведената електроневрография (ЕНГ) в 28% (n=21) се установяват данни за периферна невропатия (ПНП) по аксонен тип за двигателните влакна на горни и долни крайници (медианус, улнарис, перонеус). В четири от случаите перифернонервната увреда е на двигателни влакна в горни крайници и по-тежко засегнати сетивни и двигателни влакна в долни крайници, с данни за аксонна дегенерация. В таблица №.15 представяме разпространението на различните промени, отчетени на ЕМГ/ЕНГ

записите, спрямо продължителността на заболяването. В началото на заболяването се наблюдават предимно миотонични прояви, като с напредване на дистрофичния процес се прибавят и типичните за миогенната увреда характеристики. При 57 % от пациентите, с период на развитие на заболяването над десет години, ЕМГ записът отчита както миотонични, така и миогенни промени. При 43% от изследваните периодът е по-кратък. При пациентите с перифернонервна увреда не се наблюдава зависимост с продължителността на заболяването. При тях процентът на мъжете е по-голям (67%) от този на жените. Пациентите с подобни нарушения са на средна възраст 43,8 г. (SD +/- 12,25), а тези без засягане на периферните нерви са на средна възраст около 33,1г. (SD +/- 13,79). Средната продължителност на заболяването при пациенти с ПНП е 13,9г.(SD +/-12,52) е почти еквивалентна спрямо тази на пациентите със запазена проводимост на периферните нерви, която е 13г.(SD +/-10,61). Открива се асоциация със съпътстващ нарушен въглехидратен толеранс и захарен диабет тип 2 при осем (n=8, 38%) от пациентите с ПНП. Двама (9.5%) от пациентите са с данни за дислипидемия и обездитас III степен.

**Таблица № 15** Разпределение на пациентите според ЕМГ промени и продължителност на заболяването

| ЕМГ промени         | Продължителността на заболяването |    |        |    |
|---------------------|-----------------------------------|----|--------|----|
|                     | <10 г.                            |    | >10 г. |    |
|                     | n                                 | %  | n      | %  |
| Миотонични прояви   | 6                                 | 75 | 2      | 25 |
| +Миогенни нарушения | 19                                | 43 | 25     | 57 |
| +Перифернонервни    | 10                                | 48 | 11     | 52 |

**Графика №.12 Относителен дял на пациентите по продължителност на заболяването и ЕМГ промени.**



#### **1.4. Промени в лабораторни показатели на пациенти с МД1**

**1.4.1 Креатинфосфокиназа (КФК)** - при общо 66 изследвани пациенти с МД1, 36 (54.5%) са с повишени стойности на КФК, като при мъжете те достигат до 623 U/L (при норма до 200U/L) и до 570U/L при жените (при норма до 180U/L).

**1.4.2 Гама-глутамилтрансфераза (ГГТ)**- от общо 58 изследвани пациенти с МД1, стойностите на ГГТ са повишени при 19 (33%), като при мъжете те достигат до 463U/L (при норма до 50U/L), а при жените до 296U/L (при норма до 35U/L). Трябва да се подчертае липсата на чернодробна патология от друг произход по време на изследването.

**Щитовидни хормони (Т3, Т4, ТСХ)**- при 53 изследвани пациенти с МД1, стойностите на Т3, са в референтни граници. Стойности на Т4 бележат повишение в един случай - 27.14 pmol/l при норма 12-22 pmol/l при пациентка с придружаващо заболяване

дифузна струма и занижени стойности ТСХ. В друг случай един пациент има понижени стойности на Т3 – 11.28 pmol/l и повишение на ТСХ – 9.950 mU/L. Четирима от пациентите са с абнормно ТСХ, в два от случаите е повишено, съответно – 4.301 и 9.950 mU/L (референтни граници от 0.270 до 4.2 mU/L), а в други два случая, ТСХ е понижено, съответно до 0.015 и 0.199 mU/L. Трябва да се отбележи, че от изследваните пациенти с МД1, при които има нормални стойности на щитовидните хормони, осем са с придружаващо заболяване на щитовидната жлеза или анамнеза за оперативна интервенция.

**1.4.4 Имуноглобулини:** от изследвани общо 38 пациента с МД1, за имуноглобулин тип Г /ИгГ/, снижение под прицелните стойности (7.0-16.0g/L), се отчита при 18 (47%), като най-ниски са отчетени 1.78g/L. Имуноглобулин А дефицит е описан при двама пациенти, майка и син. ИгМ е в норма при всички изследвани пациенти с МД1.

**1.4.5. Кръвна захар:** От проведените изследвания за кръвна захар на 66 пациенти с МД1, 13 (19.7%) са с данни за повишени стойности. Един от тях е с новооткрит захарен диабет тип 2; а при четирима се доказва нарушен въглехидратен толеранс след проведени допълнителни изследвания. Други двама пациенти са с диагноза захарен диабет тип 2 и корегирани стойности.

**Таблица № 16 Лабораторни изследвания на пациенти с МД1**

| Показател | К<br>Ф<br>К | %           | ГГТ | %           | КЗ | %           | Иг<br>Г | %         | Т4<br>>/<br>< | %          | Т<br>С<br>Х | %          |
|-----------|-------------|-------------|-----|-------------|----|-------------|---------|-----------|---------------|------------|-------------|------------|
| Пациенти  | <b>36</b>   | <b>54.5</b> | 19  | <b>32.7</b> | 13 | <b>19.7</b> | 18      | <b>47</b> | 2             | <b>3.8</b> | 4           | <b>7.5</b> |
| Общо      | 66          | 100         | 58  | 100         | 66 | 100         | 38      | 100       | 53            | 100        | 53          | 100        |

## **2. КЛИНИКО - ДИАГНОСТИЧЕН АНАЛИЗ ПРИ ПАЦИЕНТИ С МД2**

Клинико-генетично са изследвани шест пациенти с МД2, от които двама мъже и четири жени. Възрастовия диапазон на пациентите към момента на прегледа варира от 42г. до 57г., средна възраст – 55,5г. Възрастта на изява на първите симптоми обхваща периода от 40г. до 54г. със средна възраст на начало 47г. Средната продължителност на заболяването е 8.4г. Един от пациентите е с генетична диагноза МД2, но е асимптомен. Той има сестра с разгърната клинична картина на заболяването. Началните симптоми при четирима от пациентите се изразяват в схващане и слабост в краката проксимално, а в един от случаите, схващане и слабост в ръцете – дистално. От клиничното изследване се установява изразена слабост и в четирите крайника, повече проксимално; флексорни мускули на шията и Гауерс + при четирима от пациентите. Хипотрофии в проксимални отдели на долни и горни крайници се наблюдават при трима. При друг пациент с МД2, хипотрофиите са само в подбедрената мускулатура, а останалите двама нямат такива. Мускулната слабост и миотоничните прояви се обективизират чрез проведените изследвания: ММТ и ЕМГ. При четирима от пациентите, ММТ тестването отчита стойности под три точки на проксимални мускулни групи в четирите крайника. При друг пациент подобни стойности са показани в дистални отдели на долни крайници. Данните от ЕМГ записите показват патологична находка при пет от пациентите. Миогенна увреда и миотонични феномени се установяват в проксималните мускули на четирима от изследваните. Пациент с първоначална клинична диагноза МД1, е с

данни за миогенна увреда и миотонични залпове в четирите крайника дистално. При нито един от пациентите с МД2 не се открива периферна нервна увреда след проведените ЕНГ изследвания. По отношение на кардиологичните нарушения при пациенти с МД2, могат да се отиференцират: нарушена левокамерна релаксация/диастолна дисфункция – двама от изследваните; горногранична дебелина на лява камера с дегенеративни промени на аортната клапа и митрална регургитация при един; с пароксизмална аритмия – един пациент. От проведеното функционално изследване на дишането, стойностите на ФВК и ФЕО1, са в референтни граници. В групата на пациентите с МД2 средната възраст към момента на провеждане на невроофтальмологичното изследване е 55 +/- 3 години. При тях катарактата е единствен невроофтальмологичен признак, който е налице в 100% от изследваните пациенти (n=6). В приложение № 2 демонстрираме пациент с МД2 и наличие на множество цветни опакитати (сини и зелени), праховидни размери, заобиколени от по-едри белезникави опакитати, разположени в кортекса на лещата. Един от пациентите с МД2 е опериран на 49г. от катаракта, двустранно. В групата пациенти с МД2, изследвани невроофтальмологично, не е наблюдавано нарушение на околомоториката и птоза на клепачите. Относно засягането на ендокринната система, се описва една пациентка с МД2 оперирана по повод възел на щитовидната жлеза, с постоперативен хипотиреоидизъм и хормонозаместваща терапия. Лабораторните резултати отчитат абнормни стойности в: КФК 227 и 342 U/L при двама от изследваните; ГГТ - 67 U/L. Стойности в нормата за кръвна захар и имуноглобулини, са отчетени при всички пациенти с МД2.

#### IV. РЕЗУЛТАТИ ОТ ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

##### 1. ГЕНЕТИЧНИ РЕЗУЛТАТИ ПРИ МД1

За период от три години (2009-2012) са диагностицирани клинично 92 пациента с МД. От тях 84 са с генетично потвърдена диагноза. Установени са мутации в гените, отговорни за МД1 и МД2. От тях при 79 (94%) с МД1 и при 5 (6%) с МД2. От генетично потвърдените 84 пациента с МД, се описва анамнестично фамилност при 66 (79%), генетично доказана е фамилността при 55 (65%), (таблица № 17).

Таблица № 17 Фамилност при пациенти с МД

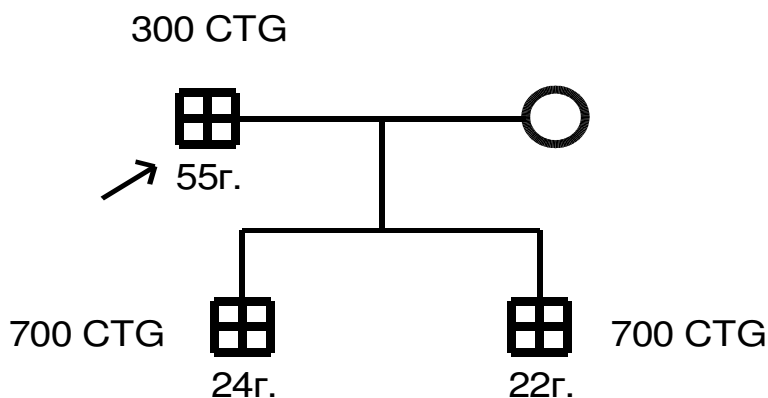
| № | ДАННИ ЗА ФАМИЛНОСТ | БРОЙ ПАЦИЕНТИ<br>(n=84) | %  |
|---|--------------------|-------------------------|----|
| 1 | По анамнеза        | 66                      | 79 |
| 2 | Генетично доказана | 55                      | 65 |

За да се илюстрира наличието на антиципация, се представят 14 семейства с МД1, селектирани според клинико-генетичната им характеристика. Тя включва проследяване на възрастта на начало и тежестта на заболяването в поколенията, съпоставени с броя на СТG повторите.

**Семейство №1:** Клинико-генетични данни за засегнати две поколения. Генетично верифицирани са трима члена – баща и двамата му сина. Индексен пациент е мъж на 55г. и синовете му на 24 и 22г. Начало на оплакванията при бащата - на 52г., при синовете, съответно на 16 и 17г. Първи симптоми от миотония и слабост в ръцете дистално и при тримата. В момента на изследването при бащата се наблюдава изразена генерализирана мускулна слабост и хипотрофии в крайниците, тялото и областта на главата на фона на сравнително изчерпана миотония. Походката е силно затруднена,

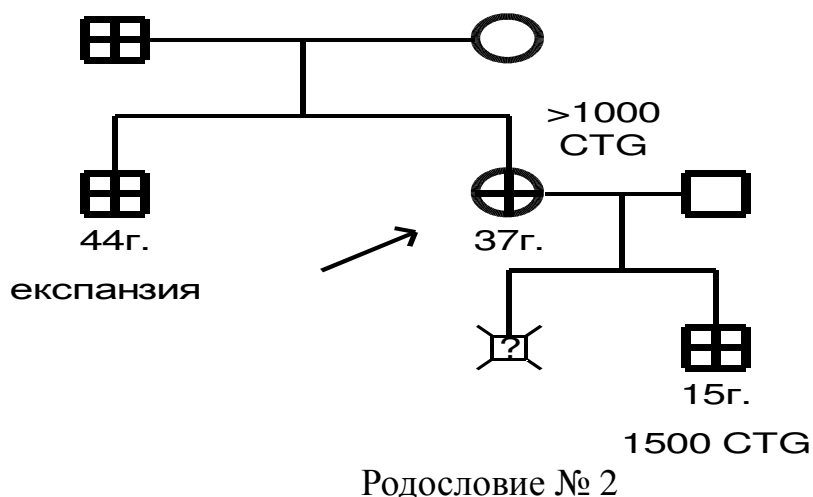
до невъзможност за придвижване без помощно средство, в следствие на перонеална и тибиялна пареза. Поради обхващане на проксимална и аксиална мускулатура е затруднено изкачването по стълби и изправяне от легнало и седнало положение (Гауерс ++). При синовете освен миотоничните прояви има данни и за мускулни хипотрофии в четирите крайника, дистално. Индексният пациентът е със степен на инвалидност по скалата на Walton бт., а синовете му са оценени на степен 2. Данни за кардиологични нарушения има и в двете поколения, като във второ поколение се включват и ритъмно-проводни. Офталмологични нарушения се отчитат и в двете поколения. Установява се нарастване на СТГ повторите във второто поколение, от 300 СТГ при индексния пациент, до 700 СТГ при синовете му. Тези данни, наред с клиничната прогресията могат да предполагат наличие на механизми на антиципация.

Родословие №1



**Семейство №2:** Клинико-генетични данни за засегнати три поколения. Първо поколение – с клинична диагноза, баща. Генетично верифицирани са членове от второ и трето поколение. Индексен пациент е жена на 37г., неин брат на 44г. и неин син на 15г. Начало на оплакванията от слабост и миотония в ръцете, дистално датират от юношеска възраст при индексния пациент и нейният брат. В трето поколение заболяването се проявява като вродена форма на МД1 с първи прояви: генерализирана хипотония, дихателна недостатъчност, отслабени сукателен и хватателен рефлекс и рефлекс на Моро; липсващи сухожилно-надкостни рефлексии. В момента на изследването при пациентите от второ поколение се наблюдава слабост, включително и мускулни хипотрофии и в четирите крайника, дистално, с перонеална и тибиялна пареза. Походката е затруднена, възможно придвижване без помощно средство. Макар и по-слабо, е затруднено изкачването по стълби и изправяне от легнало и седнало положение (Гауерс +). Степен на инвалидност по скалата на Walton 3т. и при двамата пациенти от второ поколение. В трето поколение, пациентът с вродена форма на МД1 е с генерализирана мускулна слабост и хипотрофии, включително и еквиноварусни деформитети на стъпалата; изразена хипомимия с лагофталм. Поради известно компенсирание на проксималната слабост в момента на изследването е оценен по скалата на Walton с 2т. От проведеното невропсихологическо изследване при пациента се отчита леко умствено изоставяне с IQ=55\*. Данни за изразени кардиологични нарушения има при индексната пациентка от второ поколение. Офталмологични нарушения се отчитат и при тримата пациенти,

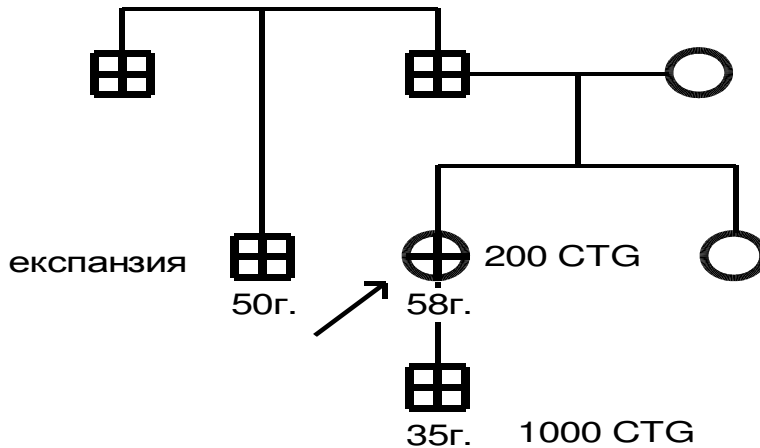
като сходни за второ и трето поколение са двустранната птоза и лагофталма, а катаракти се наблюдават само при един от пациентите от второ поколение. Установява се нарастване на CTG повторенията в третото поколение, от над 1000 CTG при майката, до 1500 CTG при нейният син. Тези данни, наред с клиничната прогресията могат да предполагат наличие на механизми на антиципация. (\*Провел невропсихологическото изследване, д-р Т. Чамова, доц. Райчева)



**Семейство № 3:** Клинико-генетични данни за засегнати три поколения. Първо поколение – по анамнестични данни, бащи на двама първи братовчеди. Генетично верифицирани са трима члена от второ и трето поколения, майка, син и първи братовчед на майката по бащина линия. Индексен пациент е жена на 58г. Начало на оплакванията от слабост и миотония в ръцете, дистално датират от 25г. възраст във второто поколение. В трето поколение заболяването се проявява като вродена форма на МД1 при мъж на 35г. в момента на изследването. Първи прояви: генерализирана хипотония, отслабен сукателен рефлекс и липсващи сухожилно-надкостни рефлексии. В момента на изследването при пациентите от второ

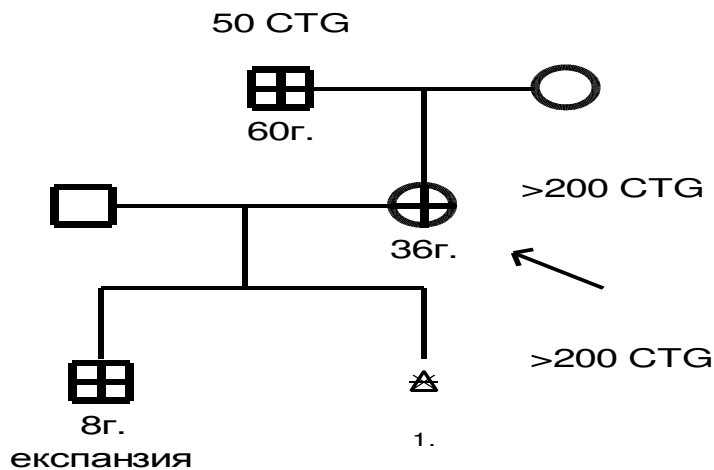
поколение се наблюдава мускулна слабост в четирите крайника, включително и мускулни хипотрофии, по-изразени дистално и по-леко проксимално, перонеална и тибиялна пареза. Походката е затруднена, възможно придвижване без помощно средство. Макар и по-слабо, е затруднено изкачването по стълби и изправяне от легнало и седнало положение (Гауерс +). Степен на инвалидност по скалата на Walton за пациентите от второ поколение, индексен – майка и нейн братовчед, са съответно 3 и 2т.. Пациентът с вродена форма на МД1 от трето поколение е с ганерализирана мускулна слабост, по-изразена дистално с тибиялна и перонеална пареза, с еквinovарусни деформитети на стъпалата; проксимално със скапуле алате, (Гауерс ++), аксиална слабост с лумбална хиперлордоза, със слабост на шийни флексорни мускули, хипомия, хипотрофии на темпорални и букцинаторни мускули. Оценен по скалата на Walton с 6т. От проведеното невропсихологическо изследване при него установява леко когнитивно нарушение и конструктивна апраксия. Данни за изразени кардиологични нарушения има при индексната пациентка от второ поколение и пациентът с вродена форма на МД1 от трето поколение. Кардиологичните нарушения са по типа на ритъмно-проводни, като индексната пациентка е насочена за постоянна електростимулация. Офталмологични нарушения се отчитат само при пациентът от второ поколение (братовчед) - типична за заболяването катаракта СТС. Установява се нарастване на СТГ повторите в третото поколение, 200 СТГ при майката, 1000 СТГ при нейният син. Тези данни, наред с клиничната прогресията могат да предполагат наличие на механизми на антиципация.

Родословие № 3



**Семейство №4:** Клинико-генетични данни за засегнати три поколения. Първо поколение – генетично доказан асимптомен пациент на 60г., баща. Във второ и трето поколение, също а доказана експанзия на СТГ повторите след пренатална диагностика на индексната пациентка (жена на 36г.) с установяване на засегнат плод. Проведен аборт по медицински показания. Индексната пациентка има и момче на осем години, от първата бременност, с установена експанзия, но без фенотипна проява. Начало на оплакванията при индексната пациентка се характеризира със слабост и миотония в ръцете, дистално и датира от 27г. и възраст. В момента на изследването се наблюдава слабост и мускулни хипотрофии в четирите крайника, дистално, в лицеви, шийни и дъвкателни мускули. Поради затруднена походка, тибиялна и перонеална пареза, е оценена на степен 2т по скалата на Walton. Данни за начална катаракта тип иридисцентен прах. Установява се нарастване на СТГ повторите в третото поколение, от 50 СТГ в първо, до >200 СТГ при индексната пациентка и >200 СТГ в засегнатия плод. Тези данни, наред с клиничната прогресията могат да предполагат наличие на механизми на антиципация.

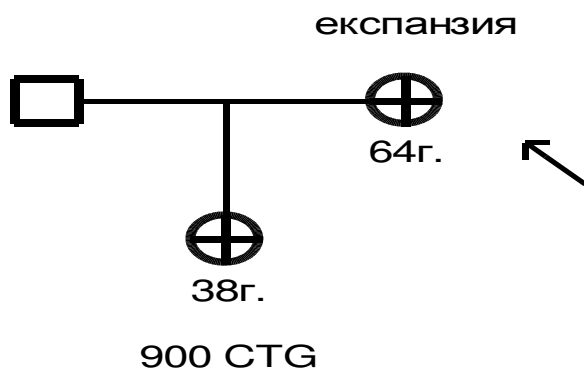
Родословие №4:



**Семейство № 5:** Клинико-генетични данни за засегнати две поколения. Генетично верифицирани са двама члена от първо и второ поколение, майка и дъщеря. Индексен пациент е жена на 64г. Начало на оплакванията от слабост и миотония в четирите крайника, дистално датират от 58г. възраст. Във второ поколение, дъщеря на 38г. с начало на оплакванията от 30г. възраст, характеризиращи се със схващане в ръцете и долната челюст. В момента на изследването и при двете пациентки се наблюдава: слабост и хипотрофии в четирите крайника, по-изразено в дисталните отдели, с тибиялна и перонеална пареза. Проксимална слабост и хипотрофии в по-лека степен на глутеална, бедрена и раменна мускулатера, (Гауерс+). Поради невъзможно придвижване без помощно средство, индексната пациентка е със степен на инвалидност по скалата на Walton – 6т., а нейната дъщеря – 3т. Кардиологичните нарушения се изразяват в предсърдно мъждене, съответно за майката, а при дъщерята в холосистоличен пролапс на предно митрално платно, ФИ-49% и ритъмно-проводни нарушения. Във второ поколение се отбелязват данни за два специфични за МД1 невроофтальмологични

белега: комбинирана катаракта (задна, субкапсуларна и иридисцентен прах) и унилатерална птоза. При индексната пациентка е установено наличие на експанзия, а при нейната дъщеря са доказани 900 CTG повтори. Може да се предполага нарастване на повторите.

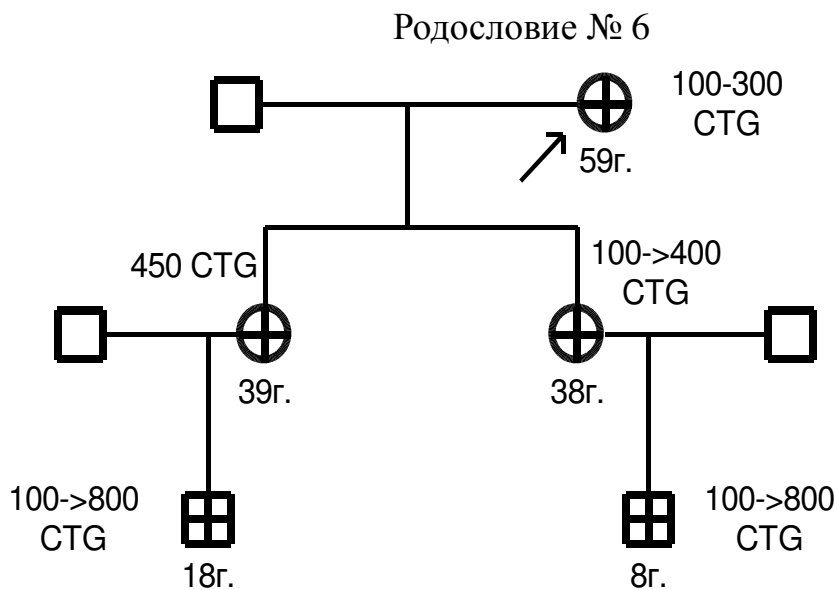
Родословие № 5



**Семейство № 6:** Клинико-генетични данни за засегнати три поколения. Генетично верифицирани са петима члена от трите поколения. Индексен пациент е жена на 59г., с две дъщери на 39г. и 38г. и техните две деца съответно на 18г. и 8г. Начални оплаквания при индексната пациентка на възраст 43г. и при една от дъщерите (38г.) на възраст 25г., са слабост и миотония в ръцете, дистално, при другата (39г.) заболяването се проявило на 15 г. със слабост в долни крайници. При по-малкият от внуците (8г.), първите симптоми са с начало от седем годишна възраст, а при по-големият (18г.) от 16г., като и при двамата се изразявали в периодични болки и схващания в мускулите на четирите крайника. За по-големият внук (18г.) има данни за забавено ранно невропсихическо развитие (фразеологична реч на 3г.), при нормално ранно моторно развитие (проходил на 1г.). В момента на изследването при индексната пациентка има мускулна

слабост и хипотрофии в четирите крайника, предимно дистално, с перонеална и тибиялна пареза. Походката е затруднена, възможно е придвижването без помощно средство. Макар и по-слабо, е затруднено изкачването по стълби и изправяне от легнало и седнало положение (Гауерс+). Степен на инвалидност по скалата на Walton 4т. От второ поколение в единият от случаите (39г.) се наблюдават слабост и хипотрофии само в ръцете дистално, а в другият (38г.) са включени и дистални отдели на долни крайници, мимически и дъвкателни мускули. В трето поколение по-малкият внук (8г.) е без данни от изследванията слабост и хипотрофии, с нормален неврологичен статус, докато при по-големият (18г.) се отчитат хипотрофии и в четирите крайника, повече дистално, с перонеална и тибиялна пареза, еквиноварусни деформитети на стъпалата, хипотрофии на дъвкателни мускули, дисфония, дисфагия, както и данни от проведеното невропсихологическо изследване за леко умствено изоставяне IQ=55. Пациентките от второ поколение и от трето поколение единият внук (18г.) са оценени по скалата на Walton с 2т. Данни за изразени кардиологични нарушения има при индексната пациентка от първо поколение, при дъщерите и са леки нарушения, докато в трето поколение не са отчетени такива. Офталмологични нарушения се отчитат в първо поколение с разгърната картина на типичните за МД1 лещени промени и слабост на очните мускули, а във второ поколение има начални белези на тези промени. От генетичното изследване има данни за мозаицизъм при четири от пациентите, както и нарастване на СТG повторите в третото поколение. От 100-300 СТG (59г.) в първо поколение, съответно 450 СТG (39г.) и 100- >400 СТG (38г.) във второ

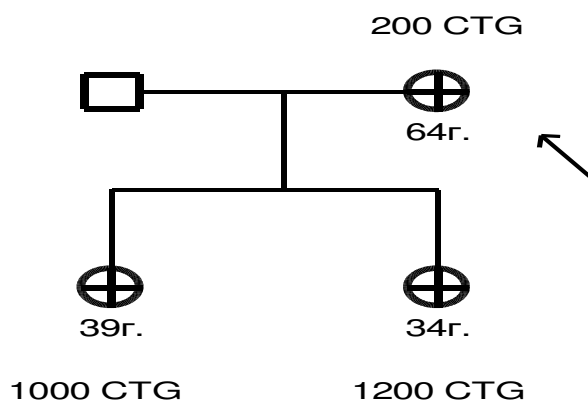
поколение, до 100- >800 CTG (18г. и 8г.) в третото. Тези и клиничните данни предполагат наличие на механизми на антиципация.



**Семейство № 7:** Клинико-генетични данни за засегнати две поколения. Генетично верифицирани са трима члена от първо и второ поколение, майка и две дъщери. Индексният пациент е жена на 64г., с две дъщери на 39г. и 34г., с начални оплаквания от слабост и миотония в ръцете, дистално, съответно при индексната пациентка от възраст 40г., при една от дъщерите (39г.) от 10г. възраст, а при другата (34г.) от възраст 29г. В момента на изследването индексната пациентка е с генерализирана мускулна слабост и хипотрофии в четирите крайника, на инвалиден стол, със степен на инвалидност по скалата на Walton 7г. Във второ поколение в единият от случаите (34г.) се наблюдават слабост и хипотрофии проксимално и дистално, в крайниците, лицевите мускули, с перонеална и тибиялна пареза, силно затруднени походка, ставане от

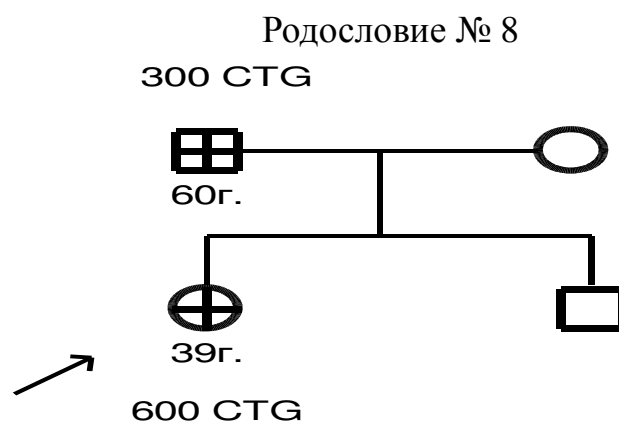
клекнало положение, изкачване на стълби, Гауерс++. По-голямата дъщеря (39г.) е с идентична фенотипна характеристика, макар и в по-лека степен. Пациентките от второ поколение са оценени по скалата на Walton с 5т. Данни за изразени кардиологични нарушения има при индексната пациентка от първо поколение, екзитирала от миокарден инфаркт, по-голямата дъщеря е данни за сърдечно заболяване. Офталмологични нарушения се отчитат при двете пациентки от второ поколение- начални катаракти типични за МД1. Генетичните изследвания показват нарастване на СТГ при пациентите от второ поколение, от 200 СТГ при майката, до 1000 СТГ при едната (39г.) и 1200 СТГ при другата дъщеря (34г.), а това от своя страна наред с клиничните характеристики е доказателство за антиципация.

Родословие № 7



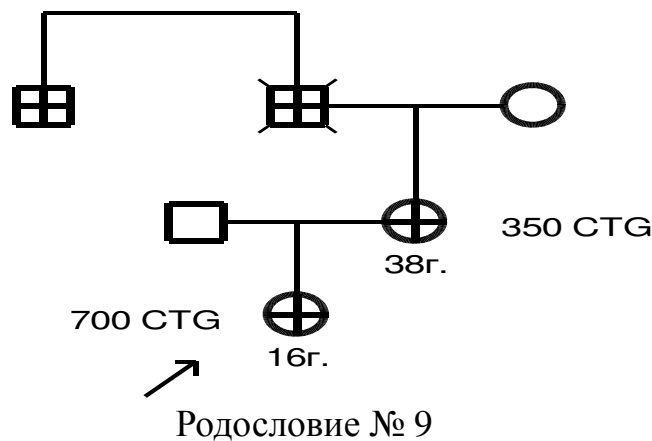
**Семейство № 8:** Клинико-генетични данни за засегнати две поколения. Първо поколение пациент на 60г., баща, чиито начални прояви са от 50 годишна възраст, са схващане в ръцете дистално. Индексният пациент е във второ поколение, жена на 39г. с начало на оплаквания от 21г. възраст, характеризиращи се с миотония в ръцете,

дистално. В момента на изследването при пациентите от двете поколения се наблюдава слабост и мускулни хипотрофии в четирите крайника, по-изразено дистално, също така в мимическите и дъвкателните мускули, в по-слаба степен са обхванати шийните, аксиалните и проксималните мускулни групи. Поради силно затруднена походка и придвижване с помощно средство бащата е оценен на степен бт., докато при индексната пациентка походката е нарушена, но възможна без помощно средство, при силно затруднено изправяне от клекнало положение и изкачване на стълби, с оценка 4т. по скалата на Walton. Пациентът от първо поколение е с данни за тежко кардиологично заболяване, екзитирал вследствие на миокарден инфаркт, а неговата дъщеря е с данни за дилатация на дясна камера и малък перикарден излив. Бащата е с данни за операция по повод двустранна катаракта, а при пациентката е установена типичната катаракта тип иридисцентен прах. Установява се нарастване на СТГ повторите във второ поколение, от 300 СТГ в първо, до 600 СТГ при индексната пациентка. Тези данни, наред с клиничната прогресията могат да предполагат наличие на антиципация.



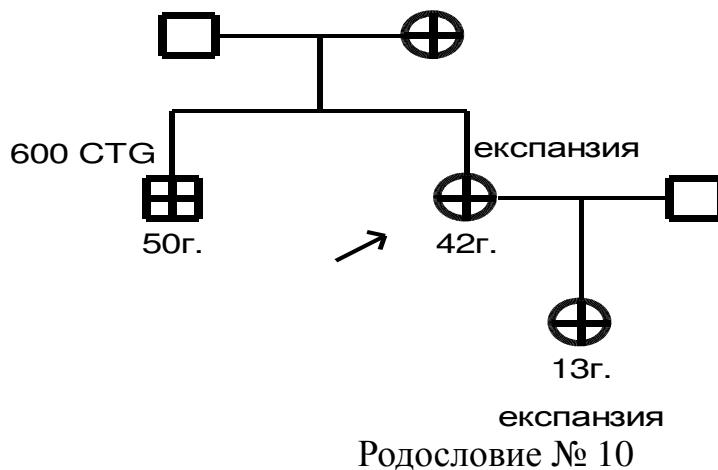
**Семейство № 9:** Клинико-генетични данни за засегнати три поколения. Индексната пациентка е на 16 г. и е от трето поколение. Първо поколение – по анамнестични данни, дядо (с начало на оплакванията 37 г., починал) и брат на дядото по майчина линия (починал) с мускулна слабост и загуба на самостоятелна походка, диагностицирани като миотонична дистрофия. Във второто поколение е жена на 38 г., с начални прояви- схващане и слабост в ръцете дистално от 30 годишна възраст. Индексният пациент е в трето поколение, жена на 16 г с начални прояви от 15 г. възраст, характеризиращи се със слабост и миотония в крайниците дистално както и данни за леко изоставяне в ранното моторно и невропсихическо развитие. В момента на изследването при пациентите от двете поколения се наблюдава слабост и мускулни хипотрофии в четирите крайника, по-изразено дистално, също така в мимическите и дъвкателните мускули, като при майката е отчетено значително ангажиране също така и на шийните, аксиалните и проксималните мускулни групи, със силно затруднена походка и придвижване с помощно средство бащата е оценен на степен 6т. по скалата на Walton. Докато при индексната пациентка походката е нарушена, но възможна без помощно средство, при силно затруднено изправяне от клекнало положение и изкачване на стълби, с оценка 4т. по скалата на Walton. Проведеното невропсихологическо изследване при пациентката отчита леко умствено изоставяне с IQ=53. От кардиологичните изследвания, пациентките от първо и второ поколение са с данни съответно за умерен хиперкинетизъм и холосистоличен пролапс, митрална и трикуспидална регургитация, както и отчетени и при двете ритъмно-проводни нарушения.

Майката е оперирана повод двустранна катаракта, а при индексната пациентка се открива типичната катаракта тип иридисцентен прах. Установява се нарастване на СТГ повторите в следващото поколение, от 350 СТГ в първото, до 700 СТГ във второто. Тези данни, наред с клиничната прогресията предполагат наличие на антиципация.



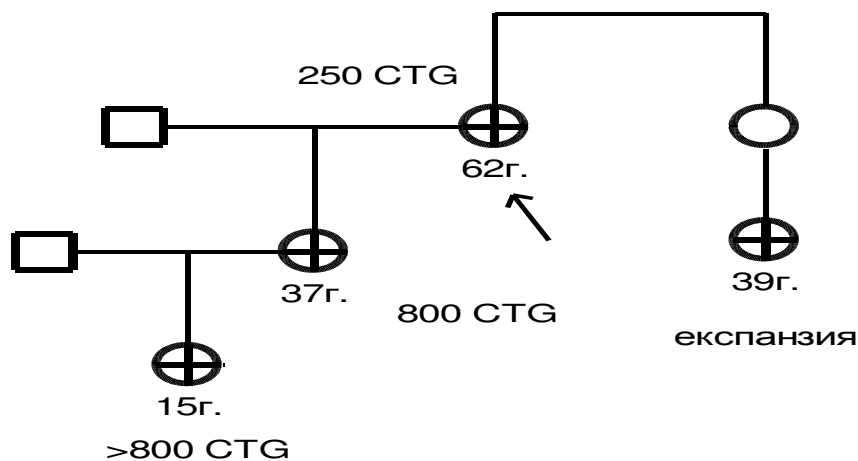
**Семейство № 10:** Клинико-генетични данни за засегнати три поколения. Първо поколение – с анамнестични данни за майка със схващане и слабост в ръцете дистално. Генетично верифицирани са трима члена от второ и трето поколения. Индексен пациент е жена на 42г., неин брат на 50г. и нейната дъщеря на 13г. Начало на оплакванията от миотония в ръцете, дистално датират от второто десетилетие при индексния пациент и нейният брат, а в трето поколение на 8 годишна възраст. В момента на изследването при един от пациентите от второ поколение има слабост и мускулни хипотрофии в четирите крайника, с перонеална и тибиялна пареза, затруднена походка до степен на придвижване с помощно средство, затруднено изправяне от легнало и седнало положение (Гауерс ++).

Степента на инвалидност при този пациент по Walton е 6т. Индексната пациентка е с предимно дистални прояви, променена походка, но придвижване без помощно средство. При нея по-слабо, е затруднено изкачването по стълби и изправяне от клекнало положение (Гауерс +), степен на инвалидност по Walton 3т. Трето поколение е с начална слабост в краката дистално и промяна на походката и се оценява с 2т. по Walton. При нея е проведеното невропсихологическо изследване, от което се установяват граничен интелект (IQ=72), нарушени езекутивни функции и обхват на вниманието. Кардиологични прояви по типа на ритъмни нарушения има и при двамата пациенти от второ поколение, при неговият брат. Офталмологични нарушения се отчитат и при тримата пациенти, като второто поколение са оперирани от двустранни катаракти, а в трето поколение се установяват белези за начална катаракта тип иридецентен прах. При майката и дъщерята се установява наличие на експанзия, а при братът 600 СТГ. Може да се предполага нарастване на повторите, което наред с клиничната прогресията предполага наличие на механизми на антиципация.



**Семейство № 11:** Клинико-генетични данни за засегнати три поколения. Генетично верифицирани са трима члена от трите поколения. Индексната пациентка е жена на 62г., с дъщеря на 37г. и нейната дъщеря на 15г. Има анамнестични данни за племенница на индексната пациентка (дъщеря на нейната сестра) с генетично потвърдено МД1 заболяване. Начални оплаквания при индексната пациентка, като слабост и миотония в ръцете дистално, са от 30 годишна възраст. Във второ и трето поколение началото е съответно на 16г. и на 5 г., като проявите се изразявали в миотония в ръцете дистално. В момента на изследването при индексната пациентка има мускулна слабост и хипотрофии в четирите крайника, предимно дистално, с перонеална и тибиялна пареза, походката е затруднена, но е възможно придвижването без помощно средство, затруднено изкачването по стълби и степента на инвалидност по скалата на Walton е 3т. Във второто поколение фенотипната характеристика степента на инвалидност е идентична с тази на майката. В трето поколение слабост и хипотрофии се отбелязват в дистално в горни крайници, само слабост в долни дистално, с промяна в походката, като се определя по скалата на Walton с 3т. Данни за кардиологични нарушения има при индексната пациентка от първо поколение, по типа на нарушена ЛК релаксация, във второто поколение са ритъмно-проводни промени, както и увреден клапен апарат. Офталмологични нарушения се отчитат и в трите поколения, с данни в първо и второ за операции по повод двустранни катаракти, а в трето поколение се откриват типичните за МД1 лещени промени. От генетичното изследване се установява нарастване на броя на повторите, от 250 СТG в първото поколение, съответно 800 СТG във второто, до >800 СТG в третото поколение. Тези и клиничните

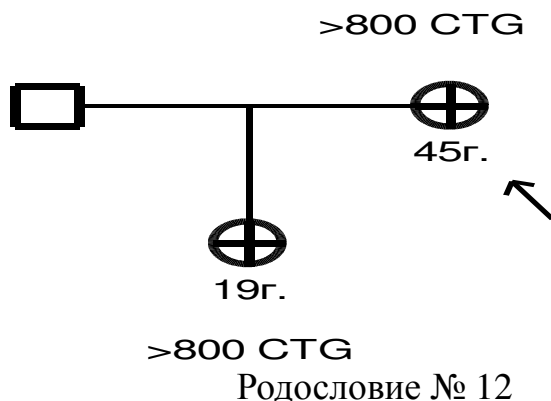
данни предполагат наличие на механизми на антиципация.



Родословие № 11

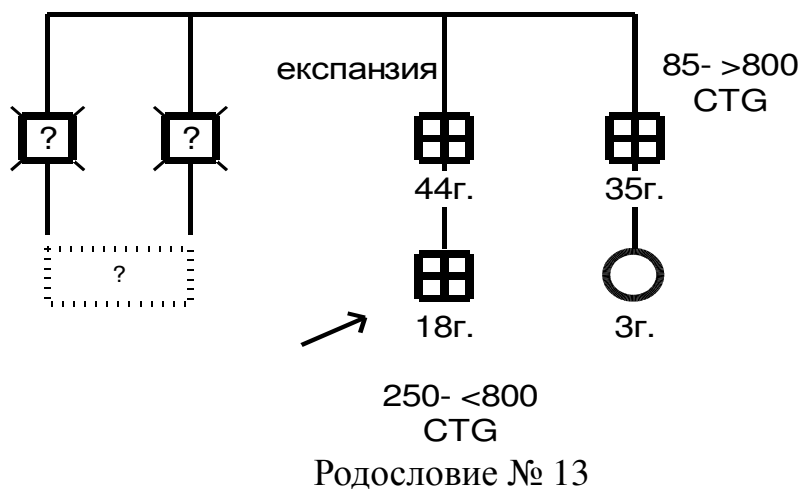
**Семейство № 12:** Клинико-генетични данни за засегнати две поколения. Генетично верифицирани са двама члена от първо и второ поколения, майка и дъщеря. Индексен пациент е жена на 45г. Начало на оплакванията от слабост в долни крайници и миотония в горни крайници, дистално датират при майката от 20 годишна възраст, а при дъщерята от 9 годишна възраст. В момента на изследването и при двете пациентки се наблюдава: слабост и хипотрофии в четирите крайника повече за долни и по-изразено в дисталните отдели, с тибиална и перонеална пареза, слабост на лицеви мускули. При пациентката от второ поколение се наблюдава по-застъпено ангажиране на проксимални, аксиални (с лумбална хиперлордоза) и дъвкателни мускули. Индексната пациентка е със затруднена походка и изкачване на стълби, със степен на инвалидност по скалата на Walton 3т., а нейната дъщеря – 2т. От невроофтальмологичните изследвания и в двете поколения се установяват: манифестна инсуфициенция на очните орбикуларни

мускули, с изявен лагофталм, както и типичните за МД1 катаракти. Генетичното изследване установява наличие на експанзия с >800 CTG повтори и при двете пациентки.



**Семейство № 13:** Клинико-генетични данни за засегнати две поколения. Генетично верифицирани са трима члена от двете поколения. Индексен пациент е мъж на 18г., с баща на 44г., и неговият брат на 35г. Има анамнестични данни за двама чичовци тежко инвалидизирани и починали от пневмония, братовчеди по бащина линия със затруднена походка. Начални оплаквания при бащата на индексният пациент са от 20 годишна възраст и се изразявали в миотония и слабост в ръцете, при неговият брат същите симптоми са с начало 30 годишна възраст. Пациентът от второ поколение с данни за вродена форма на МД1, с изоставяне в моторното и психическото развитие. В момента на изследването при него е налице мускулна слабост и хипотрофии в четирите крайника, предимно дистално, затруднена е походката и изкачването по стълби, степента на инвалидност по скалата на Walton е 3т. От проведеното невропсихологическо изследване при пациента се отчита умствено изоставяне с IQ=55. Бащата на индексния пациент е на инвалидна

количка, като е загубил способността за самостоятелна походка на 35г., по скалата на Walton- 7 точки. При чичото на индексния пациент в момента на изследването е с мускулна слабост проксимално и дистално, с хипотрофии в четирите крайника, предимно дистално, затруднена е походката и изкачването по стълби, степента на инвалидност по скалата на Walton е 3т. Кардиологични изследвания проведени на пациентите от първо и второ поколение (с изключение на бащата на индексния пациент) са за увреден клапен апарат, при тези пациенти се наблюдават и катаракти типични за МД1. От генетичното изследване се установява експанзия и 85- >800 CTG (мозаицизъм) повтори съответно при бащата и чичото на индексния пациент, докато при него самият повторите са 250-<800 CTG. Поради липсата на точно определяне на броя повтори при бащата, само клиничните данни предполагат наличие на механизми на антиципация.



**Семейство № 14:** Генетични данни за засегнати две поколения, с верифицирани са двама члена от първо и второ поколения, майка и

син. Индексен пациент е мъж на 48г. с начало на оплакванията от слабост в четирите крайника и миотония в ръцете, дистално датиращи от 40г. възраст. В момента на изследването при пациента от второ поколение се наблюдават генерализирана мускулна слабост и хипотрофии в четирите крайника, аксиални и лицеви мускули, с перонеална и тиббиална пареза, невъзможно придвижване без помощно средство, степен на инвалидност по скалата на Walton – 6т. Майката на индексния пациент е без субективни оплаквания и обективни данни от клиничния преглед. Кардиологичните нарушения се откриват при индексния пациент под формата на ЛК хипертрофия, митрална и трикуспидална регургитация, при запазена ЛК функция, ФИ-68. Във второ поколение се отбелязват и данни за специфични за МД1 невроофтальмологични белега: катаракта, птоза и хипофункция на екстраокуларните мускули. От генетичното изследване се установява нарастване на броя на повторите, от 130 СТG в първото поколение при асимптомната майка, съответно до 500 СТG във второто, при пациентът с фенотипна изява на МД1.

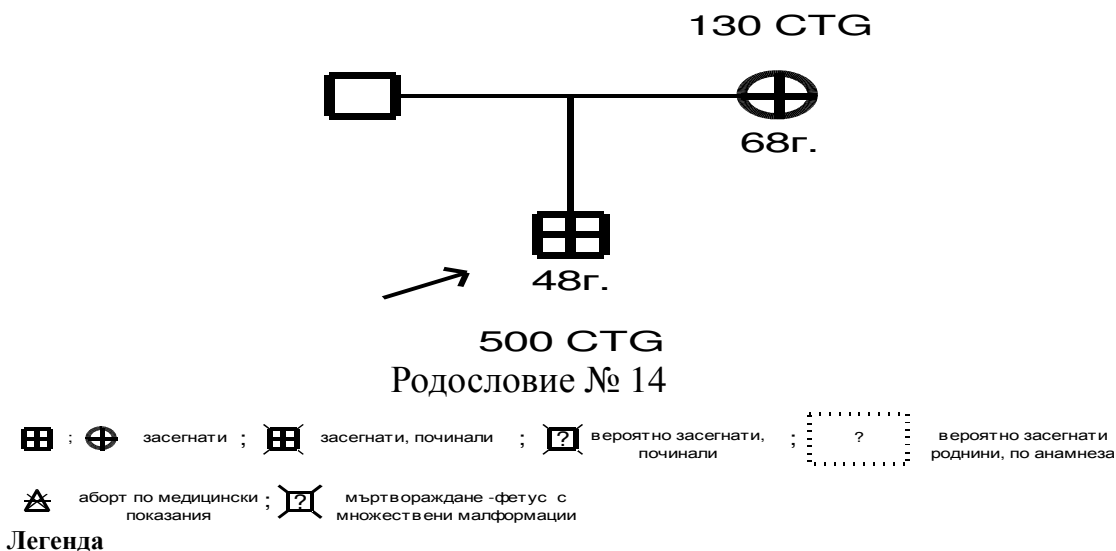


Таблица № 18 Фамилни фенотип - генотип характеристики, антиципация

| СЕМЕЙСТВО / ПАЦИЕНТ | ПОЛ | НАЧАЛО     | ПЕРИОД | ТЕЖЕСТВО / ИНВАЛИДНОСТ | КАРДИОЛОГИЧНИ | КАТАРАКТА | СТГ / ЕКСПАНЗИЯ | АНТИЦИПАЦИЯ |
|---------------------|-----|------------|--------|------------------------|---------------|-----------|-----------------|-------------|
| 1-1                 | М.  | 52г.       | 3г.    | 6                      | +             | +         | 300             | +           |
| 1-2                 | М.  | 16г.       | 8г.    | 2                      | +             | +         | 700             |             |
| 1-3                 | М.  | 17г.       | 5г.    | 2                      | +             | +         | 700             |             |
| 2-1                 | Ж.  | 13г.       | 24г.   | 3                      | +             | -         | >1000           | +           |
| 2-2                 | М.  | 16г.       | 28г.   | 3                      |               |           | E+              |             |
| 2-3                 | М.  | Вродена    | 15г.   | 2                      | -             | -         | 1500            | +           |
| 3-1                 | Ж.  | 25г.       | 33г.   | 3                      | +             | -         | 200             | +           |
| 3-2                 | М.  | 15г.       | 35г.   | 2                      | -             | +         | E+              |             |
| 3-3                 | М.  | Вродена    | 35г.   | 6                      | +             | -         | 1000            |             |
| 4-1                 | М.  | Асимптомен | -      | -                      | -             | -         | 50              | +           |
| 4-2                 | Ж.  | 27г.       | 9г.    | 2                      | +             | +         | >200            |             |
| 5-1                 | Ж.  | 58г.       | 6г.    | 6                      | +             | -         | E+              | +           |
| 5-2                 | Ж.  | 30г.       | 8г.    | 3                      | +             | +         | 900             |             |
| 6-1                 | Ж.  | 43г.       | 16г.   | 4                      | +             | +         | 100-300         | +           |
| 6-2                 | Ж.  | 15г.       | 24г.   | 2                      | +             | +         | 450             |             |
| 6-3                 | Ж.  | 25г.       | 13г.   | 2                      | +             | +         | 100->400        |             |
| 6-4                 | М.  | 16г.       | 2г.    | 2                      | -             | -         | 100->800        |             |
| 6-5                 | М.  | 7г.        | 1г.    | 0                      | -             | -         | 100->800        |             |
| 7-1                 | Ж.  | 40г.       | 24г.   | 7                      | +             | -         | 200             | +           |
| 7-2                 | Ж.  | 10г.       | 29г.   | 5                      | +             | +         | 1000            |             |
| 7-3                 | Ж.  | 29г.       | 5г.    | 5                      | +             | +         | 1200            |             |
| 8-1                 | М.  | 50г.       | 10г.   | 6                      | +             | +         | 300             | +           |
| 8-2                 | Ж.  | 21г.       | 18г.   | 4                      | +             | +         | 600             |             |
| 9-1                 | Ж.  | 30г.       | 8г.    | 6                      | +             | +         | 350             | +           |
| 9-2                 | Ж.  | 15г.       | 1г.    | 4                      | +             | +         | 700             |             |
| 10-1                | Ж.  | 26г.       | 16г.   | 3                      | +             | +         | E+              | +           |
| 10-2                | М.  | 21г.       | 29г.   | 6                      | +             | +         | 600             |             |
| 10-3                | Ж.  | 8г.        | 5г.    | 2                      | -             | +         | E+              |             |
| 11-1                | Ж.  | 30г.       | 32г.   | 3                      | +             | +         | 250             | +           |
| 11-2                | Ж.  | 16г.       | 21г.   | 3                      | +             | +         | 800             |             |
| 11-3                | Ж.  | 5г.        | 10г.   | 3                      | -             | +         | >800            |             |
| 12-1                | Ж.  | 20г.       | 25г.   | 3                      | -             | +         | >800            | +           |
| 12-2                | Ж.  | 9г.        | 10г.   | 2                      | -             | +         | >800            |             |
| 13-1                | М.  | 20г.       | 22г.   | 7                      |               |           | E+              | +           |
| 13-2                | М.  | 30г.       | 5г.    | 3                      | +             | +         | 85->800         |             |
| 13-3                | М.  | Вродена    | 18г.   | 3                      | +             | +         | 250-<800        |             |
| 14-1                | Ж.  | Асимптомна |        |                        |               |           | 130             | +           |
| 14-2                | М.  | 40г.       | 8г.    | 6                      | +             | +         | 500             |             |

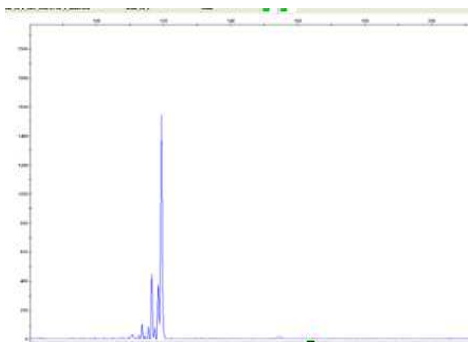
**Таблица №.19 Генетично диагностицирани пациенти с МД тип 1 и тип 2**

| № | Генетично потвърдена диагноза МД | БРОЙ ПАЦИЕНТИ<br>(n=84) | %  |
|---|----------------------------------|-------------------------|----|
| 1 | Генетично диференциран МД тип 1  | 79                      | 94 |
| 2 | Генетично диференциран МД тип 2  | 5                       | 6  |

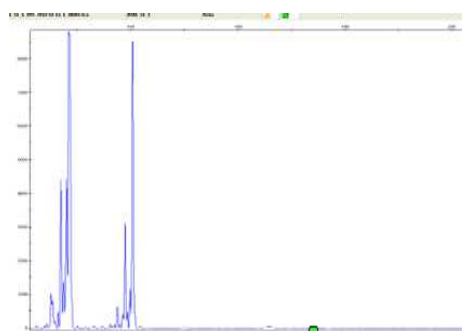
Бяха използвани следните молекулярно–генетични методи: Short PCR; TP-PCR; PCR/Southern blot за идентифициране на МД1 и PCR, Long range; PCR/Southern blot за МД2. При 56 от установените с МД1 пациенти е приложен PCR/Southern blot метод за определяне броя на CTG повторите в експандирания алел, а при останалите пациенти е използван методът TP-PCR /Triplet Repeat Primed PCR/ за доказване на мутацията в DMPK гена чрез установяване на експандирал алел, без точно определяне размера на експанзията. При тези пациенти първоначално, като метод за отхвърляне на диагнозата МД1, се използва PCR – анализ. Немутантните алели могат да бъдат открити и охарактеризирани, като се използват синтетични флуоресцентно белязани праймери, фланкиращи региона с CTG – повторите в DMPK гена. След това се анализира дължината на амплифицираните продукти на автоматичен секвенатор спрямо стандарт LIZ чрез капилярна електрофореза. За установяване дължината на нормалните алели беше използвана контрола с известна дължина на алелите. След анализиране на резултатите стана ясно, че най-честият, немутантен алел е с 5 ( CTG ) повтора, отбелязан при над половината от изследваните, като от друга страна най-тежкия, нормален алел е с 39 (CTG ) повтора.

**Фигура 2: Електрофореграма на PCR продукт за амплифициране на CTG повторената област от DMPK гена: а) хомозигот; б) хетерозигот;**

**а)**

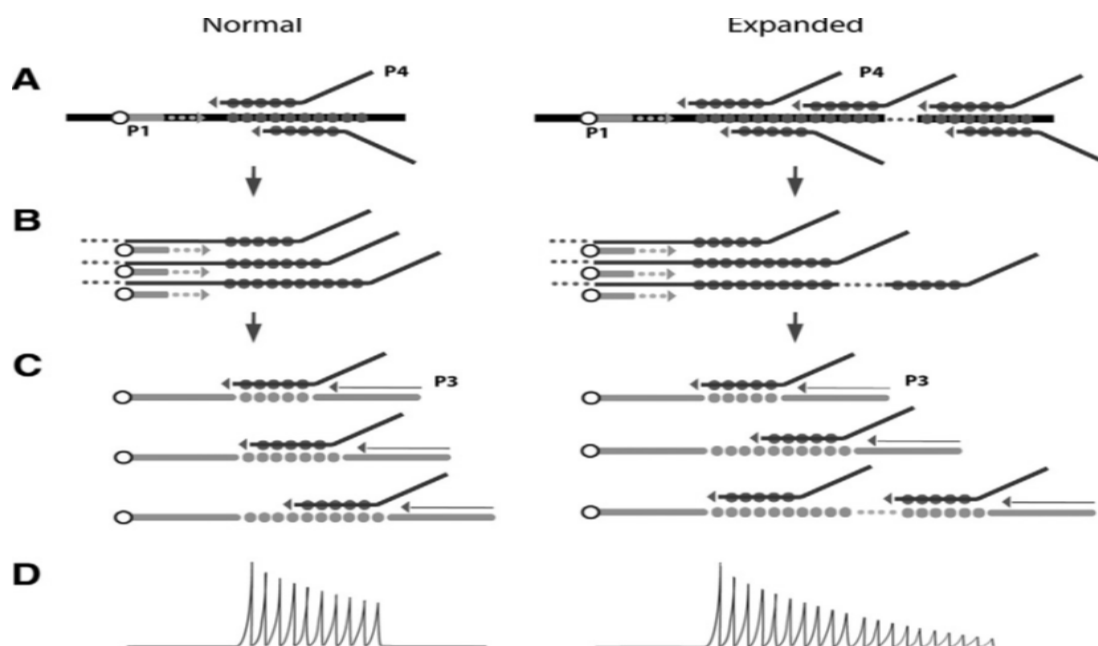


**б)**



Пациентите с отхвърлена чрез PCR анализ диагноза, са хетерозиготи или хомозиготи с два нормални алела. Останалите 23 пациента са с неотхвърлена МД1 диагноза - те са хетерозиготи с един нормален и един мутантен алел. При тях се продължава изследването чрез Triplet Repeat Primed PCR (TP – PCR). TP-PCR методът позволява бързото идентифициране на мутантен повтор, който не може да се амплифицира чрез фланкиращи праймери. Принципът на тази техника разчита на използването на локус - специфични праймери в комбинация с химерен праймер-опашка, който е комплементарен на повторения регион и хибридизира върху него. След PCR реакцията продуктите са с различен размер, в зависимост от броя на повторите. Получените фрагменти се оценяват по големина на автоматичен секвенатор спрямо стандарт LIZ чрез капилярна електрофореза. Ако възникне експанзия, т.е. характерен профил с три/четири бази периодичност. Височината на пика намалява постепенно с увеличаване размера на продукта. Тези експанзии се разглеждат като доказателство за експресията на мутантен алел. Принципът на TP-PCR е представен на фигура 3, A-D.

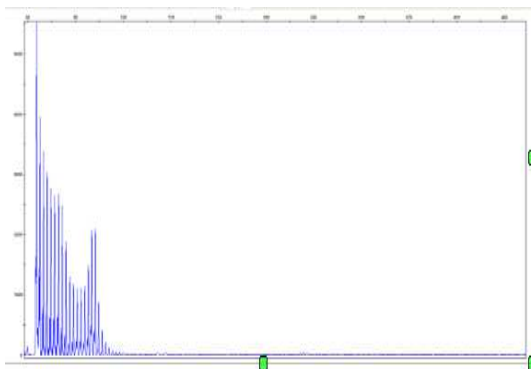
Фигура № 3



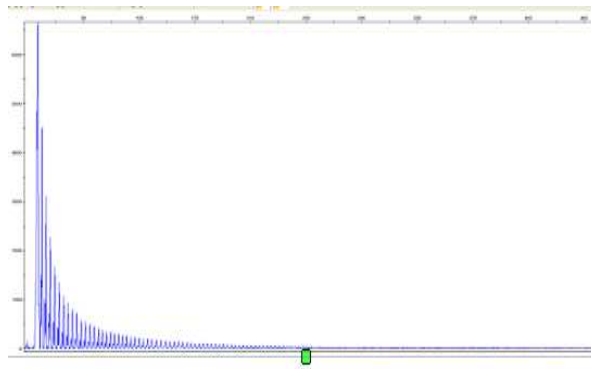
Този метод не измерва размера на експанзиите, но надежно идентифицира тяхното присъствие. TP - PCR може да се използва с локус- специфични праймери и за други заболявания с подобни мутационни механизми. Двадесет и трима от МД1 пациентите са изследвани чрез този метод. TP-PCR ампликоните на засегнати от заболяването, анализирани с фрагментен анализ, показват експанзии - характерен профил с три бази периодичност. Височината на пика намалява постепенно с увеличаване размера на продукта. Тези експанзии се разглеждат като доказателство за експресията на мутантен алел. На фигура № 4 са показани електрофореграми на фрагментен анализ на TP-PCR- продукти на пациент без експанзия (а) и пациент с експанзия (б,в). В първият случай(а) са налице два нормални алела (13 и 21 СТG – повтора), докато във втория (б) се наблюдава само един нормален алел с 5 СТG - повтора и един алел с увеличени (> 50) повтора; в третия резултат(в) има един нормален алел с 12 СТG - повтора и налична експанзия.

**Фиг.№ 4** Электрофореграми на TP-PCR продукти, амплифицирани CTG-повторенията в DMPK гена.

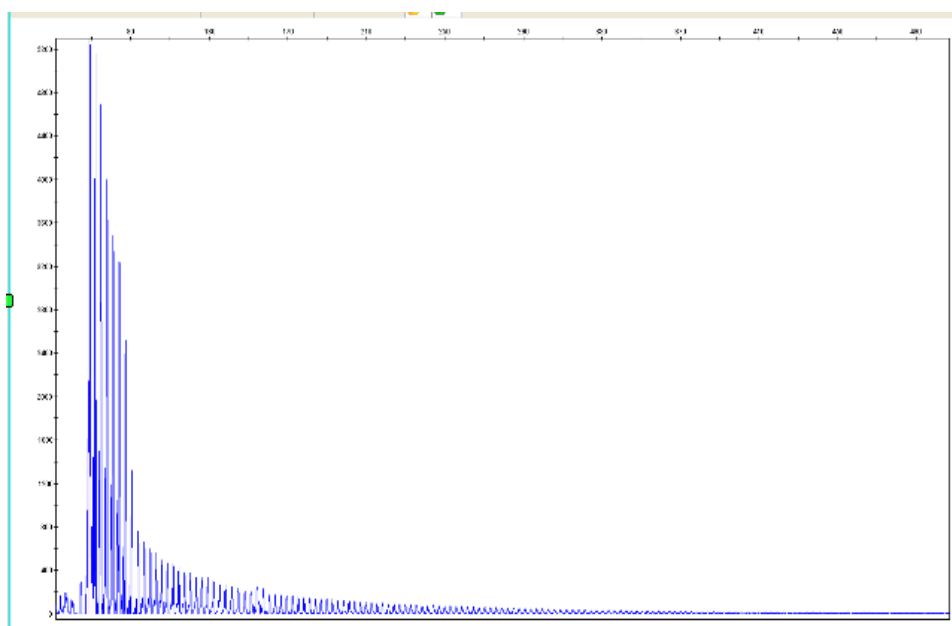
а)



б)



в)



Обхватът от CTG повторения варира от 50 до 1500. С 50 до 150 CTG повтори са четирима пациенти; с над 150 до 1000 – са 45; с над 1000 – са 7. При изследваните от нас пациенти средният размер на CTG повторите е около 636 CTG. С цел сравнителен анализ между проява и тежест на клиничната картина, от една страна и размера на експанзията, от друга, 56 пациента с МД1, са разделени условно на

две групи: 33 с брой на CTG повторите >400 и 23 с брой на CTG повторите  $\leq$ 400. В три от останалите седем семейства са изследвани членове, които са сиблинги и не е възможно установяването на антиципация. В другите четири фамилии, са изследвани с TP-PCR метод, който определя наличието на експанзия, без точен брой повтори.

Изследваните 14 семейства са с установена антиципация както на базата на нарастване на броя на повторите така и на съответните клинични данни за по-ранно и по-тежко засягане на следващите поколения. В един от случаите размерът на експанзията не се променя, но фенотипната изява е с характеристиката на антиципация в клинично отношение. При 4 семейства е използвана методика (TP-PCR), определяща наличието на експанзия, без точният размер на повтори, но отново, имайки предвид клиничната изява, са налице данни за антиципация. По анамнестични данни на останалите 27 пациента, разгледани извън техните фамилии, в 7 от случаите има доказателства, като по-ранна и тежка изява на симптомите, които предполагат наличието на механизми на антиципация. От 25 семейства, 90% (n=9) от случаите, в които заболяването си унаследява чрез майката, са с данни за антиципация. При тези с унаследяване по бащина линия, в 86.7% (n=13) са и с данни за антиципация. Корелационна зависимост между линията на унаследяването (майчина или бащина) с феномена на антиципация не се открива ( $p=0.654$ ). Разгледан е средният размер на повторите при майки на пациенти както на пациенти с вродена форма, така и на тези пациенти с начало в ранна детска възраст (1-5г.), които е  $\sim$ 700 CTG и е съответно по-голям от този на майки, чието поколение е с

начало на заболяването в юношеска и зряла възраст, среден размер ~360 СТГ повтори.

**Таблица № 20 Зависимост между антиципацията и линия на унаследяване**

| Антиципация |      | Линия на унаследяване |         | Общо | p     |
|-------------|------|-----------------------|---------|------|-------|
|             |      | от майка              | от баща |      |       |
| няма        | Брой | 1                     | 2       | 3    | 0,654 |
|             | %    | 10,0                  | 13,3    | 12,0 |       |
| има         | Брой | 9                     | 13      | 22   |       |
|             | %    | 90,0                  | 86,7    | 88,0 |       |
| Общо        | Брой | 10                    | 15      | 25   |       |
|             | %    | 100                   | 100     | 100  |       |

**Графика № 13 Относителен дял на пациентите по линия на унаследяване и антиципация.**



От разгледаната връзка между броят на повторите и линията на унаследяване, се вижда в 87% от случаите пациентите с унаследяване на заболяването по майчина линия са с установени повтори над 400, а тези които са по бащина линия в 63.2% са с >400 повтора. Не се открива статистически значима корелация между тези показатели ( $p=0.075$ ).

**Таблица № 21 Зависимост на броя СТГ повтори от линия на унаследяване**

| СТГ повтори |      | Линия на унаследяване |      | Общо | p     |
|-------------|------|-----------------------|------|------|-------|
|             |      | майка                 | баща |      |       |
| ≤400        | Брой | 3                     | 7    | 10   | 0,075 |
|             | %    | 13,0                  | 36,8 | 23,8 |       |
| >400        | Брой | 20                    | 12   | 32   |       |
|             | %    | 87,0                  | 63,2 | 76,2 |       |
| Общо        | Брой | 23                    | 19   | 42   |       |
|             | %    | 100                   | 100  | 100  |       |

**Графика № 14 Относителен дял на пациентите по линия на унаследяване и СТГ повтори.**

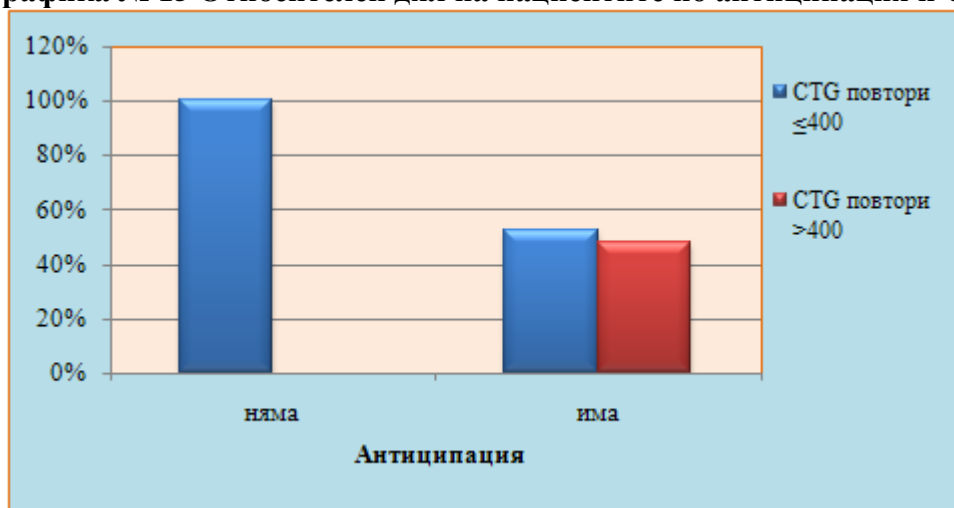


Опит за установяване на подобна зависимост, е направен по отношение на пациентите с диагностициран брой на повторите и наличието на антиципация. Пациентите са разделени на две групи, съответно с по-малък или равен на 400 СТГ брой повтори и с по-голям от 400 СТГ. При 52,2 % от пациентите с по-малък размер на повторите се установява наличие на антиципация, в сравнение с 47.8% от пациентите с по-голяма дължина на повторите. В двете групи не се открива зависимост с антиципацията ( $p=0.063$ ).

**Таблица № 22 Зависимост на антиципация от броя СТГ повтори**

| СТГ повтори |      | Антиципация |      | Общо | p     |
|-------------|------|-------------|------|------|-------|
|             |      | няма        | има  |      |       |
| ≤400        | Брой | 5           | 12   | 17   | 0,063 |
|             | %    | 100,0       | 52,2 | 60,7 |       |
| >400        | Брой | 0           | 11   | 11   |       |
|             | %    | 0,0         | 47,8 | 39,3 |       |
| Общо        | Брой | 5           | 23   | 28   |       |
|             | %    | 100         | 100  | 100  |       |

**Графика № 15 Относителен дял на пациентите по антиципация и СТГ повтори.**



Когато обаче се сравняват броят СТГ повторения и възрастта на начало на заболяването се отчита, че при 69,7% от пациентите с проява на първите симптоми във възраст под 30г. са с установени от генетичното изследване брой повтори над 400 СТГ. В групата пациенти с изява на симптомите над 30г. се отчитат в по-голям процент от тях под 400 СТГ. Намерена е и статистическа зависимост между възрастта на начало и броят повтори в експандирания алел ( $p=0,032$ ).

**Таблица № 22 Зависимост между възраст на начало и брой СТГ**

| СТГ повтори |      | Начало на заболяването |        | Общо | p     |
|-------------|------|------------------------|--------|------|-------|
|             |      | ≤30 г.                 | >30 г. |      |       |
| ≤ 400       | Брой | 10                     | 11     | 21   | 0,032 |
|             | %    | 30,3                   | 61,1   | 41,2 |       |
| > 400       | Брой | 23                     | 7      | 30   |       |
|             | %    | 69,7                   | 38,9   | 58,8 |       |
| Общо        | Брой | 33                     | 18     | 51   |       |
|             | %    | 100                    | 100    | 100  |       |

**Графика № 16 Относителен дял на пациентите по начало на заболяването и СТГ повторения**



Изследваме връзката на засягане на мускулната система и размера на експанзията. Пациентите разделени според големината на експанзията, се диференцират и спрямо локализация и степен на мускулната слабост. Оценени с ММТ, мускулни групи с изразена слабост са тези с по-малко от 3 точки. В двете основни групи пациентите са обособени предвид характеристиката на МД1, с първоначално засягане на дисталните и с прогресивно ангажиране на проксималните мускули. От групата с под 400 СТГ, 60% са с по-изразена слабост дистално (>3/<3), а при тези с над 400 СТГ процентът е 48.4%. Относителният дял на пациентите с оценка под 3

т. в дистални и проксимални мускули е почти еквивалентен в групите с под (25%) и над (29%) 400 СТГ повтори. Не се установява и статистически значима разлика между изследваните показатели в отделните групи ( $p=0.759$ ;  $p=0.601$ ;  $p=0.993$ ).

**Таблица №.23** Зависимост на мускулната слабост от броя на СТГ

| Мускулна слабост<br>(проксимално/дистално) |      | СТГ повтори |       | Общо  | p     |
|--|------|-------------|-------|-------|-------|
|  |      | ≤400        | >400  |       |       |
| >3/>3                                      | Брой | 3           | 7     | 10    | 0,759 |
|  | %    | 15,0        | 22,6  | 19,6  |       |
| >3/<3                                      | Брой | 12          | 15    | 27    | 0,601 |
|  | %    | 60,0        | 48,4  | 52,9  |       |
| <3/<3                                      | Брой | 5           | 9     | 14    | 0,993 |
|  | %    | 25,0        | 29,0  | 27,5  |       |
| Общо                                       | Брой | 20          | 31    | 51    |       |
|  | %    | 100,0       | 100,0 | 100,0 |       |

**Графика № 17** Относителен дял на пациентите по мускулна слабост и СТГ повторения.



От клиничните показатели на изследваните МД1 пациенти ( $n=56$ ), с определен размер на експанзията, се потърси зависимост между броят на СТГ повторите и съответно промените в стойностите на

КФК, ГГТ, ИгГ, потърси се и корелация с понижените стойности на ФВК и ФЕО1 < 75%, както и някои от промените в сърдечния статус, като ритъмно-проводните нарушения. В процентно отношение над половината (56.5%) от пациентите с установени повишени стойности на креатинфосфокиназа (КФК, СРК), съответно за мъже над 200, а за жени над 180 СРК, са с по-голям размер на експанзията (>400 СТГ). В групата на пациентите с нормални стойности на КФК в 70.8% от случаите също се касае за пациенти с над 400 СТГ. Не се установява корелация между броят на повторите (СТГ) при МД1 и повишените стойности на мускулният ензим ( $p=0,307$ ).

**Таблица №.24 Разпределение на пациентите по ниво на креатинфосфокиназа и брой СТГ.**

| СТГ  |      | КФК                |                                | Общо | p     |
|------|------|--------------------|--------------------------------|------|-------|
|      |      | Референтни граници | Повишен (>180-жени, >200-мъже) |      |       |
| ≤400 | Брой | 7                  | 10                             | 17   | 0,307 |
|      | %    | 29,2               | 43,5                           | 36,2 |       |
| >400 | Брой | 17                 | 13                             | 30   |       |
|      | %    | 70,8               | 56,5                           | 63,8 |       |
| Общо | Брой | 24                 | 23                             | 47   |       |
|      | %    | 100                | 100                            | 100  |       |

**Графика № 18 Относителен дял на пациентите по ниво на креатинфосфокиназа и СТГ**



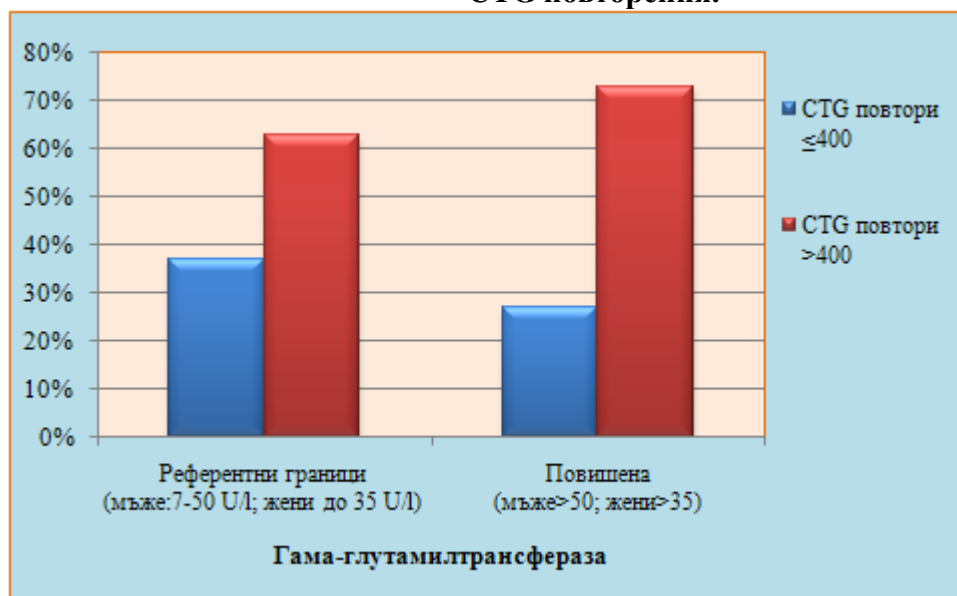
повторения

Връзката между размера на експанзията и повишените стойности на чернодробният ензим гамалтутамилтрансфераза (ГГТ) е представена на таблица №. 25. В резултатите, на общо изследваните 45 пациента както за брой повтори така и за ГГТ, не се установява съществена процентна разлика между групата с над 400 (73%) и тази с под 400 повтора (63%) по отношение на абнормните стойности на ГГТ. Не се установи статистически значима зависимост между съответните показатели ( $p=0.502$ ).

**Таблица № 25 Ниво на гама-глутамилтрансфераза и брой CTG повтори.**

| CTG  |      | ГГТ   |                                  | Общо | p     |
|------|------|---|----------------------------------|------|-------|
|      |      | Референтни граници<br>(мъже:7-50 U/l<br>жени до 35 U/l) | Повишена<br>(мъже>50<br>жени>35) |      |       |
| ≤400 | Брой | 11  | 4                                | 15   | 0,502 |
|      | %    | 37  | 27                               | 33   |       |
| >400 | Брой | 19  | 11                               | 30   |       |
|      | %    | 63  | 73                               | 67   |       |
| Общо | Брой | 30  | 15                               | 45   |       |
|      | %    | 100   | 100                              | 100  |       |

**Графика № 19 Относителен дял на пациентите по ниво на гама-глутамилтрансфераза и CTG повторения.**

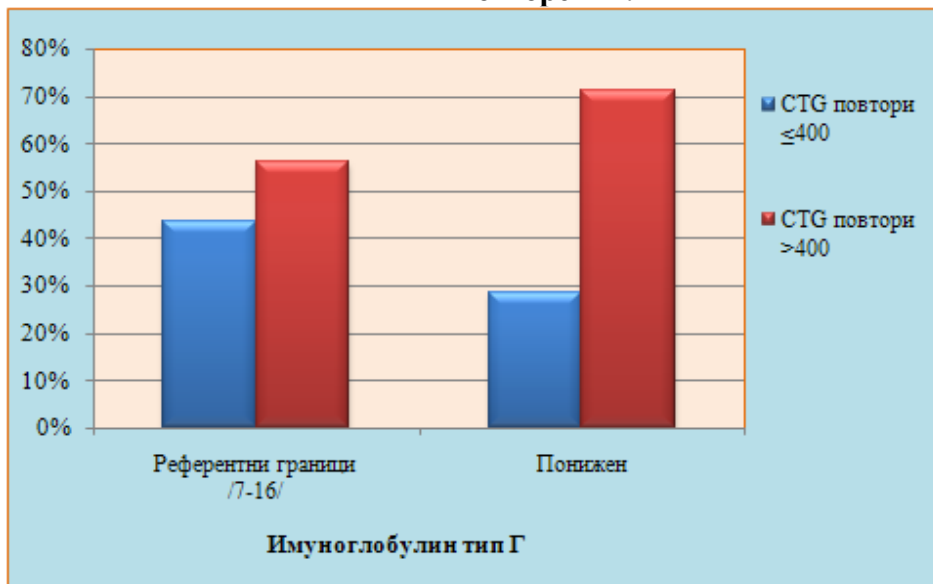


Серумните нива на имуноглобулините са изследвани при 29 от МД1 пациентите, които са с определен брой СТГ повтори. При 14 от тях се отчитат стойности на ИгГ под референтните граници, при запазени стойности на ИгА, ИгМ и нормална електрофореза. От таблица № 26 се вижда, че процентния дял на пациенти с понижени стойности на ИгГ и размер на експанзията над 400 повтора е по-голям (71,4%) от този на пациентите с понижени стойности на ИгГ и СТГ под 400 (28,6%). Не се установява обаче статистически значима разлика между съответните групи ( $p=0,389$ ).

**Таблица № 26 Ниво на имуноглобулин тип Г и брой СТГ повтори**

| СТГ  |      | ИгГ                       |                   | Общо | P     |
|------|------|---------------------------|-------------------|------|-------|
|      |      | Референтни граници (7-16) | Понижена стойност |      |       |
| ≤400 | Брой | 7                         | 4                 | 11   | 0.389 |
|      | %    | 43,8                      | 28,6              | 36,7 |       |
| >400 | Брой | 9                         | 10                | 19   |       |
|      | %    | 56,3                      | 71,4              | 63,3 |       |
| Общо | Брой | 16                        | 14                | 30   |       |
|      | %    | 100                       | 100               | 100  |       |

**Графика № 20 Относителен дял на пациентите по ниво на имуноглобулин тип Г и СТГ повторения.**



Потърсена е зависимост между броя повторения и проявите на вентилаторна слабост. От таблици № 27 и № 28 е видна липсата на статистически значима такава между понижените стойности на форсирания витален капацитет (ФВК) и броят на СТГ ( $p=0,849$ ), от една страна, и на форсираният експираторен обем (ФЕО1) и СТГ повторенията, от друга ( $p=0,461$ ).

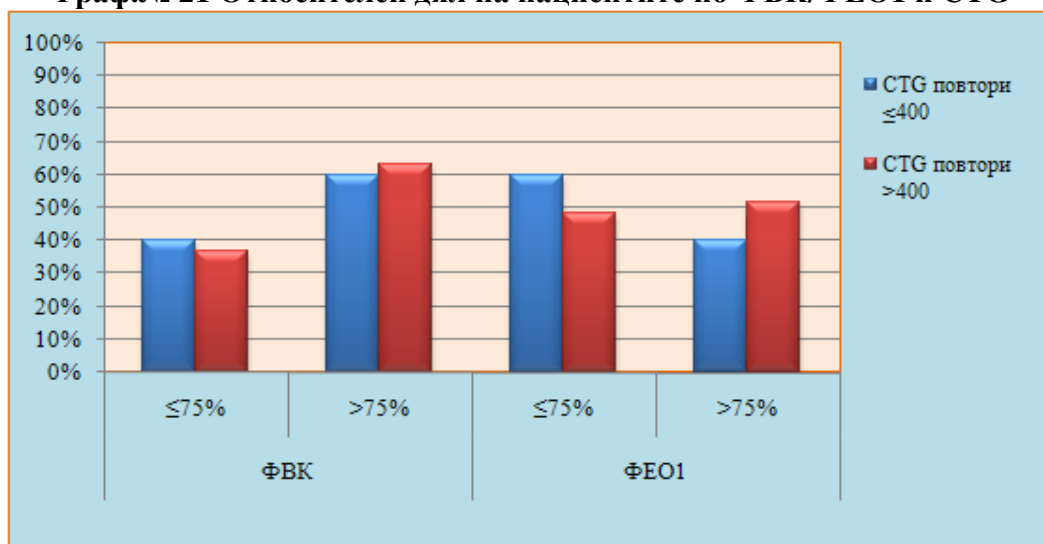
**Табл.№27 Зависимост на вентилаторната слабост(ФВК) от броя на СТГ**

| ФВК  |      | СТГ повтори |      | Общо | p     |
|------|------|-------------|------|------|-------|
|      |      | ≤400        | >400 |      |       |
| ≤75% | Брой | 6           | 10   | 16   | 0,849 |
|      | %    | 40,0        | 37,0 | 38,1 |       |
| >75% | Брой | 9           | 17   | 26   |       |
|      | %    | 60,0        | 63,0 | 61,9 |       |
| Общо | Брой | 15          | 27   | 42   |       |
|      | %    | 100         | 100  | 100  |       |

**Табл.№28 Зависимост на вентилаторната слабост (ФЕО1) от броя на СТГ**

| ФЕО1 |      | СТГ повтори |      | Общо | p     |
|------|------|-------------|------|------|-------|
|      |      | ≤400        | >400 |      |       |
| ≤75% | Брой | 9           | 13   | 22   | 0,461 |
|      | %    | 60,0        | 48,1 | 52,4 |       |
| >75% | Брой | 6           | 14   | 20   |       |
|      | %    | 40,0        | 51,9 | 47,6 |       |
| Общо | Брой | 15          | 27   | 42   |       |
|      | %    | 100         | 100  | 100  |       |

**Граф.№ 21 Относителен дял на пациентите по ФВК/ФЕО1 и СТГ**

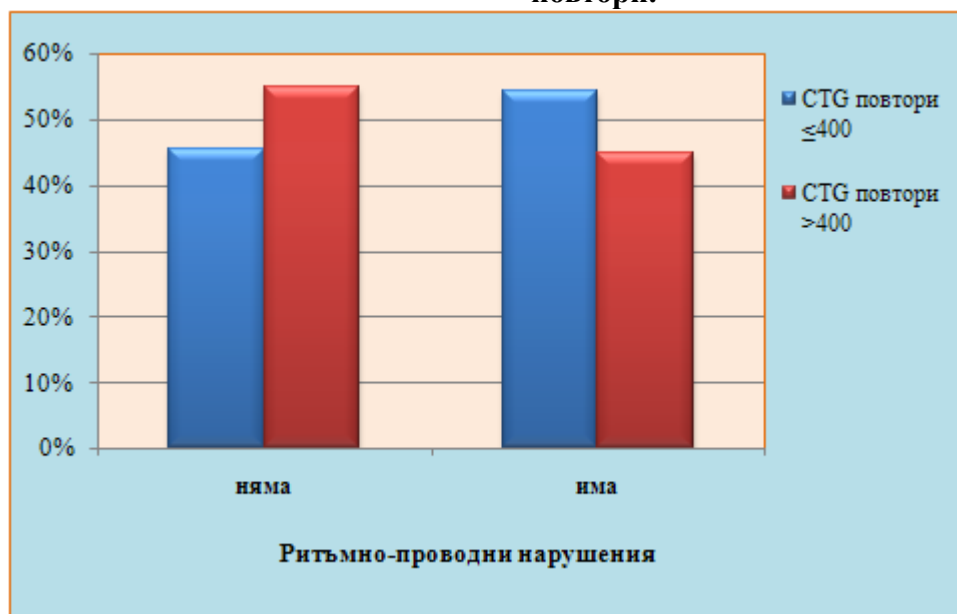


От 56 пациенти с установен брой СТГ, 31 са изследвани с Холтер ЕКГ и при 15 (48.4%) са установени ритъмно-проводни нарушения. Разликата в относителните им дялове в групите под и над 400 повторения е пренебрежима ниска, без данни за статистически значима разлика ( $p=0,611$ ).

**Таблица № 29** Зависимост на ритъмно-проводни кардиологични нарушения от броя на СТГ повторенията.

| Ритъмно-проводни нарушения |      | СТГ повтори |      | Общо | p     |
|----------------------------|------|-------------|------|------|-------|
|                            |      | ≤400        | >400 |      |       |
| няма                       | Брой | 5           | 11   | 16   | 0,611 |
|                            | %    | 45,5        | 55,0 | 51,6 |       |
| има                        | Брой | 6           | 9    | 15   |       |
|                            | %    | 54,5        | 45,0 | 48,4 |       |
| Общо                       | Брой | 11          | 20   | 31   |       |
|                            | %    | 100         | 100  | 100  |       |

**Графика № 22** Относителен дял на пациентите по ритъмно-проводни нарушения и СТГ повтори.



При 28% от пациентите се отчита от електроневрографските изследвания (ЕНГ) данни за аксонен тип на перифернонервна

увреда, засягаща предимно двигателни, но в част от случаите и сетивни влакна, в горни и долни крайници. Ние разглеждаме зависимостта между ЕМГ/ ЕНГ промените и размера на експанзията (таблица № 30). В групата с по-малък брой повтори относителният дял на пациентите с комбинация от миогенни и миотонични промени е по-малък, от този на групата пациенти с над 400 СТГ повтора (66%). Шейсет процента от пациентите с перифернонервно нарушение са с над 400 повтора, а останалите са с по-малък размер на експандирания алел.

**Таблица № 30 Зависимост на ЕМГ промените от броя СТГ повтори**

| СТГ повтори | Миотонични прояви (n=4) | %  | +Миогенни нарушения (n=32) | %  | +Перифернонервни (n=15) | %  |
|-------------|-------------------------|----|----------------------------|----|-------------------------|----|
| ≤400        | 3                       | 75 | 11                         | 34 | 6                       | 40 |
| >400        | 1                       | 25 | 21                         | 66 | 9                       | 60 |

Потърсена е корелационна зависимост между пациентите с данни от ЕНГ за перифернонервна увреда и броят на повторите в експандирания алел, но не се открива подобна връзка ( $p=0.809$ ). Таблица № 31 и графика № 23.

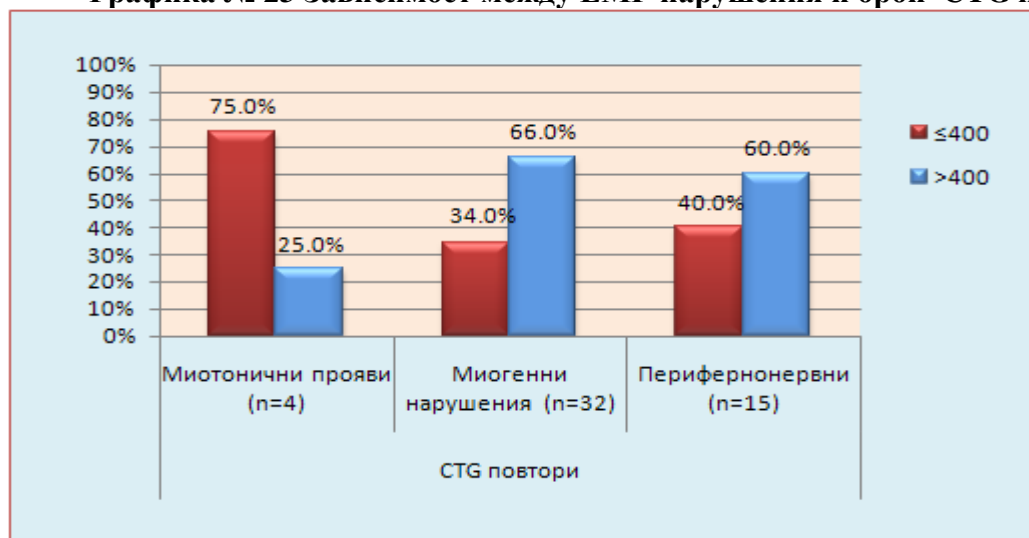
**Таблица № 31 Зависимост между перифернонервна увреда от броя СТГ.**

|                         |      | Брой СТГ |       | Общо  | p     |
|-------------------------|------|----------|-------|-------|-------|
|                         |      | ≤400     | >400  |       |       |
| Периферно-нервна увреда | +    | брой     | 6     | 9     | 0.809 |
|                         |      | %        | 30.0  | 29.0  |       |
| -                       | брой | 14       | 22    | 36    |       |
|                         |      | %        | 70.0  | 71.0  | 70.6  |
| Общо                    | брой | 20       | 31    | 51    |       |
|                         |      | %        | 100.0 | 100.0 | 100.0 |

На графика № 23 са видни процентните разлики, в групите с под и над 400 повтори, по отношение на различните отклонения в ЕМГ

записа. При пациентите с по-малък размер на експанзията в 75% от случаите проявите са миотонични феномени, в сравнение с тези с по-голям размер на повторите. Миогенните промени се отчитат при 34% от пациентите с под 400 повтори и в 66% от групата с над 400 повтори. По отношение на перифернонервната увреда разликата между двете групи е 20%, в полза на пациентите с по-голям брой повтори, но не се установява статистически значима разлика ( $p=0.809$ ).

**Графика № 23 Зависимост между ЕМГ нарушения и брой СТГ повтори**



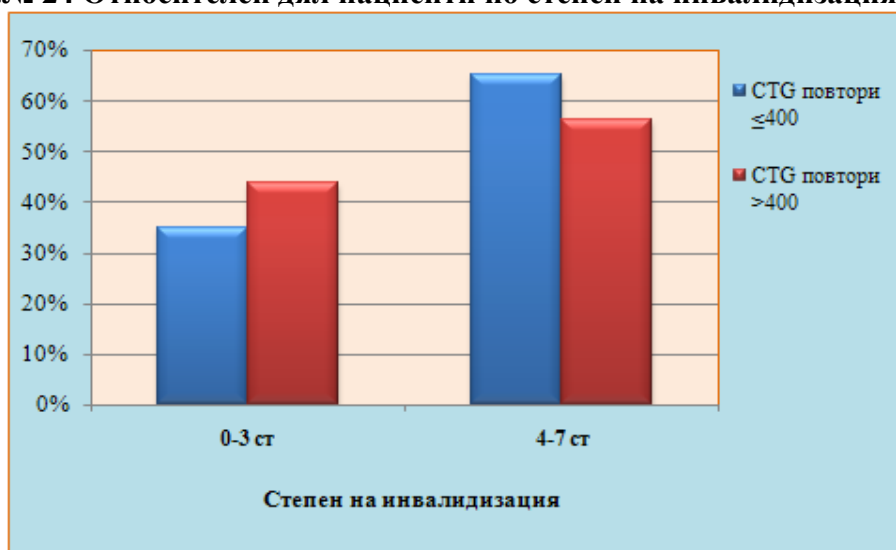
При оценяване на пациентите с десетстепенната скалата на Walton се отчитат както такива ( $n=2$ , 3%) със съхранена подвижност (0 ст.) така и пациенти ( $n=2$ , 3%) на инвалиден стол, но с възможно самообслужване с ръцете (7 ст.). Според тежестта на инвалидност са обособени две групи: по-леки прояви на нарушена подвижност, оценени на степени от 0 до 3 и с изразено затруднение в походката и движенията, на степен от 4 до 7. Разглеждат се броя на повторите в двете групи и се потърси връзка между степента на инвалидност и размера на експанзията (таблица № 32, графика № 24). Предвид

прогресивният характер на заболяването са взети предвид и разликите в продължителността на заболяването при двете групи. Пациентите с размер на експанзията под 400 СТГ повтора и степен на инвалидизация по скалата на Walton над 4 ст. са със средна продължителност на заболяването 14.1 г. (SD+/- 7.7). Групата с над 400 повтора и степен на инвалидност над 4 ст. са с средната продължителност на заболяването е 15.9 г.(SD +/- 9.4). Наблюдава се незначителна разлика в годините на средна продължителност (~1.8г.) между групите с над и под 400 СТГ и по-голяма степен на инвалидност, като тази разлика е в полза на групата с по-малък размер на повторите (таб. № 33, граф. № 25). Не се установяват и статистически значими връзки както между големината на експанзията и степента на инвалидизация ( $p=0.503$ ), така и между продължителността заболяването и размера на експанзията ( $p=0.516$ ;  $p=0.624$ ).

**Таблица №. 32 Степен на инвалидизация и брой СТГ повтори**

| Степен на инвалидизация |      | СТГ повтори |       | Общо  | p     |
|-------------------------|------|-------------|-------|-------|-------|
|                         |      | ≤400        | >400  |       |       |
| 0-3 ст                  | Брой | 8           | 14    | 22    | 0.503 |
|                         | %    | 34.8        | 43.8  | 40.0  |       |
| 4-7 ст                  | Брой | 15          | 18    | 33    |       |
|                         | %    | 65.2        | 56.3  | 60.0  |       |
| Общо                    | Брой | 23          | 32    | 55    |       |
|                         | %    | 100.0       | 100.0 | 100.0 |       |

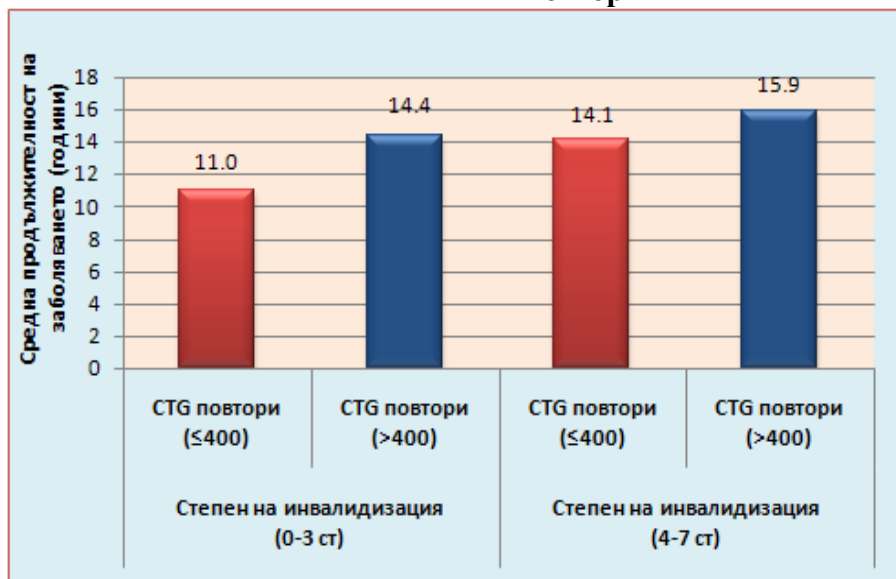
**Граф.№ 24 Относителен дял пациенти по степен на инвалидизация и СТГ**



**Таблица № 33 Средна продължителност на заболяването по степен на инвалидност и CTG повтори**

| Степен на инвалидност | CTG  | Продължителност на заболяването |      |      |     |     | p     |
|-----------------------|------|---------------------------------|------|------|-----|-----|-------|
|                       |      | N                               | Mean | SD   | Min | Max |       |
| 0-3 ст.               | ≤400 | 8                               | 11.0 | 11.2 | 0   | 33  | 0.516 |
|                       | >400 | 14                              | 14.4 | 12.6 | 1   | 36  |       |
| 4-7 ст.               | ≤400 | 15                              | 14.1 | 7.7  | 3   | 32  | 0.624 |
|                       | >400 | 18                              | 15.9 | 9.4  | 1   | 34  |       |

**Граф.№ 25 Средна продължителност на заболяването по степен на инвалидност и CTG повтори**

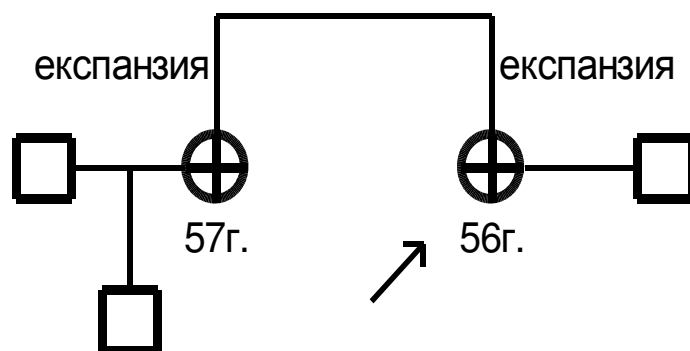


## 2. ГЕНЕТИЧНИ РЕЗУЛТАТИ ПРИ МД2

Общо генетично диагностицирани с МД2 са седем пациенти, от които тук се представят клиничните изяви при шест, двама мъже и четири жени. В три от случаите унаследяването е по майчина линия, а в един по бащина. Две от пациентките са сиблинги, при които липсват сигурни анамнестични данни за засягане при родителите. Един от сиблингите е асимптомен в момента на изследването. В хода на генетичните изследвания се отхвърля експанзия в DMPK гена при един от пациентите и в следствие при него се доказва експанзия в CNBP (ZNF9) генът, отговорен за PROMM. С цел търсене на антиципация, по-долу е анализирано засягането от заболяването в поколенията на няколко фамилии с МД2:

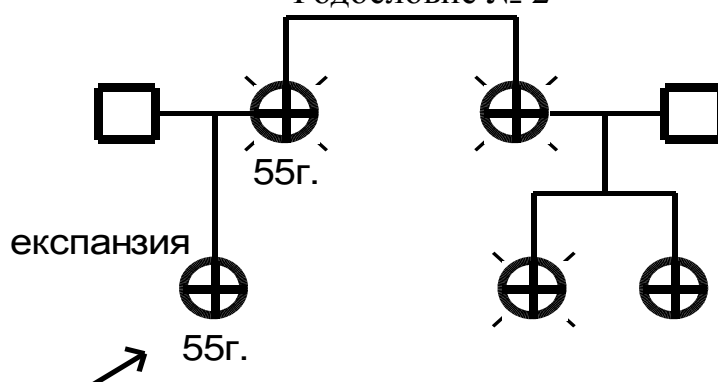
**Семейство №1:** Клинико-генетични данни за засегнато едно поколение. Генетично изследвани са трима от членовете на две поколения. Експанзия се установява при двете сестри от първо поколение и два нормални алела във второ поколение /племенник на индексната пациентка/. Индексния пациент е жена на 56г. със сестра на 57г., която е асимптомна. Начало на оплакванията: на 54г., изразяващи се в схващане и слабост в ръцете, дистално. В момента на изследването се наблюдава мускулна слабост и хипотрофии в проксимални отдели на горни крайници – делтоидеус и бицепс брахии, скапуле алате, както и дистални тенар, хипотенар и предмишници. Мускулната слабост е предилекционно проксимално в крайниците, аксиална мускулатура с лумбална лордоза и Гауерс+. Затруднено е изкачването по стълби и ставането от клекнало положение, промяна в походката. По скалата на Walton се оценява с 3т. Няма данни за кардиологични и офталмологични нарушения.

Родословие № 1:



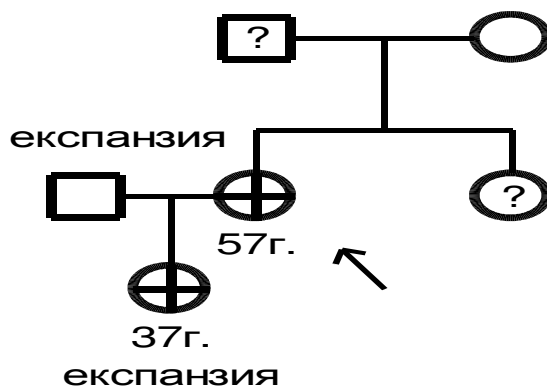
**Семейство №2:** Клинико-генетични данни за засегнати пет члена от две поколения, генетично верифициран е един от членовете от второ поколение. Индексният пациент е жена на 55г. с установена експанзия в гена отговорен за МД2 и начало на оплакванията на 40г. с прояви на слабост в долни крайници, предимно проксимално в момента на изследването. Пациентката е с изразена мускулна слабост в проксимални отдели на долни и горни крайници, повече за краката. Със затруднено изкачване по стълби и изправяне от клекнало положение, Гауерс +. С оценка по скалата на Walton – 3т. С данни от кардиологичното изследване за нарушена релаксация на лява камера – диастолна дисфункция. Пациентката е оперирана от двустранна катаракта на 50г. Останалите членове на фамилията са с клинични данни характерни за заболяването.

Родословие № 2



**Семейство №3:** Клинико-генетични данни за засегнати двама члена от две поколения в семейството – майка и дъщеря. Генетично верифицирани са индексната пациентка и нейната дъщеря. Анамнестични данни за бащата на индексната пациентка за кардиологично заболяване и захарен диабет. Началото на оплакванията при индексната пациентка е от 42г. възраст и се изразяват в слабост в проксимални отдели на долни крайници. В актуалният момент пациентката е със слабост в долни крайници и хипотрофии на подбедрена мускулатура. Тя е със затруднено изкачване по стълби и изправяне от клекнало положение, Гауерс +, с оценка по скалата на Walton – 3т. Индексната пациентка е с данни за екстрасистолна аритмия и дългогодишна артериална хипертония. От невроофтальмологичното изследване се установява двустранно катаракта с множество праховидни сивкави окципитати. Другият засегнат член, дъщерята на индексната пациентка е асимптомна.

Родословие № 3:



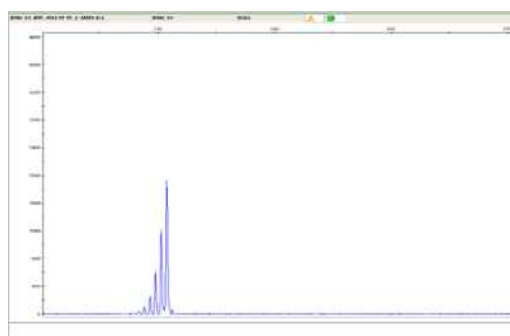
Легенда

- + ; + засегнати ; + засегнати, починали ; ? вероятно засегнати, починали ; ? вероятно засегнати роднини, по анамнеза  
A аборт по медицински показания ; ? мъртвоорождане -фетус с множествени малформации

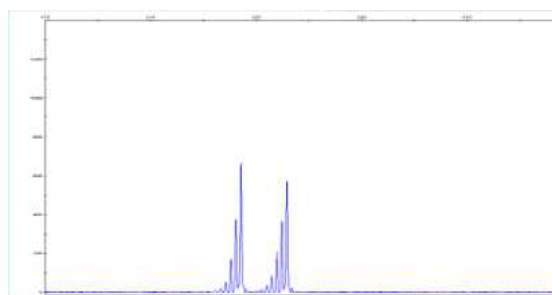
За потвърждаване на експанзии в регион на *CNBP* (*ZNF9*) гена при пациенти с клинична диагноза МД2 се приложи Southern blot, комерсиални китове за диагностика на PROMM. В пет (50%) от случаите от общо десет пациента със симптоми, насочващи към МД2 се установява експанзия. При 34 души, от които 19 жени и 15 мъже, изследвани и съответно с отхвърлени диагнози за МД1, се направи TP-PCR анализ. В първоначално проведения PCR – анализ, метод за отхвърляне МД2 диагнозата, в изследваната от нас група най-честият, немутантен алел е с 245 (CCTG) повтора, а най-тежкият, нормален алел е с 265 (CCTG) повтора. След проведения PCR-анализ установихме 15 (44,1%) пациента с неотхвърлена МД2 диагноза и 19 (55,9%) пациента с отхвърлена такава. Поради неперфектната структура на мотива: (TG)<sub>n</sub>(TCTG)<sub>n</sub> (CCTG)<sub>n</sub> (NCTG)<sub>n</sub> (CCTG)<sub>n</sub> и трудността при амплифициране на големи ампликони, не се наблюдава очаквания профил на експанзия. В няколко случая, се наблюдава слаба амплификация, но липсва възпроизводимост, поради което при тези пациенти не може със сигурност да се постави генетичната диагноза МД2, и вследствие на това те не са включени в разглежданите корелационни зависимости, обект на настоящето проучване.

**Фигура 5 Електрофореграма на PCR продукт за амплифициране на CCTG повторената област от *CNBP* (*ZNF9*) гена:**

а) хомозигот



б) хетерозигот



## ДИСКУСИЯ

Миотонична дистрофия е една от най-честите мускулни дистрофии при възрастните, с честота 1:8000 (12,5 на 100 000 души). Честотата е предимно въз основа на клиничната диагноза на по-тежко засегнатите пациенти с МД1, съответно този тип се счита и за най-честата мускулна дистрофия при възрастни (Harper P.S, съавтори, 2001). За първи път в България заболяването е описано в дисертационния труд на професор Янко Янков през 1977 г. Той е провел проучване с модерни за времето си подходи по отношение на епидемиологията, биохимията, морфологията и хистохимията, електронната микроскопия, цитогенетиката и електрофизиологията. На база на данните от гореописаните методи, авторът посочва приблизителна честота, диференцирана демографски.

В медицинската практика у нас са въведени генетични изследвания за установяване на мутация в DMPK гена от няколко години. Предмет на настоящото проучване е откриване на взаимовръзките между фенотипните и генотипните характеристики на заболяването.

В представеното от нас проучване молекулярно-генетичното изследване потвърждава диагнозата при 84 от изследваните в 23 фамилии. Разпределението по пол на диагностицираните от нас пациенти с МД1 е по равно и е сходно на разпределението, описано в други проучвания (Harper P.S, съавтори, 2001). Относно първите прояви при жените в нашето изследване преобладават тези, които са с начало  $\leq 30$ г., в сравнение с мъжете. Наблюдава се статистически значима връзка между пола и възрастта на начало ( $p=0.019$ ). Не са намерени в литературата други такива сравнителни анализи.

МД1 е едно от най-променливите наследствени заболявания при

човека, като фенотипната експресия варира от сериозно засегнати новородени до асимптомни възрастни (Harper P.S, съавтори, 2001). Нашите наблюдения сочат, че възрастта на изява на първите симптоми обхваща периода от първата година на живота до 58г., както и че средна възраст на първоначална изява на заболяването е 24.8г. Това е в съответствие с твърдението, че началото на заболяването е предимно през второто и третото десетилетие от живот (Harper P.S, съавтори, 2001; Udd B., съавтори, 2012).

В разгледаната от нас кохорта пациенти с МД1, фенотипната изява варира от асимптомни случаи до индивиди с цялостно разгърната клинична картина. МД1 се подразделя на няколко форми според възрастта на начало, въпреки че всяка форма представя конкретни клинични характеристики, няма абсолютно разграничение между тях, а те по-скоро образуват континуум. Harper P. S и Udd B. обособяват следните форми на МД1: с късно начало (умерена), с начало в зряла възраст (класическа), в детска и ювенилна възраст и вродена форма (Harper P.S, съавтори, 2001; Udd B, съавтори, 2012). В съответствие с горе казаното, ние също установяваме вродена форма, форма с начало в детска и ювенилна възраст. В по-голяма част, изследваните пациенти са със симптоматична изява между 20 и 50г., представляващи класическата форма МД1. Утвърдени литературни данни съобщават, че МД1 по-рядко е с начало след 49 г. В нашето изследване има описани само двама пациенти, при които началото на симптомите е над тази възраст. Вродената МД1 е известна като формата с най-тежка проява на заболяването, която се унаследява от майки с МД1. Новородените са с генерализирана хипотония, респираторен дистрес, и/или затруднения в храненето, като по-късно са със забавяне в моторното и психическото развитие

(Harper P. S, съавтори, 2001). При изследваните от нас пациенти с вродена форма на МД1 също се описват симптоми като: генерализирана хипотония, отслабени сукателен рефлекс и хватателен рефлекс на Моро, липсващи СНР, дихателна недостатъчност, лицева амимия, лагофталм, еквиноварусни деформитети на стъпалата. При тези болни слабостта персистира и в ранна детска възраст, а по-късно се проявява и миотонията в ръцете. При двама от тях има данни за чести респираторни инфекции. При майките на пациентите с вродена форма на МД1 се установяват 200 и над 1000 повтори, а при децата им съответно 1000 и 1500 СТG повтори.

Както беше отбелязано в литературния обзор, дълго време се е считало, че вродената форма може да бъде унаследена само по майчина линия с МД1, но след въвеждане на молекулярния анализ, доказващ експанзия в предполагаеми носители, става ясно, че конгениталната форма на МД1, макар и в много поредки случаи, може да бъде унаследена и по бащина линия (Bergoffen, J., съавтори, 1994; Nakagawa M, съавтори, 1994; De Die-Smulders и съавтори, 2004; Zeesman S, съавтори, 2002). В подкрепа на това от нашето изследване може да се илюстрира пример за пациент с вродена форма на МД1, чиито бащата е с доказана както клинично така и потвърдена генетично диагноза, и с установяване на експанзия в DMPK гена. Пациентът с вродената МД1 форма е с 250- < 800 повтори и данни за мозаицизъм. Въпреки, че класификацията на EMQN от 2008, определя като “вродена” форма пациенти с над 2001 СТG повтора, клиничните данни в конкретния случай сочат наличие на фенотипна характеристика, отговаряща на конгениталната миотонична дистрофия. До същите резултати

достигат и Redman и съавтори, които докладват за няколко случая с вродена форма на МД1 с брой на повторите между 730 и 1000 (Redman JB, съавтори, 1993).

От 56 изследвани генетично пациенти чрез Southern blot, с определяне на дължината на триплетният повтор, сме разгледали разпределението на CTG повторите. В нашата кохорта размера на експанзията варира от 50-1500 CTG, като средният размер на CTG повторите е около 636 CTG. По данни на IDMC от 2000 г.(The International Myotonic Dystrophy Consortium), както и на Lavedan C., съавтори, МД 1 индивиди с изява в зряла възраст имат широка гама от брой CTG повтори, грубо между 100 и 1000 (средно ~ 650 повтора), докато вродена и в детска възраст форма на МД1 имат повече от 1000 повтора (средно ~ 1200 повтора) (Lavedan C., съавтори, 1993; The International Myotonic Dystrophy Consortium - IDMC, 2000).

Според класификацията на EMQN от 2008, МД 1 се определя като премутационна (обхващаща от 38 до 50 CTG), „умерена“ форма (от 51 до 149 CTG), „класическа“ форма (от 150 до 2000 CTG) и „вродена“ форма (над 2001 CTG). В представеното от нас проучване сме обособили две групи: с  $\leq 400$  и с  $> 400$  повтора CTG. В 94% (74/79) от случаите повторите са в обхватът на „класическата“ форма и едва двама (2.5%) пациента са с обхват на повторите, отговарящ на „умерената“ форма. Трима (4%) от пациентите са с данни за характерните клинични прояви на „вродената“ форма, при тях обхватът на повторите е от 1000 до 1500, като тук се включва и пациентът с вродена форма и с 250- < 800 повтори и данни за мозаицизъм. Поради малкият брой на пациентите с „умерена“(50 до 150 CTG) и с „конгенитална“ (1000-1500 CTG) форми, при търсене

на различните генотип-фенотип зависимости, тези пациенти се причисляват съответно към групата с  $\leq 400$  и в групата с  $> 400$  CTG повтора.

По подобен модел, Valaperta R. (Valaperta R, съавтори, 2013) разделя пациентите на две групи по отношение на невромускулните и кардиологични нарушения при МД. В случая те са генотипно разделени поради широкият обхват на повторите при „класическата“ форма, вследствие на което могат да се причислят както пациенти с гранични експанзии в умерената форма, така и пациенти с размер на експанзията близък до обхвата на конгениталните форми. Авторите разделят пациентите с „класическа“ форма на следните по-специфични генотипни класа: E2a клас от 150 до 450 CTG и E2b клас от 451 до 2000 CTG.

Зависимостта между тежестта и по-ранното начало на фенотипна изява заболяването е предмет на много противоречиви анализи и заключения в литературата. Автори като Gharehbaghi-Schnell EB и съавтори считат, че броят CTG повтори, свързан в по-голяма степен с възрастта на начало и тежест на симптомите, е под 400 CTG повтора (Gharehbaghi-Schnell EB, съавтори, 1998 ). Hamshere MG дава едно от обясненията за по-слабата корелация между фенотипа и размерът на повторите над 400, а именно, че в DMPK дължината на CTG тринуклеотидният повтор е митотично нестабилна при индивиди с МД1. Тази нестабилност води и до соматичен мозаицизъм на размера на CTG експанзията (Hamshere MG, съавтори, 1999). Savić D. отчита отрицателна линейна корелация с възрастта на начало и средният размер на експанзията при ювенилна - възрастна форма на МД1, при която прогениторния алел е с дължина по-малко от 245 повтора. Тези резултати подкрепят

съществуването на праг, отвъд който увеличаването на повторите не влияе на възрастта на начало (Savić D, съавтори, 2002). Резултатите от представеното тук изследване разкриват, обаче известна зависимост на по-ранната възраст на начало и размера на експанзията над гореописаният праг. В двете групи пациенти, диференцирани според размера на експанзията, броя на повторите се съпоставя с тежестта на клиничната картина. Отчитаме, че при по-голяма част от пациентите с над 400 CTG първите симптоми се проявяват под 30г. Докато при пациентите с по-малък размер на експанзията (под 400 CTG) проявата на заболяването е в по-късна възраст. Намерена е също така и статистически значима разлика между изследваните групи пациенти ( $p=0,032$ ). В подкрепа на нашите резултати е и неотдавнашно проучване на голяма кохорта от МД1 пациенти, което показва, че прогнозираната дължина на прогениторния алел е основен модификатор за възраст на поява на заболяването и представлява 64% от вариацията, без праг на дължината на повторите, над който да оказва влияние върху възрастта на начало (Morales F, съавтори, 2012). Възрастта на начало е допълнително модифицирана от нивото на индивидуалната специфична соматична нестабилност: пациенти, при които броят на повторите се увеличава по-бързо имат по-ранна възраст на начало (Morales F, съавтори, 2012). Вероятно това е и обяснение на факта, че не откриваме и връзка между размера на повторите и наличието на антиципация ( $p=0.063$ ). Като дори в случаите с по-малък размер на експанзията процентът с антиципация е по-голям от този на групата с по-голяма експанзия.

Изследваните МД1 семейства са с установена антиципация, както на базата на нарастване на броят на повторите така и на съответните

клинични данни за по-ранно и по-тежко засягане на следващите поколения. Феноменът антиципация е характерен за МД1 и е описан от много автори до момента. Едни от тях са Brinkmann В. и съавтори, те определят като причина за този феномен мейотичната нестабилност на тринуклеотида, водеща до склонността му към нарастване на дължината при всяко следващо поколение. Така при децата на засегнатите индивиди, включително и тези с премутация, се наблюдава тенденция за по-тежка и в по-ранна възраст на проява на симптомите, в сравнение с техният родител (Brinkmann В, съавтори,1998). Предвид съществуващата хипотеза за значението на пола на родителя по отношение промяната в броя повтори, сме потърсили зависимост между унаследяването по майчина или бащина линия и наличието на антиципация. Въпреки че антиципацията се наблюдава при генетични заболявания, феноменът е с клинична изява- с по-ранна и по-тежка проява на симптомите на заболяването в следващите поколения. Поради тази причина сме взели предвид и случаите с антиципация само по клинични показатели и анамнестични данни. В изследваните от нас семейства с данни за антиципация, се отчита малка процентна разлика между тези с унаследяване по майчина и бащина линия. Не откриваме статистически значима разлика между пола на родителя, предаващ мутацията, с феномена на антиципация ( $p=0.654$ ), което обаче, имайки предвид пояснението по-горе, не изключва увеличаване на размера на експанзията в поколенията. Така много от авторите считат, че посоката и степента на промяна в броят на повторите, между поколенията, зависи както от размера на родителската експанзия така и от пола на родителя, предаващ мутацията. Разгледахме корелациите както между линията на унаследяване и

размера на експанзиращия алел, така и между антиципацията и с размерът на експанзията. Анализирането и на двете връзки показва, че не са статистически значими ( $p=0.075$ ;  $p=0.063$ ) при 95% статистическа достоверност. Ако приемем по-голям риск за грешка – 10%, то тогава тези връзки се явяват значими при 90% статистическа вероятност ( $p<0.1$ ), което ни кара да предположим че е налице тенденция към зависимост на изследваните показатели. Следователно бихме могли да заключим първо, че унаследяването на мутантния ген от майката при CTG повтори над 400 (87,0%) е по-често срещано от колкото съответното унаследяване от бащата (63,2%), и второ, че при пациентите с по-голям размер на експанзията (>400CTG) се наблюдава по-често феномена антиципация в поколенията. Harley H.G и съавтори заключават, че абсолютното увеличение в броят копия повтори е по-голямо при предаване от жените (средно в размер от ~ 500-600 повтора), отколкото при предаване от мъжете (средно в размер от ~ 260-280 повтора) (Harley HG., съавтори, 1993; Lavedan C., съавтори, 1993). За разлика от тях Brunner H.G и съавтори, твърдят, че премутация и промутация се унаследяват стабилно или с по-малки промени в броя повтори в следващите няколко поколения, ако бъдат предадени от жени (Brunner HG., съавтори, 1993; Barcelo JM., съавтори, 1993; Martorell L., съавтори, 2001; Simmons Z., съавтори, 1998; Savić D., съавтори, 2006). Salehi LB и съавтори, наблюдават при предаването по бащина линия стабилни трансмисии или контракции (“свиване” на експанзията), за разлика от унаследяването по майчина линия (Salehi LB., съавтори, 2007) .

В едно от изследваните от нас семейства със засегнати две поколения и с унаследяване по майчина линия, размерът на

експанзията не се променя във второто поколение, но фенотипната изява е с характеристиката на антиципация в клинично отношение. По литературни данни контракциите са по-често предавани по линия на бащата и появата на такъв феномен при член на семейството увеличава вероятността от контракция в друг член от фамилията с МД1, като очакваната честота на повторните контракции при МД1 – родословията е 4.2-6.4 % (Ashizawa T., съавтори, 1994; Salehi LB., съавтори, 2007). Те обикновено са свързани с промяната към по-лека проява на симптомите или дори безсимптомно протичане, но в някои двойки родител-дете антиципацията все още е налице (Ashizawa T., съавтори, 1994; Monckton DG., съавтори, 1995).

За по-детайлно характеризиране механизма на антиципацията разглеждаме средният размер на експанзиращия алел при майки на пациенти с вродена форма и на тези с начало в ранна детска възраст. Алелът при тях е по-голям от този на майки, чиито потомство е с начало на заболяването в по-зряла възраст. Автори като Lavedan C, Harley HG, установяват подобна корелация относно майките на индивиди с вродена МД1 (Harley HG., съавтори, 1993; Lavedan C., съавтори, 1993; Tsilfidis C., съавтори, 1992).

Трябва да се вземе предвид, че членовете на една част от засегнатите семейства, са изследвани с методиката TP-PCR, определяща наличието на експанзия, без точният размер на повторите, при които не трябва да се пренебрегва клиничната изява, по правило информативна за антиципация.

В нашето изследване не се установява статистически значима зависимост на вида първи симптоми от възрастовия период на изява ( $p=0,691$ ). Въпреки това се отчита известна процентна разлика при пациентите с по-ранно и по-късно начало. При първите процентът

на първоначални прояви от миотония и слабост в четирите крайника дистално е по-голям от тези с по-късна възраст на изява на заболяването. Класическият модел на мускулна слабост при МД1 включва лицеви мускули – птоза без офталмопареза, слабост при затваряне на очите и устата; дъвкателни мускули, темпорални мускули; шийни флексори и дистална мускулатура на горни крайници – дълбоки флексори на палеца и на латералните пръсти. С прогресията на заболяването има типично засягане на трицепса и дорзифлексорите на стъпалото. На по-късен етап могат да бъдат обхванати и раменният пояс и тазобедрената мускулатура; също така се развива дифузно изразена слабост на булбарна, вентилаторна и мускулатура на тазовото дъно (Янков Я, 1977; Day JW., съавтори, 2003).

В групата на мъжете като начална симптоматика се наблюдава предимно ангажиране на дисталните отдели на четирите крайника под формата на миотонични прояви и мускулна слабост, докато при жените тези прояви се изразяват в миотония в горни крайници. Не се открива статистически значима зависимост на първите симптоми от пола ( $p=0,813$ ), което е и в подкрепа на известните до момента данни. А именно, че при всички пациенти с МД, независимо от пола, като най-ранен и най-чест компонент на заболяването, се приема слабост и атрофията на воларната част предмишницата, тенар и хипотенар, както и миотоничните прояви. Последните са по-изявени при МД1 отколкото при МД2, но по-слабо проявени от тези наблюдавани при хлорните каналопатии. Миотоничният феномен е по-отчетлив при МД1, а електрофизиологичната миотония се наблюдава при почти всички пациенти в зряла възраст и при двете форми на МД (Янков, Я, 1977; Day JW, 2003).

В проведеното от нас клинично изследване не се наблюдава правопрпорционална връзка между нарастване на продължителността на заболяването и прогресиране на мускулната слабост и по-тежко въвличане на проксималните мускулни групи. В конкретния случай обаче пациентите не са корелирани според размера на експанзията им и съответно вероятна причина, за този резултат, може да се търси в различния размер на експанзията и соматичната нестабилност на увеличения триплетен регион.

С цел да се установи дали при по-големи експанзии се ангажират по-тежко мускулите с обхващане и на проксималните групи, е потърсена зависимост между степента на мускулната слабост и броят на повторите. Пациентите с изразена слабост, както в проксималните така и в дисталните мускулни групи са разпределени в еднакъв процент, в двете основни групи, обособени според размера на експанзията. Липсата на статистически значима връзка между големината на експанзиращия алел и локализацията и степента на мускулна слабост се потвърждава и от Khoshbakht R. и съавтори. Авторите, подобно на описаните по-горе от нас резултати, не откриват такава зависимост и между размера на експанзията и електромиографската находка за миогенна увреда (Khoshbakht R., съавтори, 2013). Тежестта на мускулната слабост се определя и според степента на инвалидност по скала на Walton. Като сме взели предвид средната продължителност на заболяването и неговият прогресивен характер, ние сме потърси връзка между по-високата степен на инвалидизация и по-големият размер на експанзията. Такава не беше установена, дори се отчете по-кратка продължителност на заболяването и по-висока инвалидност при пациенти с под 400 CTG повтора. Този резултат не отговаря на

очакванията, че по-голямата експанзия е свързана с по-ранна и по-тежка изява на мускулната слабост, съответно по-кратък период за достигане на по-висока степен на инвалидност. С подобни данни може да бъдат цитирани редица други автори, които дават обяснение на резултатите си със соматичния мозаицизъм, изразяващ се като хетерогенност на повторите в различните тъкни, както и с предразположението към допълнително увеличение, непрекъснато през целия живот на индивида (Monckton DG, 1995; Wong LJC, 1995; Martorell L, 1998). Други данни на Higham CF и съавтори показват, че склонността към експанзия е кумулативен ефект от многобройни и чести процеси на увеличаване и свиване, които са вероятно ежедневни (Higham CF., съавтори, 2012). Обобщено, те показват, че соматичната нестабилност се характеризира с непрекъснатост през целия живот на индивида и със склонност към експанзия. Което може да се тълкува и като предпоставка за различието в разпределението на МД1 алелния размер между кръвта и други тъкани като например скелетната мускулна тъкан, съответно различието в мутационната динамика в тези тъкани. Проява на мускулна увреда са и завишените стойности на мускулния ензим креатинфосфокиназа (КФК). При МД1 стойностите на КФК варират от норма до трикратно завишени, за разлика от други мускулни дистрофии (тип Дюшен и тип Бекер, фацио-скапуло-хумерална мускулна дистрофия). При изследваните от нас пациенти средната стойност на повишената КФК е ~ 334. Потърсена е зависимост между увеличената КФК и броят на СТГ повторите. Не се открива подобна връзка, което вероятно се дължи и на факта, че мускулният ензим променя серумните си нива в процеса на заболяването, като в по-ранните етапи е с пикови нива, а с

напредване на дистрофичния процес нивото на КФК може да спадне и до нормата.

МД1 е комплексно заболяване, ангажиращо различни системи, като включва и немускулни симптоми. Разгледали сме някои нарушения като: полиневропатия, глюкозен интолеранс, хипогамаглобулинемия, повишени нива на гама - глутамилтрансфераза.

С най-голям относителен дял от изследваните са тези с понижени стойности на ИгГ, следвани от пациентите със стойности на ГГТ над референтните граници, и в най-малък процент са тези от тях с повишени стойности на кръвната захар и данни за нарушен въглехидратен толеранс или захарен диабет тип 2. Процентът на последните нараства, ако към тях причислим и двамата, които са били с нормални стойности на глюкозата, в момента на изследването, но със захарен диабет тип 2, като придружаващо заболяване. В проучването е потърсена зависимост между понижените стойности на ИгГ и броят на повторите. В процентно отношение се открива разлика между пациентите с хипогамаглобулинемия и по-голям размер на СТГ повторите и групата пациенти с <400 СТГ. Kaminsky P. и сътрудници, откриват такава корелация между експанзията на СТГ повторите и ИгГ дефицитът (Kaminsky P., съавтори, 2011). Други автори като Nakamura A и сътрудници (Nakamura A., съавтори, 1996) също наблюдават повлияване на имунологичните параметри от експанзията на СТГ повторите при пациенти с МД1. Те корелират дължината на СТГ повторите със серумните нива на имуноглобулините (ИгГ, ИгМ, ИгА) и с броя на лимфоцитите в периферната кръв. Отчитат, че нарастването на СТГ повторите корелира в значителна степен с намаляването на на серумните нива

на ИгГ, с намаляването на общия брой лимфоцити и с понижаването на броят CD2+, CD3+, и CD4+ клетки. Други автори не потвърждават подобна зависимост, при проучване на корелацията между CTG повторите и нивата на FcRn транскриптите в мускулната тъкан и лимфоцитите, и серумните нива на ИгГ (Pan-Hammarström Q., съавтори, 2003).

Не се установява съществена процентна разлика в групата с над 400 и тази с под 400 CTG повтора по отношение на абнормните стойности на ГГТ. При пациентите с по-голям размер експанзията в по-голям процент се отчитат стойности на ГГТ над референтните граници, докато при пациентите с по-малък брой повтори в по-малък процент ГГТ са абнормни. В литературата, а и от наши данни, не се потвърждава статистически значима разлика между пациентите с абнормни стойности на ГГТ и малък размер на експанзията и такива с повишен чернодробен ензим и голям размер на експанзирания алел. Въпреки, че някои автори, като Heatwole и съавтори, търсят зависимост между тежестта на заболяването и нарушените стойности на гама-глутамилтрансфераза. Те разделят голяма група от МД1 пациенти на такива с лека до умерена степен на засягане от заболяването, като демонстрират абнормни стойности на всички изследвани чернодробни ензимни нива (ЛДХ, ГГТ, АСАТ, АЛАТ и АФ), но не наблюдават зависимост с тежестта на заболяването (Heatwole С., съавтори, 2006).

В нашето проучване в близо 20 % от проведените изследвания се установяват данни за повишени нива на кръвната захар. Общо трима пациенти са със захарен диабет тип 2, като един от случаите е новооткрит. Четирима пациенти са с данни за нарушен

въглехидратен толеранс. Takada H. и съавтори считат, че МД1 пациенти с дисгликемия имат чернодробна и мускулна инсулинова резистентност, както и абнормна секреция на инсулин. Инсулиновата резистентност при МД1 може да доведе до множество метаболитни дефекти (Takada H., съавтори, 2012). Инсулиновата резистентност е основната причина на към глюкозен интолеранс при МД1. Вследствие на това хиперинсулинемията е вид компенсаторен механизъм и по-късно може да доведе до появата на захарен диабет (Matsumura T., съавтори 2009, Aitkens S., съавтори, 2005). Въпреки това, честотата на диабет при пациенти с МД1 не е доказана. Загубата на мускулна маса и ниската физическа активност може да влоши инсулиновата резистентност и да доведе до дисрегулация на белтъчния катаболизъм (Björntorp P., съавтори, 2000). Това трябва да се има в предвид при проследяване на пациентите с прогресиращ дистрофичен процес, с цел ранна интервенция срещу инсулиновата резистентност при тях.

При МД1 е известно и проучено в различни аспекти, ангажирането на ЦНС, като в по-редки случаи наред с мускулната слабост може да се засегне и периферната нервна система, по типа на аксонална периферна невропатия (Krishnan AV, 2006; Bae JS, 2008). При проведените от нас изследвания се установява в 28% от пациентите данни на ПНП, като също се наблюдава в по-голям процент при мъжете в сравнение с този при жените. Ние установяваме, че средната възраст на пациентите с ПНП е с около десет години по-голяма от тази на МД1 пациентите без засягане на ПНС. Подобни на нашите данни са и тези на Peric S и съавтори (Peric S., 2013), които проучват голяма кохорта от МД1 пациенти и установяват в една

трета от тях чрез изследвания за нервната проводимост, белези на невропатия. Авторите наблюдават асоциация с наличието на ПНП при МД1 и мъжкия пол, възрастта на пациентите, продължителността на заболяването и определени метаболитни параметри. В тяхното проучване ПНП е намерена в по-голям процент при пациенти с нарушен глюкозен толеранс и захарен диабет. С по-голям относителен дял за мъжете, по-възрастните пациенти и пациентите с по-голяма продължителност на заболяването. За разлика от Peric S. и съавтори, при изследваните от нас пациенти не се открива зависимост в процентно отношение между средната продължителност на заболяването и ПНП, като в групата пациенти с перифернонервна увреда, продължителността е почти еквивалентна с тази на пациентите със запазена проводимост по периферните нерви. Асоциираност на ПНП с нарушен въглехидратен толеранс, захарен диабет тип 2, се отчита в около четиресет процента от случаите. Но в много малък процент от всички пациенти с ПНП има данни за други компоненти на метаболитния синдром като дислипидемия и обезитас. Hermans MC, и съавтори съобщават за значителна зависимост между засягането на периферните нерви и мускулната слабост и липсата на Ахилови рефлексии, но не откриват такава с възрастта или с продължителността на невромускулните симптоми. (Hermans MC, 2011). Отбелязани са процентни разлики в групите с под и над 400 повтори по отношение на отклоненията в ЕМГ записа. При пациентите с по-малък размер на експанзията в 75% от случаите, проявите са миотонични феномени, в сравнение с тези с по-голям размер на повторите. Миогенните промени, в групата с размер на експанзията под 400 СТГ, се отчитат в двойно по-малък процент в

сравнение с този на пациентите с над 400 СТГ. Khoshbakht R. и съавтори не откриват обаче зависимост между размера на експанзията и електромиографската находка за миогенна увреда (Khoshbakht R., съавтори, 2013).

Ние сме разгледали също и зависимостта между перифернонервната увреда и броят на СТГ повторите. По отношение на този тип увреда разликата между двете групи е 20% в полза на пациентите с по-голям брой повтори, но не се установява статистически значима разлика ( $p=0.809$ ).

Ангажирането на сърдечната система и по-специално проводните нарушения са признати като важен компонент на МД1 фенотипа и подробно са описвани от много автори (Bassez G., 200; Dello Russo A., съавтори 2006). Тези дефекти са сериозна причина за преждевременна смърт при хора с МД1, понякога водещи и до внезапна такава (Bassez G., съавтори, 2004; Dello Russo A., съавтори, 2006; Gagnon C. 2013; Sovari A., 2007; Breton R., 2009; Morner S., 2010; Petri H., 2012; Turkbey EB, 2012).

В тук представеното проучване, от кардиологично изследваните МД1, пациенти значителен процент (68.1%) от тях са с данни за един или друг тип нарушения. При МД1 сърдечното заболяване е често, но е трудно да се определи точно неговото разпространение, като в литературата са използвани различни дефиниции. Разгледана е честотата на засегнатите кардиологично пациенти, спрямо продължителността на заболяването, съответно прогресията на дистрофичния процес. Кардиологичните промени са с разпръсната проява, като не се наблюдава нарастване на броя пациенти с времето, не се откриват и статистически значими разлики между кардиологичните нарушения в различните периоди на заболяването.

Прогресията на проводните нарушения обикновено е бавна (Cerghet M., съавтори, 2008), но при отделни пациенти се наблюдава и бързо прогресиране, което прави клиничното протичане по-скоро непредвидимо. Canavese F. и съавтори определят невромускулните промени като най-честа първоначална клинична проява на МД1 (със или без субклинично сърдечно участие), но подчертават, че понякога сърдечните симптоми могат да се проявят първи (Canavese F., съавтори, 2009).

Едни от най-често срещаните по литературни данни (Cobo AM, съавтори, 1995) аритмии - предсърдно мъждене или фибрилации, в нашето изследване се установиха само при двама от пациентите. В отчетените ритъмно-проводни нарушения преобладават надкамерни и камерните аритмии. В седем от случаите се наблюдават ритъмно-проводни нарушения с участие на проводните бедра (ЛББ и ЛПХБ), подобно на описаната от Cudia P. и съавтори, камерна тахикардия тип bundle branch re-entry (BBRVT), причина за което те посочват забавяне в провеждането по снопа на Хис (Cudia P., съавтори, 2009).

В противоречие с други нервно-мускулни заболявания, пациентите с МД1 рядко имат явни клинични прояви на кардиомиопатия - "миотонична" болест на сърцето. (Canavese F., съавтори, 2009). Описваме едва при малка част от пациентите явна сърдечна дисфункция, която е рядко срещана, но могат да бъдат открити субклинични и леки сърдечни нарушения, Dauvilliers YA и съавтори отчитат подобна честота. В нашия случай това са данните за нарушена левокамерна релаксация-диастолна дисфункция, както и систолна дисфункция. Dauvilliers YA и съавтори потвърждават наличието на сърдечен еквивалент на миотонията в скелетната мускулатура (миокардна миотония) чрез оценка на Доплер-ехо

параметрите на диастолната функция (Dauvilliers YA, съавтори, 2012).

Малка част от пациентите, изследвани от нас, са с доказана исхемична болест на сърцето или са претърпяли остър миокарден инфаркт, като в два от случаите той се явява и причина за смъртта. Day JW и съавтори също описват като рядко срещана исхемичната болест на сърцето, понякога наблюдавана като хронична стабилна стенокардия, нестабилна стенокардия и остър миокарден инфаркт (Day JW, съавтори, 2005).

От проведените ЕхоКГ се установява също така и при над трийсет процента от пациентите митрална регургитация, като в над половината от тях е установен пролапс на митралната клапа. Относителният дял на пациентите с пролапс на митралната клапа (19.7%), изчислен на базата на общо ехокардиографски изследваните пациенти, се доближава до този установен и от други автори като Breton R и съавтори, които съобщават в проучването си за такива клапни нарушения при 25-40 % от МД1 (Breton R., съавтори, 2009).

Тежестта на заболяването нараства с появата на сърдечни и дихателни усложнения. От една страна това са: рискът от внезапна сърдечна смърт вследствие на ритъмно-проводни нарушения и рискът от емболични инциденти в резултат от хронично предсърдно мъждене. От друга страна това са белодробните заболявания и алвеоларната хиповентиляция, които влошават състоянието чрез аспирация и инсуфициентно функциониране на дихателната мускулатура.

Потърсихме асоциация на тези нарушения с разпределението и тежестта на мускулната слабост, като не се откри статистически значима разлика между кардиологичните нарушения и по-

изразените и генерализирани прояви на мускулна слабост ( $p= 0.242$ ), което е в потвърждение на становището на Cerghet M. и съавтори от 2008г.. Потърсили сме зависимост и между занижените стойности на вентилаторните показатели и мускулната слабост проксимално и аксиално. Ние не намираме такава връзка за разлика от Mathieu J. и съавтори, които заключават, че продължителността на живот при МД1 е значително скъсена, особено при онези от тях с ранно начало на заболяването и засягане на проксимални мускулни групи, съотнесено към тези с дистална или липса на мускулна слабост. Авторите определят респираторните и кардиоваскуларните заболявания като част от основните причини, за по-високата честота на смъртност в групата пациенти с проксимална мускулна слабост (Mathieu J., съавтори 1999). С цел да проследим дали при МД1 съществува взаимовръзка между засягането на двете системи, дихателна и сърдечна, направихме сравнение на пациентите с кардиологични прояви в комбинация от нарушени вентилаторни показатели и тези с изолирано сърдечно засягане. Относителният дял на случаите, в които са отчетени абнормни стойности на вентилаторните показатели, но без кардиологични нарушения, е равнозначен на този, който е в комбинация с кардиологични прояви. Не се намира и статистически значима разлика.

Правени са много опити да се намери възможна корелация между броя на СТГ повторите и тежестта на клиничните прояви на МД1, включително и сърдечните и дихателните усложнения. Предвид натрупващите се все повече доказателства в подкрепа на корелацията между сърдечната патология и СТГ експанзията, съотнесохме пациентите с установен брой повтори спрямо данните за кардиологични абнормности ( Antonini G, 2006; Arsenault ME,

2006; Awater C, 2012). Потърсена е подобна зависимост само при тези от пациентите с установени ритъмно проводни нарушения, тъй като от една страна това са едни от най-честите нарушения, а от друга са най-рискови за внезапна сърдечна смърт. В конкретния случай не се открива връзка ( $p=0.611$ ) между размера на експанзията и наличието на проводни нарушения. Bassez G и съавтори (Bassez G, съавтори, 2004), като по-късно и други, считат STG повторите като един вид фактор, определящ времето на поява на сърдечното усложнение, както и предвиждащ наличието и прогресията на ЕКГ аномалиите (Bae JS, съавтори, 2008; Awater C., съавтори 2012).

Склонни сме да се съгласим с Antonini G и съавтори, които считат, че анализът на STG повторите е с ограничена предиктивна стойност при отделните пациенти. Една от възможните причини е припокриването между размерите на експанзията, наблюдавани в различни фенотипни групи, соматичният мозаицизъм и факта, че ДНК анализът на STG повторите се извършва чрез левкоцити от периферната кръв, вместо от напречнонабраздените мускули и сърдечния мускул (Antonini G, съавтори, 2006).

Потърсена е и зависимост между размера на повторите и вентилаторните нарушения. От резултатите е видна липсата на статистически значима такава между понижените стойности на форсирания витален капацитет и броят на STG повтори ( $p=0,849$ ), от една страна, и на форсираният експираторен обем и повторите, от друга ( $p=0,461$ ).

### **Сравнителен анализ между МД1 и МД2**

Направен е сравнителен анализ между двата типа на миотонична дистрофия по отношение на клиничните прояви. Въпреки малкият брой на пациентите с МД2 се отчитат някои разлики в засягането на

отделните системи. Независимо че рутинните клинични изследвания могат да идентифицират миотонична дистрофия, формите на МД1 и МД2 в зряла възраст не могат да бъдат надеждно разграничени една от друга с помощта само на клинични критерии. Катарактите при индивиди с МД1 и МД2, например са неразличими. Най-стабилната разлика между МД1 и МД2 е, че неонаталната слабост, дихателната недостатъчност, изоставането в умственото развитие, черепно-лицевите аномалии, дефомитети на стъпалата, както и в детска възраст хипотонията и слабостта, са били докладвани само при индивиди с МД1, но не и при МД2. В допълнение, вероятно поради наличието на тези вродени дефекти, възрастни с МД1 често имат по-изразени слабост и миотония, отколкото възрастни с МД2. Индивиди с МД1 имат склонност към по-изявена лицева и булбарна слабост, мускулна атрофия, сърдечно засягане, и аномалии на централната нервна система, включително централна хиперсомния (Meola и др 2002 г., Ranum & Day 2002, Ranum & Day 2004, Day & Ranum 2005).

Средната възраст на пациентите, диагностицирани с МД1 (39.6г) е с около 15.9 г. по-малка от тази на МД2 (55.5г.). Приблизително с 22.2 г. по-късно е първоначалната изява на МД2, в сравнение с възрастта на начало при МД1 (24.8г.). Възрастовия диапазон на пациентите МД1 към момента на изследването варира в широки граници, от 8г. до 65г., докато този при МД2 е много по-тесен: 42г. до 57г. Средната продължителност на заболяването също е различна при двата типа: при МД2 тя е само 8.4г., а при МД1 е 14.1г. Асимптомните пациенти при МД1 са трима и един при МД2. Обяснение за описаните по-горе различия е факта, че МД2 е с по-бенигнен ход, като симптомите на заболяването често биват подценявани и късно забелязвани от пациентите, а оттам горната граница на възрастта на

диагностициране нараства. Това от друга страна може да обясни и хиподиагностиката по отношение на тип 2 миотонична дистрофия. По-редки са случаите с протичане на МД2 по типа на МД1, с характерни начални прояви, локализация на мускулната слабост, и прогресия на заболяването. Ние докладваме за такъв случай, диагностициран клинично като МД1, при който след провеждане на генетично изследване, се установява мутация в CNBP (ZNF9) гена, отговорен за PROMM.

Известно е, че при МД2 ангажирането на **мускулната система** е по-леко и с предимно проксимална локализация, като едва в по-напредналите стадии на болестта може да се обхванат и дисталните отдели. Това е и наблюдението ни при всички пациенти с МД2, с изключение на пациентът, първоначално диагностициран като МД1 и асимптомният случай. В 83.3% (n=5) от случаите първоначалните прояви на мускулната слабост са от долни крайници, проксимално, а при двама от тях наред с тези оплаквания се изявило и схващане на ръцете дистално. При МД1 обаче началната клинична картина е по-различна, преобладават първоначални симптоми като схващане и слабост само в горни крайници (57.9%, n=44) или в горни и долни крайници (31.6 %, n=24), като едва в 6.6% (n=5) от случаите първите симптоми са в долни крайници. В 93.4% (n=71) от МД1 пациентите са с дистални начални мускулни прояви, като нито един от тях не съобщава за първоначален симптом проксимална мускулна слабост. Едва на по-късен етап при МД1 се наблюдава прогресия на слабостта с обхващане и на проксималните отдели. Освен слабост, с напредване на дистрофичния процес, се отчитат и мускулни хипотрофии предимно в крайниците (87.3%, n=69). Тези прояви са по-изразени при МД1, като според периода на протичане се засягат

както дистални така и проксимални групи, а също и лицеви мускули, придаващи характерния, описан от други автори, "haggard" - изпит вид. При МД2 се наблюдава по-малък относителен дял и по-слабо изразени хипотрофии (50%, n=3) в проксимални отдели на долни и горни крайници. Съответно и степента на инвалидизация при МД1 е по-висока от тази при МД2. При втори тип най-тежката степен на инвалидност по скалата на Walton е 3 ст., докато при тип 1 има пациенти с данни за степен 7, отговаряща на тежка инвалидизация, невъзможна самостоятелна походка.

**Сърдечната система** е засегната при миотонична дистрофия. Данните на изследваните от нас МД2 пациенти сочат, подобно на автори като Meola G.(2002), Sansone VA (2012) и съавтори, за по-леки сърдечни нарушения в сравнение с тези установени при МД1. Най-чести за МД1 се явяват ритъмно-проводните нарушения, установени в голям процент и нашето изследване, по-слабо застъпени са при МД2, въпреки че автори, сред които е и Nguyen H.H и съавтори, асоциират МД2 също с атриовентрикуларни и интравентрикуларни нарушения в проводимостта, аритмии, кардиомиопатии и внезапна смърт (Nguyen H.H, съавтори,1988) Wahbi K. и съавтори показват, че МД2 по-често води до левокамерна дисфункция, отколкото първоначално се е считало, така и в нашия случай макар и малко на брой МД2 (33.3%, n=2) пациентите се доближават в процентно отношение до МД1 (34.8%, n=23) с подобни нарушения (Wahbi K., съавтори, 2009).

Данните от ЕМГ записите за миогенна увреда и миогонични залпове се отчитат при почти всички пациенти и при двата типа МД. Тези промени при МД2 се установяват предимно в проксималните мускули, а при МД1 основно в дисталните мускулни групи (мм).

абдуктор полицис бревис, тибialis антериор). В по-малка част от пациентите с МД1, главно тези от тях с клинични данни за генерализирана мускулна слабост, са изследвани и открити миогенни промени в проксимални и лицеви мускули (м. бицепс брахии, делтоидеус, вастус латералис, орбикуларис окули, орбикуларис орис). За разлика от МД1, при МД2 не се открива перифернонервна увреда. Тук причината може да се търси в по-лекото засягане на мускулната система при втори тип МД, подкрепено от Hermans MC и съавтори, които откриват значителна зависимост между засягането на периферните нерви и мускулната слабост.

Двустранната многоцветна катаракта (тип иридисцентен прах) и задна субкапсуларна катаракта са много характерни за миотонична дистрофия (Ashizawa и съавтори, 1992). Те до такава степен са специфични, че наличието на задна субкапсуларна катаракта у млади индивиди съчетана с двустранна птоза поражда съмнение за носителство на гена за миотонична дистрофия и налага целенасочени изследвания. По отношение на различията в невроофтальмологичната симптоматика при болни с МД1 и МД2, независимо от малката група болни с МД2, прави впечатление при тях отсъствието на друга невроофтальмологична симптоматика освен специфичната „цветна“ катаракта. За разлика от тях, невроофтальмологичната находка при болни с МД1 е богата и освен специфичната катаракта включва птоза, инсуфициенция на м. орбикуларис окули, разнообразни промени в очния мотилитет, както и промени в ретината по типа на атипичен пигментен ретинит. По отношение на МД 2 при изследваните от нас пациенти данните от лабораторните резултати показват в единичен случай повишена

стойност на ГГТ. Автори, като Heatwole C. (Heatwole C., съавтори, 2011) описват при разглеждане на по-голям брой пациенти с МД2, промени в множество лабораторни биомаркери, представляващи мускулни, чернодробни, бъбречни, хематологични, ендокринни, имунологични функции.

Ендокринните нарушения са част от мултисистемния характер на МД. Въпреки че могат да се наблюдават симптомите на диабет, инсулиновата резистентност е лека и рядко води до отключване захарен диабет при МД1. В проведеното от нас изследване със захарен диабет са само трима (4.5%), а с пациентите с данни, сочещи нарушен въглехидратен толеранс са 13 (19.7%). Включените в нашето изследване МД2 пациентите са без данни за диабет и с нормални кръвноразарни стойности. Но по литературни данни и при изследване на по-големи групи пациенти с МД2, честотата на диабет при тях е по-голяма (Day JW, съавтори, 2003; Savkur RS, съавтори, 2001).

## ИЗВОДИ

1. Установена е зависимост между пола и възрастта на начало на заболяването, като в групата на пациентите, с начало под 30 годишна възраст, преобладават жените.
2. Намерена е корелация между по-ранната възраст на начало, при пациенти с по-голям размер на експанзията.
3. Не се установява зависимост между типа първи симптоми, както с пола, така и с възрастта на проява на заболяването.
4. Не се установява корелация между степента на засягане на мускулите и размера на експанзията.
5. Наблюдава се тенденция за корелации съответно между:
  - антиципация при МД1 и по-голям размер на експанзията;
  - линията на унаследяване и броят на СТГ повторенията.
6. В подкрепа на мултисистемния характер на МД1 са изведени следните заключения:
  - голям процент от пациентите са с данни за кардиологични нарушения основно по типа на ритъмно-проводни, но без установена корелация, както с разпределение и степен на мускулното засягане, така и с размера на експанзията.
  - понижените вентилаторни показатели не се корелират със сърдечните нарушения и с броят на СТГ повторенията, но е установена зависимост от по-голямата продължителност на заболяването.
  - аксонният тип засягане на перифернонервната система е без зависимост по отношение на продължителността на заболяването и броят СТГ повторения.
    - абнормните нива на КФК, ГГТ, ИгГ не са зависими от размера на експанзията

## **ПРИНОСИ:**

### **Методични**

Въведен и апробиран в България е молекулярно-генетичен метод за потвърждаване на диагнозата миотонична дистрофия, чрез въвеждане на Triplet Repeat Primed - PCR методиката.

### **Научно-теоретични**

За първи път в България е осъществено комплексно изследване на генотип-фенотипните корелации при миотонични дистрофии на базата на комбинирани генетични, клинични, функционални и лабораторни методи.

### **Научно-приложни**

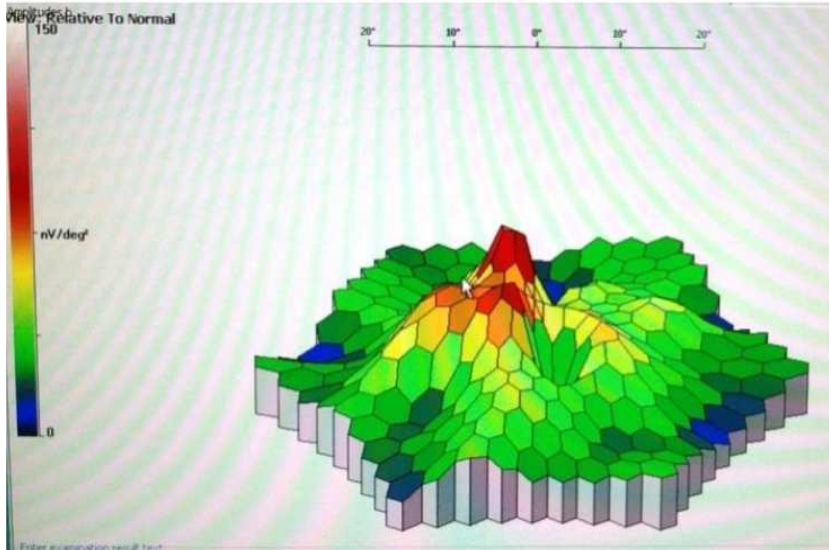
2. Събрана е голяма кохорта от семейства с миотонична дистрофия.
3. Създадена е ДНК банка от всички клинично изследвани семейства, която е основа на настоящите и бъдещи генетични изследвания.
4. Допълнен е диагностичният алгоритъм за насочване за молекулярно-генетично изследване на миотоничните дистрофии в българската популация.
5. Идентифицираните генетични дефекти създават възможност за генетично консултиране на засегнатите семейства, провеждане на генетична профилактика на по-тежките форми, като например вродената форма на МД1 чрез пренатална диагностика в засегнатите семейства.

## ПРИЛОЖЕНИЕ:

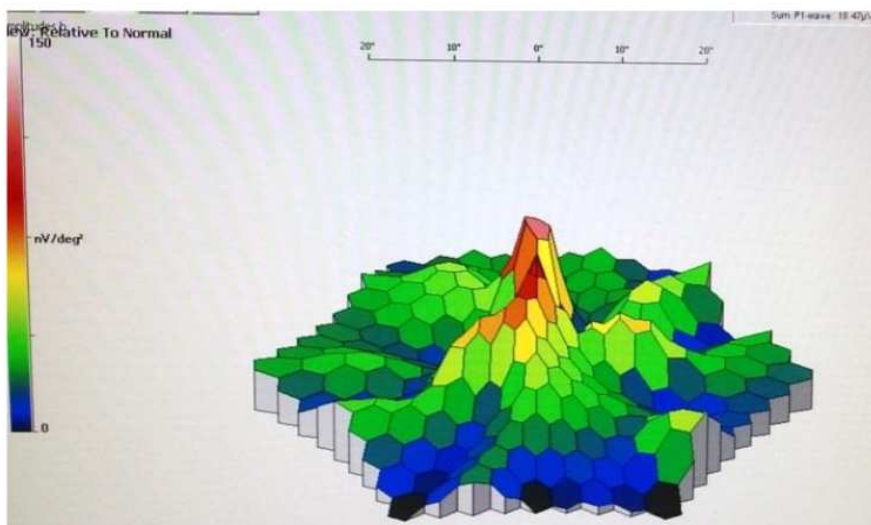
### Приложение №1:

Електроретинограми и биомикроскопии при пациенти с МД.

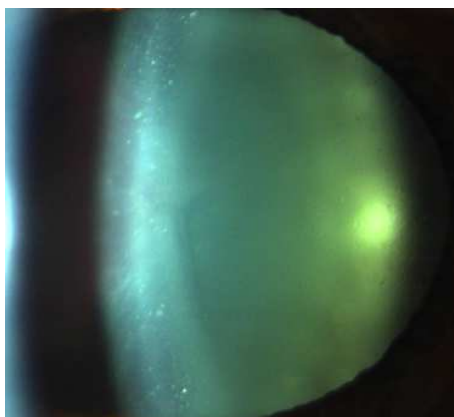
**Фиг.№1** Електроретинограма на ляво око на болен с МД1 и атипичен пигментен ретинит.



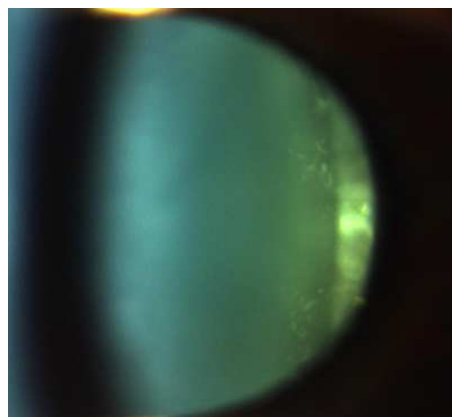
**Фиг.№2** Електроретинограма на дясно око на болен с МД1 и атипичен пигментен ретинит.



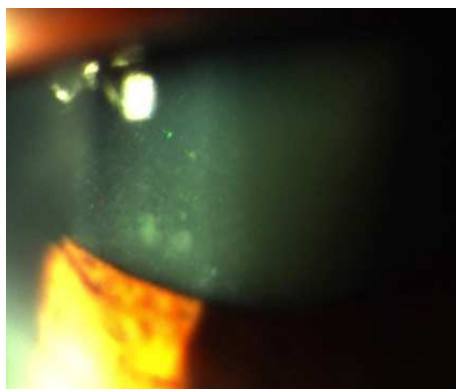
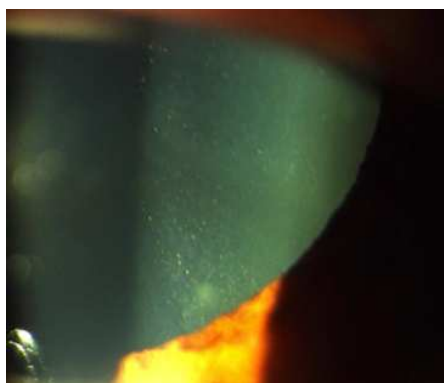
**Снимка № 1 Пациент с МД1  
с катаракта тип иридесцентен  
прах (“iridescent dust”)**



**Снимка № 2 Пациент с МД1  
със задна субкапсуларна  
катаракта**



**Снимки № 3 и 4 Пациенти с МД2 и с  
катаракта тип иридесцентен прах**



## Приложение № 2:

### Генотип-фенотип характеристики при МД1 пациенти:

1. Пациент на 48г. с МД1. Генотип: 500 СТG повтора; фенотип: с изразена хипомимия, птоза, слабост, хипотрофии и миотония в горни крайници дистално (Снимки № 1 и 2).

Снимка № 1.



Снимка № 2.



2. Пациентка на 48г. с МД1. Генотип: 650-670 СТG повтора, с данни замозаицизъм; фенотип: с изразена хипомимия, птоза, слабост, хипотрофии в долни крайници предимно дистално (Снимки № 3 и 4).

Снимка № 3.



Снимка № 4.



3. Семейство с МД1 – П1-чичо, 35г. (сн.№5, 6, 7, 8, 9) и П2-племенник, 18г. (сн.№10, 11).  
Генотип: при П1- 85->800 СТГ повтора, с данни за мозаицизъм; при П2- 250-<800 СТГ, мозаицизъм; фенотип: при П1 с изразена хипомимия, птоза, слабост, хипотрофии в четирите крайника, проксимално и дистално, лумбална хиперлордоза; при П2 хипомимия, слабост и хипотрофии в долни крайници дистално.

Снимка № 5.



Снимка № 6.



Снимка № 7.



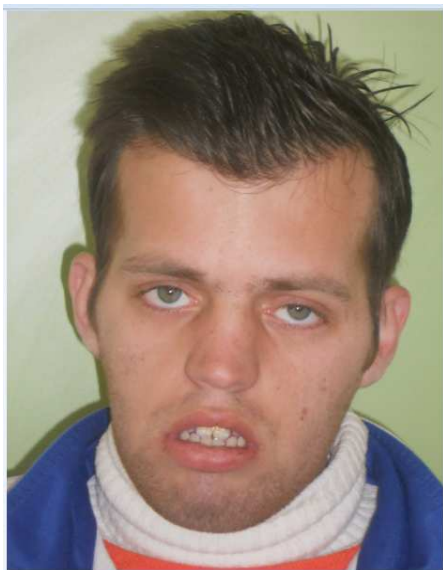
Снимка № 8.



Снимка № 9.



**Снимка № 10.**



**Снимка № 11.**



**4. Семейство с МД1: П1-баба, 59г. ( сн.№12, 13), П2- дъщеря, 39г. (сн.№14, 15, 16), П3-внук, 18г. (сн.№17, 18, 19). Генотип: при П1 100-300СТG, с данни за мозаицизъм, П2-450СТG, П3-100->800СТG (мозаицизъм); фенотип: П1- с изразена хипомимия, птоза, генерализирана слабост и хипотрофии; П2-умерено изразена хипомимия, лека птоза, слабост и леко набелязани хипотрофии в четирите крайника дистално; П3- изразена хипомимия, умерена птоза, генерализирана слабост и хипотрофии.**

**Снимка № 12.**



**Снимка № 13.**



**Снимка № 14.**



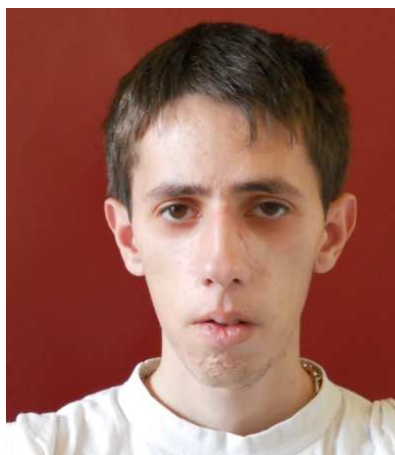
**Снимка № 15.**



**Снимка № 16.**



**Снимка № 17.**



**Снимка № 18.**



**Снимка № 19.**



### Приложение № 3

#### СКАЛА НА WALTON ЗА ОЦЕНКА НА СТЕПЕНТА НА ИНВАЛИДИЗАЦИЯ

| <b>Степен на инвалидизация</b> | <b>Клинични прояви</b>   |
|--------------------------------|--|
| 0 степен                       | Клинично асимптомен. Нормален неврологичен статус  |
| 1 степен                       | Съхранена походка. Трудности при бягане  |
| 2 степен                       | Промени в позата и походката. Изкачване на стълби без помощни средства   |
| 3 степен                       | Изкачване на стълби само с подкрепа на парапет   |
| 4 степен                       | Придвижване без помощни средства. Невъзможно изкачване на стълби   |
| 5 степен                       | Придвижване без помощни средства. Невъзможно изправяне от седнало положение                                      |
| 6 степен                       | Невъзможно придвижване без помощни средства – бастун, патерици   |
| 7 степен                       | Невъзможна самостоятелна походка. Съхранен самостоятелен прием на течности и твърда храна. Седи изправен на стол |
| 8 степен                       | Съхранено седене на стол без подкрепа. Неспособност за прием на течности от чаша без чужда помощ                 |
| 9 степен                       | Неспособност за седене изправен на стол, за прием на течности и твърда храна без чужда помощ                     |
| 10 степен                      | Прикован на легло. Изисква помощ за ежедневни активности   |

## ЛИТЕРАТУРА:

9. Бориславова В., Шопова А, Гергелчева В, Търнев И, Чернинкова С. Невро-офтальмологични симптоми при миотонична дистрофия. Български офталмологичен преглед. 2011; 3, 23-28.
10. Борисова Ц, Подбор и валидиране на методи за молекулна диагностика при миотонична дистрофия, дипломна работа, Биологически факултет, Катедра Генетика, СУ „Св.Климент Охридски“, 2014.
11. Гергелчева В, Чамова Т, Ваврек Е, Мондешки Ц, Билуков Р, Рафаилова Хр, Георгиев О, Переновска П, Търнев И. Неинвазивна вентилация за дихателна слабост при невромускулни заболявания. XII национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие. Слънчев бряг, 2011.
12. Господинова М, Денчев С., Търнев И., Сърдечно засягане при мускулни дистрофии, Българска кардиология, 2012, т.XVIII, №4,5-13.
13. Литвиненко И., Алгоритъм за решаване на диференциално-диагностични задачи в областта на невромускулните заболявания в детска възраст, Мединфо, 2010, брой 8, 1-5
14. Чамова Т., Райчева М, Търнев И., Когнитивни нарушения при миотонични дистрофии тип Steinert и Promm. Генотип-фенотип корелации. Българска Неврология, 2009, 9, 4, 187-193.
15. Янков. Я., Дистрофична миотония /клиника, етиология, патогенеза и нозологичен проблем/, Автореферат на дисертационен труд, Медицинска академия – София, 1977
16. Achiron A., Barak Y, Magal N, Abnormal liver test results in myotonic dystrophy , Journal of Clinical Gastroenterology:1998, vol. 26, 292-295

17. Aitkens S, Kilmer DD, Wright NC, McCrory MA. Metabolic syndrome in neuromuscular disease. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2005;86(5):1030–1036
18. Akiyama M, Yuza Y, Yokokawa Y, Yokoi K, Ariga M, Eto Y. Differences in CTG triplet repeat expansion in leukemic cells and normal lymphocytes from a 14-year-old female with congenital myotonic dystrophy. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;51:563–565
19. Amber C. Louprasong, Dennis J. Light, Rebecca S. Diller; Spider dystrophy as an ocular manifestation of myotonic dystrophy; *Optometry - Journal of the American Optometric Association*, 2010, vol.81, 188-193.
20. Annane D, Moore DH, Barnes PR, Miller RG. Psychostimulants for hypersomnia (excessive daytime sleepiness) in myotonic dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;3:CD003218
21. Antonini G, Clemenzi A, Bucci E, et al. Hypogonadism in DM1 and its relationship to erectile dysfunction. *Journal of Neurology*. 2011;258(7):1247–1253
22. Antonini G, Mainero C, Romano A, Giubilei F, Ceschin V, Gragnani F, et al. Cerebral atrophy in myotonic dystrophy: a voxel based morphometric study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75:1611–1613.
23. Antonini G, Soscia F, Giubilei F, De Carolis A, et al. Health-related quality of life in myotonic dystrophy type 1 and its relationship with cognitive and emotional functioning. *J Rehabil Med*. 2006;38:181–185.
24. Anvret M, Ahlberg G, Grandell U, et al, “Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy,” *Human Molecular Genetics*, 1993,vol. 2,1397–1400.
25. Argov Z, de Visser M. What we do not know about pregnancy in hereditary neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord*. 2009;19:675–679

26. Arsenault ME, Prevost C, Lescault A, Laberge C, Puymirat J, Mathieu J. Clinical characteristics of myotonic dystrophy type 1 patients with small CTG expansions. *Neurology*. 2006;66:1248–1250
27. Ashizawa T, Anvret M, Baiget M, “Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy,” *American Journal of Human Genetics*,1994, vol. 54, 414–423.
28. Ashizawa T, Baiget M. New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1. The international myotonic dystrophy consortium (IDMC). *Neurology* 2000; 54(6): 1218–1221.
29. Ashizawa T, Dubel J.R, and Y. Harati, “Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy,” *Neurology*,1993, vol. 43, 2674–2678.
30. Ashizawa T, Dunne P.W, P. A. Ward, W. K. Seltzer, and C. S. Richards, “Effects of the sex of myotonic dystrophy patients on the unstable triplet repeat in their affected offspring,” *Neurology*, 1994,vol. 44,120–122.
31. Ashizawa T, Epstein HF. Ethnic distribution of myotonic dystrophy gene. *Lancet*.,1991, 338:642–643.
32. Auvinen S, Suominen T, Hannonen P. et al. Myotonic dystrophy type 2 found in two of sixty-three persons diagnosed as having fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 2008;58:3627–3631
33. Awater C, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S. Pregnancy course and outcome in women with hereditary neuromuscular disorders: comparison of obstetric risks in 178 patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;162:153–159
34. Axford M.M, A. López-Castel, M. Nakamori, C. A. Thornton, and C. E. Pearson, “Replacement of the myotonic dystrophy type 1 CTG repeat with ‘non-CTG repeat’ insertions in specific tissues,” *Journal of Medical Genetics*, 2011,vol. 48,438–443.
35. Azurdia RM, Verbov JL., Myotonic dystrophy and basal cell carcinoma: a true association?, *Br J Dermatol*., 1999;141(5):941-942

36. Bachinski LL, Udd B, Meola G, et al. Confirmation of the type 2 myotonic dystrophy (CCTG)<sub>n</sub> expansion mutation in patients with proximal myotonic myopathy/proximal myotonic dystrophy of different European origins: a single shared haplotype indicates an ancestral founder effect. *Am J Hum Genet.* 2003;73:835–848
37. Bae JS, Kim OK, Kim SJ, Kim BJ. Abnormalities of nerve conduction studies in myotonic dystrophy type 1: primary involvement of nerves or incidental coexistence? *J Clin Neurosci.* 2008;15:1120–1124
38. Barcelo J.M, Mahadevan M.S, Tsilfidis C, MacKenzie A.C, Korneluk R.G, “Intergenerational stability of the myotonic dystrophy protomutation,” *Human Molecular Genetics*, 1993, vol. 2, 705–709
39. Bassez G, Lazarus A, Desguerre I, Varin J, Laforet P, Becane HM, Meune C, Arne-Bes MC, Ounnoughene Z, Radvanyi H, Eymard B, Duboc D. Severe cardiac arrhythmias in young patients with myotonic dystrophy type 1. *Neurology.* 2004;63:1939–1941.
40. Begemann G, Paricio N, Artero R, Kiss I, Perez-Alonso M, Mlodzik M. Muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in drosophila, encodes novel nuclear, 1997, 124, pp 4321-4331
41. Bellini M, Alduini P, Costa F, Tosetti C, Pasquali L, Pucciani F, Tornar A, Mammini C, Siciliano G, Maltinti G, Marchi S. Gastric emptying in myotonic dystrophic patients. *Dig Liv Dis* 2002; 34: 484-488.
42. Bellini M, Biagi S, Stasi C, Costa F, Mumolo MG, Ricchiuti A, Marchi S. Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy. *World J Gastroenterol.* 2006;12:1821–1828.
43. Bellini M, Marchi S, Costa F, Spataro M, Siciliano G, Tumino E, Belcari C, Tornar A, Alduini P, Rossi B, Maltinti G. Altered gallbladder motility in myotonic dystrophy: assessment by functional ultrasound technique. *Neurogastroenterologia* 1995; 14-19

44. Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 2000; 80: 1215–1265.
45. Bergoffen, J., Kant, J., Sladky, J., McDonald-McGinn, D., Zackai, E. H. & Fischbeck, K. H., Paternal transmission of congenital myotonic dystrophy. *J Med Genet*, 1994,31,518-520
46. Berry, J. K., Vitalo, C. A., Larson, J. L., Patel, M. and Kim, M. J., Respiratory muscle strength in older adults. *Nurs. Res.*, 1996,45, 154-159
47. Bertuzzi F, Davalli AM, Nano R, et al. Mechanisms of coordination of Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic islet cells. *Diabetes*. 1999;48(10):1971–1978.
48. Bhat S, Sander HW, Grewal RP, Chokroverty S. Sleep disordered breathing and other sleep dysfunction in myotonic dystrophy type 2. *Sleep Med*. 2012;13:1207–1208.
49. Björntorp P, Rosmond R. The metabolic syndrome—a neuroendocrine disorder? *British Journal of Nutrition*. 2000;83(1):S49–S5.
50. Black D.L, Grabowski P.J, Alternative pre-mRNA splicing and neuronal function, Regulation of alternative splicing, *Progress in Molecular and Subcellular Biology*,2003, vol. 31,187-216.
51. Bogaard, J. M., van der Meché, F. G., Hendriks, I. and Ververs, C., Pulmonary function and resting breathing pattern in myotonic dystrophy, *Lung*,1992,170,143-153.
52. Bortolotti M. Idiopathic dyspepsia: a pathophysiological rebus. *Neurogastroenterologia* 1996; 2: 121-127
53. Bouchard G, Roy R, Declos M, Mathieu J, Kouladjian K. Origin and diffusion of the myotonic dystrophy gene in the Saguenay region (Quebec) *Can J Neurol Sci*. 1989;16:119–122
54. Braida C, Stefanatos R.K.A, B. Adam et al., “Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational

- dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients,” *Human Molecular Genetics*, 2010, vol. 19, 1399–1412.
55. Breton R, Mathieu J. Usefulness of clinical and electrocardiographic data for predicting adverse cardiac events in patients with myotonic dystrophy. *Can J Cardiol.* 2009;25:e23–27.
  56. Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hühne J, Rolf B, “Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat,” *American Journal of Human Genetics*, 1998, vol. 62, 1408–1415.
  57. Brook J.D, M.E. McCurrach, H.G. Harley et al., “Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member,” *Cell*, 1992, vol. 68, 799–808.
  58. Brouwer JR, Willemsen R, Oostra BA. Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays.* 2009;31:71–83
  59. Brunner H.G, Bruggenwirth H.T, Nillesen W, “Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM), ” *American Journal of Human Genetics*, 1993, vol. 53, 1016–1023.
  60. Brunner H.G, Jansen G, W. Nillesen et al., “Brief report: reverse mutation in myotonic dystrophy,” *New England Journal of Medicine*, 1993, vol. 328, 476–480.
  61. Canavese F, Sussman MD. Orthopaedic manifestations of congenital myotonic dystrophy during childhood and adolescence. *J Pediatr Orthop.* 2009;29:208–213
  62. Caramia F, Mainero C, Gagnani F, Tinelli E, Fiorelli M, Ceschin V, et al. Functional MRI changes in the central motor system in myotonic dystrophy type 1. *Magn Reson Imaging.* 2010;28:226–234.

63. Cergnet M, Tapos D, Serajee FJ, Mahbulul Huq AH. Homozygous myotonic dystrophy with craniosynostosis. *J Child Neurol*. 2008;23:930–933.
64. Chebel S, Ben Hamda K, Boughammoura A, Frih Ayed M, Ben Farhat MH. *Rev Neurol (Paris)*. 2005;161:932–939
65. Chen H.Y, Kathirvel P, Yee W.C, Lai P.S. Correction of dystrophin myotonia type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Ther* 2009; 16(2): 211–217.
66. Chokroverty S, Bhat S, Rosen D, Farheen A. REM behavior disorder in myotonic dystrophy type 2. *Neurology*. 2012;78:2004;
67. Chong S.S, E. Almqvist, H. Telenius et al., “Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington disease: evidence from single sperm analyses,” *Human Molecular Genetics*,1997, vol. 6,301–309.
68. Ciafaloni E, Mignot E, Sansone V, Hilbert JE, Lin L, Lin X, et al. The hypocretin neurotransmission system in myotonic dystrophy type 1. *Neurology*.2008;70:226–230
69. Cigliano B, Baltogiannis N, De Marco M, Faviou E, Settini A, Tilemis S, Soutis M, Papandreou E, D'Agostino S, Fabbro MA. Pilomatricoma in childhood: a retrospective study from three European paediatric centres. *Eur J Pediatr*. 2005;164:673–677.
70. Cobo A.M, Poza J.J, Martorell L, Lopez de Munain A, Emparanza J.I, Baiget M. Contribution of molecular analyses to the estimation of the risk of congenital myotonic dystrophy. *J Med Genet*. 1995;32:105–108.
71. Colleran J.A, Hawley R.J, Pinnow E.E, Kokkinos P.F, Fletcher R.D. Value of the electrocardiogram in determining cardiac events and mortality in myotonic dystrophy. *Am J Cardiol*. 1997;80:1494–1497.

72. Cooper T.A. A reversal of misfortune for myotonic dystrophy? *N Engl J Med.* 2006;355:1825–1827.
73. Costantini M, Zaninotto G, Anselmino M, Marcon M, Iurilli V, Boccu C, Feltrin GP, Angelini C, Ancona E. Esophageal motor function in patients with myotonic dystrophy. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2032-2038.
74. Cudia P, Bernasconi P, Chiodelli R, Mangiola F, Bellocchi F, Dello Russo A, Angelini C, Romeo V, Melacini P, Politano L, Palladino A, Nigro G, Siciliano G, Falorni M, Bongiorni MG, Falcone C, Mantegazza R, Morandi L. Risk of arrhythmia in type I myotonic dystrophy: the role of clinical and genetic variables. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80:790–793
75. Dansithong W, Wolf C, Sarkar P, Paul S, Chiang A, Holt I, Morris G.E, Branco D, Sherwood M.C, Comai L, Berul C.I, Reddy S, Cytoplasmic CUG RNA foci are insufficient to elicit key DM1 Features, 2008 ,DOI: 10.1371/journal.pone.000396
76. Dauvilliers Y.A, Laberge L. Myotonic dystrophy type 1, daytime sleepiness and REM sleep dysregulation. *Sleep Med Rev.* 2012,16:539–545
77. Davis B.M, McCurrach M.E, Taneja K.L, Singer R.H, Housman D.E, Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94:7388–393
78. Day J.W, Ranum LP. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 2005;15:5–16
79. Day J.W, Ricker K, Jacobsen JF, Rasmussen LJ, Dick KA, Kress W, Schneider C, Koch MC, Beilman GJ, Harrison AR, Dalton JC, Ranum LP. Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology.* 2003;60:657–664.

80. Day J.W, Roelofs R, Leroy B, Pech I, Benzow K, Ranum LP. Clinical and genetic characteristics of a five-generation family with a novel form of myotonic dystrophy (DM2). *Neuromuscul Disord.* 1999;9:19–27.
81. De Die-Smulders C. E., Höweler, C. J., Thijs, C., Mirandolle, J. F., Anten, H. B., Smeets, H. J., Chandler, K. E. and Geraedts, J. P., Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy. *Brain*, 1998,121, 1557-1563
82. De Die-Smulders C.E.M, Smeets H.J.M, W. Loots et al., “Paternal transmission of congenital myotonic dystrophy,” *Journal of Medical Genetics*, 1997,vol. 34,930–933.
83. De Die-Smulders, C.E.M, Congenital and childhood-onset myotonic dystrophy. *Myotonic dystrophy: present management, future therapy.* New York, Oxford University Press,2004
84. De Swart B.J, van Engelen B.G, van de Kerkhof J.P, Maassen B.A. Myotonia and flaccid dysarthria in patients with adult onset myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75:1480–1482
85. De Temmerman N, Sermon K, Seneca S, “Intergenerational instability of the expanded CTG repeat in the DMPK gene: studies in human gametes and preimplantation embryos,” *American Journal of Human Genetics*, 2004, vol.75,325–329.
86. Delaporte C., “Personality patterns in patients with myotonic dystrophy,” *Archives of Neurology*, 1998,vol. 55, 635–640.
87. Dello Russo A, Pelargonio G, Parisi Q, Santamaria M, Messano L, Sanna T, Casella M, De Martino G, De Ponti R, Pace M, Giglio V, Ierardi C, Zecchi P, Crea F, Bellocchi F. Widespread electroanatomic alterations of right cardiac chambers in patients with myotonic dystrophy type 1. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006,17:34–40
88. Dhaenens C.M, Schraen-Maschke S, Tran H, Vingtdeux V, Ghanem D,

- Leroy O, et al. Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp Neurol.* 2008;210:467–478
89. Di Costanzo A, Di Salle F, Santoro L, Bonavita V, Tedeschi G. T2 relaxometry of brain in myotonic dystrophy. *Neuroradiology.* 2001;43:198–204.
90. Dickinson C.J, Chronic fatigue syndrome–aetiological aspects. *Eur J Clin Invest.* 1997;27:257–267.
91. Douniol M, Jacquette A, Cohen D, Bodeau N, Rachidi L, Angeard N, Cuisset JM, Vallée L, Eymard B, Plaza M, Héron D, Guilé JM. Psychiatric and cognitive phenotype of childhood myotonic dystrophy type 1. *Dev Med Child Neurol.* 2012;54:905–911
92. Echenne B., A. Rideau, A. Roubertie, G. Sébire, F. Rivier, and B. Lemieux, “Myotonic dystrophy type I in childhood. Long-term evolution in patients surviving the neonatal period,” *European Journal of Paediatric Neurology*, 2008,vol. 12,210–223.
93. Ekström A.B, Hakenäs-Plate L, Samuelsson L, Tulinius M, Wentz E. Autism spectrum conditions in myotonic dystrophy type 1: a study on 57 individuals with congenital and childhood forms. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B:918–922.
94. Ekström A.B, Hakenäs-Plate L, Tulinius M, Wentz E. Cognition and adaptive skills in myotonic dystrophy type 1: a study of 55 individuals with congenital and childhood forms. *Dev Med Child Neurol.* 2009;51:982–990.
95. Ekström A.B, Tulinius M, Sjöström A, Aring E. Visual function in congenital and childhood myotonic dystrophy type 1. *Ophthalmology.* 2010;117:976–982.
96. Ercolin B, Sassi FC, Mangilli LD, Mendonça LI, Limongi SC, de

- Andrade CR. Oral motor movements and swallowing in patients with myotonic dystrophy type 1. *Dysphagia*. 2013;28:446–454.
97. Fardaei M, Rogers MT, Thorpe HM, Larkin K, Hamshere MG, Harper PS, Brook JD. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 2002; 11(7): 805–814.
98. Finsterer J, E. Gharehbaghi-Schnell, C. Stöllberger, K. Fheodoroff, and A. Seiser, “Relation of cardiac abnormalities and CTG-repeat size in myotonic dystrophy,” *Clinical Genetics*, 2001, vol. 59, 350–355.
99. Fiszler A, Krzyzosiak WJ. RNA toxicity in polyglutamine disorders: concepts, models, and progress of research. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91:683–691
100. Fodil, R., Lofaso, F., Annane, D., Falaise, L., Lejaille, M., Raphaël, J. C., Isabey, D. and Louis, B. Upper airway calibre and impedance in patients with Steinert’s myotonic dystrophy. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2004, 144, 99-107
101. Fortune M.T, C. Vassilopoulos, M. I. Coolbaugh, M. J. Siciliano, and D. G. Monckton, “Dramatic, expansion-biased, age-dependent, tissue-specific somatic mosaicism in a transgenic mouse model of triplet repeat instability,” *Human Molecular Genetics*, 2000, vol. 9, 439–445.
102. Franc D.T, Muetzel R.L, Robinson P.R, Rodriguez C.P, Dalton J.C, Naughton C.E, Mueller B.A, Wozniak J.R, Lim K.O, Day J.W. Cerebral and muscle MRI abnormalities in myotonic dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2012;22:483–491
103. Franzini M, Fornaciari I., Siciliano G., Serum gamma-glutamyltransferase fractions in myotonic dystrophy type 1- differences with healthy subjects and patients with liver diseases, *Clinical Biochemistry*, 2010 ;43(15):1246-1248.

104. Frisch R, Singleton K.R, Moses P.A, Gonzalez I.L, Carango P, Marks H.G, et al: Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy. *Mol Genet Metab* 2001,74:281–291.
105. Fu Y.H, A. Pizzuti, R. G. Fenwick et al., “An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy,” *Science*, 1992,vol. 255,1256–1258.
106. Gacy A.M, Goellner G, Juranic N, Macura S, McMurray C.T, “Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro,” *Cell*, 1995,vol. 81, 533–540.
107. Gadalla S.M, Lund M, Pfeiffer RM, Gørtz S, Mueller CM, Moxley RT, Kristinsson SY, Björkholm M, Shebl FM, Hilbert JE, Landgren O, Wohlfahrt J, Melbye M, Greene MH. Cancer risk among patients with myotonic muscular dystrophy. *JAMA*. 2011;306:2480–2486.
108. Gagnon C, Chouinard MC, Laberge L, Brisson D, Gaudet D, Lavoie M, Leclerc N, Mathieu J. Prevalence of lifestyle risk factors in myotonic dystrophy type 1. *Can J Neurol Sci*. 2013;40:42–47.
109. Gatchel J.R, H. Y. Zoghbi, “Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles,” *Nature Reviews Genetics*, 2005,vol. 6,743–755.
110. Gaul C, Schmidt T, Windisch G, Wieser T, Müller T, Vielhaber S, et al. Subtle cognitive dysfunction in adult onset myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2) *Neurology*. 2006;67:350–352.
111. Geh J.L, Moss AL. Multiple pilomatrixomata and myotonic dystrophy: a familial association. *Br J Plast Surg*. 1999;52:143–145.
112. Gennarelli M, Novelli G, Andreasi Bassi F et al., “Prediction of myotonic dystrophy clinical severity based on the number of intragenic [CTG]<sub>n</sub> trinucleotide repeats,” *American Journal of Medical Genetics*, 1996, vol. 65,342–347.

113. George A, Schneider-Gold C, Zier S. et al. Musculoskeletal pain in patients with myotonic dystrophy type 2. *Arch Neurol.* 2004;61:1938–42.
114. Ghanem D, Tran H, Dhaenens CM, Schraen-Maschke S, Sablonnière B, Buée L, et al. Altered splicing of Tau in DM1 is different from the foetal splicing process. *FEBS Lett.* 2009;583:675–679
115. Gharehbaghi-Schnell E.B, Finsterer J, Korschineck I, et al. Genotype–phenotype correlation in myotonic dystrophy. *Clin Genet* 1998;53:20–26
116. Giraudet S., Graaf A., Lamirel C., Péniisson I., Cochereau I. and Milea D.; Pigmentary retinal degeneration in myotonic dystrophy; *Neuro-Ophthalmology* 2010 34:3 SUPPL. 92 (190).
117. Giubilei F, Antonini G, Bastianello S, Morino S, Paolillo A, Fiorelli M, et al. Excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy. *J Neurol Sci.* 1999;164:60–63.
118. Goldberg Y.P, Kremer B, Andrew S.E et al., “Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects,” *Nature Genetics*, 1993, vol. 5, 174–179.
119. Gomes-Pereira M, Fortune M.T, Ingram L, McAbney J.P, Monckton D.G, “Pms2 is a genetic enhancer of trinucleotide CAG-CTG repeat somatic mosaicism: implications for the mechanism of triplet repeat expansion,” *Human Molecular Genetics*, 2004, vol. 13, 1815–1825.
120. Gomes-Pereira M., Cooper T. A. and Gourdon, G. Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development. *Trends Mol. Med.*, 2011, 17, 506-517.
121. Gomez Saez JM, Fernandez Real JM, Fernandez Castaner M, Navarro Moreno MA, Martinez Matos JA, Soler Ramon J. Study on growth hormone and insulin secretion in myotonic dystrophy. *Clinical Investigator.* 1994;72(7):508–511
122. Griggs RC, Halliday D, Kingston W, Moxley RT. Effect of testosterone

- on muscle protein synthesis in myotonic dystrophy. *Annals of Neurology*. 1986;20(5):590–596.
123. Groh W.J, Groh M.R, Shen C, Monckton D.G, Bodkin C.L, Pascuzzi R.M, “Survival and CTG repeat expansion in adults with myotonic dystrophy type 1,” *Muscle and Nerve*, 2011, vol. 43, 648–651.
124. Groh, W. J., Groh, M. R., Saha, C., Kincaid, J. C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R. F., Bhakta, D., Nair, G. V. et al., *Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1*. *N. Engl. J. Med.*, 2008,358, 2688-2697.
125. Hamshere M.G, Harley H, Harper P, et al. Myotonic dystrophy: the correlation of (CTG) repeat length in leucocytes with age at onset is significant only for patients with small expansions. *J Med Genet* 1999;36:59–61
126. Harley H.G, Rundle S. A , MacMillan J.C et al., “Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy,” *American Journal of Human Genetics*,1993, vol. 52,1164–1174.
127. Harper P.S. *Myotonic Dystrophy* 3rd edn. London, UK: W.B. Saunders; 2001
128. Heatwole C, Johnson N, Goldberg B, Martens W, Moxley III R, *Laboratory abnormalities in patients with myotonic dystrophy type 2*, *Arch Neurol.*,2011; 68(9): 1180-1184.
129. Heatwole C.R, Miller J, Martens B, Moxley RT. *Laboratory abnormalities in ambulatory patients with myotonic dystrophy type 1*. *Arch Neurol.*2006;63:1149–1153
130. Hermans M.C, Faber C.G, Vanhoutte EK, Bakkers M, De Baets MH, de Die-Smulders CE, Merkies IS, *Peripheral neuropathy in myotonic dystrophy type 1*, *J Peripher Nerv Syst*. 2011,16(1):24-29
131. Higham C.F, Morales F, Cobbold C.A, Haydon D.T, Monckton D.G,

- “High levels of somatic DNA diversity at the myotonic dystrophy type 1 locus are driven by ultra-frequent expansion and contraction mutations,” *Human Molecular Genetics*, 2012, vol. 21, 2450–2463.
132. Hilton-Jones D. Myotonic dystrophy—forgotten aspects of an often neglected condition. *Curr Opin Neurol*. 1997;10:399–401;
133. Ho H.T., Charlet N, Poulos M.G, Singh G, Swanson M.S, Cooper T.A, Muscleblind proteins regulate alternative splicing, *The EMBO Journal*, 2004, vol.23,3103-3112
134. Horowitz M, Maddox A, Maddern GJ, Wishart J, Collins PJ, Shearman DJ. Gastric and esophageal emptying in dystrophia myotonica. Effect of metoclopramide. *Gastroenterology* 1987; 92: 570-577
135. Hsiao K.M, Chen S.S, Li S.Y et al., “Epidemiological and genetic studies of myotonic dystrophy type 1 in Taiwan,” *Neuroepidemiology*,2003, vol. 22, 283–289.
136. Huichalaf C, Schoser B, Schneider□Gold C, Jin B, Sarkar P, Timchenko L. Reduction of the rate of protein translation in patients with myotonic dystrophy 2. *J Neurosci* 2009; 29(28): 9042□9049.
137. Hund E, Jansen O, Koch MC, Ricker K, Fogel W, Niedermaier N, et al. Proximal myotonic myopathy with MRI white matter abnormalities of the brain. *Neurology*. 1997;48:33–37.
138. International Myotonic Dystrophy Consortium. New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1).
139. Itoh K, Mitani M, Kawamoto K, Futamura N, Funakawa I, Jinnai K, et al. Neuropathology does not correlate with regional differences in the extent of expansion of CTG repeats in the brain with myotonic dystrophy type 1. *Acta Histochem Cytochem*. 2010;43:149–156
140. Jamme Y., Buchler, B., Delpierre, S., Rasidakis, A., Grimaud, C. and Roussos, C. Phrenic afferents and their role in inspiratory control. *J. Appl. Physiol.*, 1986,60, 854-860.

141. Jammes, Y., Pouget, J., Grimaud, C. and Serratrice, G. Pulmonary function and electromyographic study of respiratory muscles in myotonic dystrophy. *Muscle Nerve*, 1985, 8, 586-594.
142. Jansen G., Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nature Genet.* 1996,13, 316–324.
143. Jansen G, Willems P, Coerwinkel et al., “Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)(n) repeat variation and selection against extreme expansion in sperm,” *American Journal of Human Genetics*,1994, vol. 54, 575–585
144. Jeffreys A.J, Tamaki K, MacLeod A, Monckton D.G, Neil D.L, Armour J. A. L., “Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites,” *Nature Genetics*, 1994,vol. 6,136–145.
145. Jiang H, Mankodi A, Swanson MS, Moxley RT, Thornton CA. Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet.* 2004;13:3079–3088.
146. Kaliman P., Llagostera E.; Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1 ; *Cellular Signalling*, Volume 20, Issue 11, November 2008,1935-1941.
147. Kalkman J.S, Schillings ML, van der Werf SP, Padberg GW, Zwarts MJ, van Engelen BG, et al. Experienced fatigue in facioscapulohumeral dystrophy, myotonic dystrophy, and HMSN-I. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76:1406–1409.
148. Kaminsky P., Lesesve JF, Jonveaux P, Pruna L, IgG deficiency and expansion of CTG repeats in myotonic dystrophy, *Clin. Neurol.Neurosurg.* 2011,113(6):464-468.
149. Kanadia R.N, Johnstone K.A, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, Esson D, Timmers AM, Hauswirth WW, Swanson MS. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science.* 2003;302:1978–1980.

150. Kanadia R.N, Shin J, Yuan Y, Beattie S.G, Wheeler T.M, Thornton C.A, Swanson M.S. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(31): 11748–11753
151. Kassubek J, Juengling FD, Hoffmann S, Rosenbohm A, Kurt A, Jurkat-Rott K, et al. Quantification of brain atrophy in patients with myotonic dystrophy and proximal myotonic myopathy: a controlled 3-dimensional magnetic resonance imaging study. *Neurosci Lett.* 2003;348:73–76.
152. Kaytor M.D, Burright E.N, Duvick L.A, Zoghbi H.Y et al, “Increased trinucleotide repeat instability with advanced maternal age,” *Human Molecular Genetics*, 1997, vol. 6, 2135–2139.
153. Kesler A., Berkner L., Sadeh M., Levite R. and Varssano D.; Is intraocular pressure in myotonic dystrophy patients spuriously low?; *Israel Medical Association Journal* 2008 10:10,699-701
154. Khoshbakht R, Akbar Soltanzadeh, Babak Zamani, Sivamak Abdi, Correlation between distribution of muscle weakness, electrophysiological findings and CTG expansion in myotonic dystrophy, *Journal of Clinical Neurology*,2013
155. Kilburn K. H., Eagan J. T., Sieker, H. O. and Heyman, A. Cardiopulmonary insufficiency i myotonic and progressive muscular dystrophy.*N. Engl. J. Med.*, 1959,261, 1089-1096.
156. Kim U. S., Kim J. S., Hwang J. M.; A case of myotonic dystrophy with pigmentary retinal changes; *Korean JOphthalmol.* 2009,23(2):121-123.
157. Kimizuka Y., Kiyosawa M., Tamai M., Takase S.; Retinal changes in myotonic dystrophy. Clinical and follow-up evaluation; *Retina.* 1993; 13(2):129-135.
158. Kino Y, Mori D, Oma Y, Takeshita Y,Sasagawa N, Ishiura S, Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats, *Human Molecular Genetics*, 2004, 13 (5): 495-507

159. Kirzinger L, Schmidt A, Kornblum C, Schneider-Gold C, Kress W, Schoser B. Side effects of anesthesia in DM2 as compared to DM1: a comparative retrospective study. *Eur J Neurol.* 2010;17:842–845.
160. Klesert T.R, Otten A.D, Bird T.D., Tapscot S.J, Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP, *Nature Genetics*, 1997, 16, 402-406
161. Koch M.C, Grimm T, Harley H.G, Harper P.S, “Genetic risks for children of women with myotonic dystrophy,” *American Journal of Human Genetics*,1991, vol. 48, 1084–1091.
162. Koob M.D, Moseley M. L., Schut L. J et al., “An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia,” *Nature Genetics*,1999, vol. 21, 379–384.
163. Kornblum C, Reul J, Kress W, Grothe C, Amanatidis N, Klockgether T, et al. Cranial magnetic resonance imaging in genetically proven myotonic dystrophy type 1 and 2. *J Neurol.* 2004;251:710–14.
164. Krahe R, Ashizawa T, Abbruzzese C, Roeder E, Carango P, Giacanelli M, Funanage V.L, Siciliano M.J ,*Genomics*, 1995, 28:1–14
165. Krishnan A.V, Kiernan MC. Axonal function and activity-dependent excitability changes in myotonic dystrophy. *Muscle Nerve.* 2006;33:627–636
166. Kuo H.C, Hsieh YC, Wang HM, Chuang WL, Huang CC. Correlation among subcortical white matter lesions, intelligence and CTG repeat expansion in classic myotonic dystrophy type 1. *Acta Neurol Scand.* 2008;117:101–107.
167. Kuyumcu-Martinez N.M, Wang G.S, Cooper T.A, Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation, *Molecular Cell*, 2007, vol. 28, 68–78
168. La Spada A.R,Taylor J.P, “Repeat expansion disease: progress and

- puzzles in disease pathogenesis,” *Nature Reviews Genetics*, 2010, vol. 11, no. 4, 247–258.
169. Laberge L, Bégin P, Dauvilliers Y, Beaudry M, Laforte M, Jean S, et al. A polysomnographic study of daytime sleepiness in myotonic dystrophy type 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009A;80:642–646
170. Laberge L, Dauvilliers Y, Bégin P, Richer L, Jean S, Mathieu J. Fatigue and daytime sleepiness in patients with myotonic dystrophy type 1: to lump or split? *Neuromuscul Disord*. 2009b;19:397–402.
171. Langlois M.A, Boniface C, Wang G, Alluin J, Salvaterra P.M, Puymirat J, Rossi J.J, Lee N.S. Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells. *J Biol Chem* 2005; 280(17): 16949–16954.
172. Lavedan C, H. Hofmann-Radvanyi, P. Shelbourne et al., “Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism,” *American Journal of Human Genetics*, 1993, vol. 52, no. 5, 875–883.
173. Lecointe-Besancon I, Leroy F, Devroede G, Chevrollier M, Lebeurier F, Congard P, Arhan P. A comparative study of esophageal and anorectal motility in myotonic dystrophy. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1090-1099
174. Lee J.E, Cooper T.A., Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem Soc Trans* 2009; 37,1281–1286.
175. Leeflang E.P, Arnheim N, “A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability,” *Human Molecular Genetics*, 1995, vol. 4, no. 1, 135–136.
176. Leroy O, Wang J, Maurage C.A, Parent M, Cooper T, Buée L, et al. Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762:460–467.

177. Lin X, Miller J.W, Mankodi A, Kanadia R.N, Yuan Y, Moxley R.T, Swanson MS, Thornton C.A. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2006; 15(13): 2087–2097
178. Liquori C.L, Ikeda Y, Weatherspoon M, Ricker K, Schoser B.G, Dalton J.C, Day J.W, Ranum L.P. Myotonic dystrophy type 2: human founder haplotype and evolutionary conservation of the repeat tract. *Am J Hum Genet.* 2003;73:849–862
179. Liquori C.L, Ricker K, Moseley M.L, Jacobsen J.F, Kress W, Naylor S.L, Day J.W, Ranum L.P. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 2001;293:864–867.
180. Logigian E.L, Blood CL, Dilek N, et al, Wiegner AW, Thornton CA, Moxley RT. Quantitative analysis of the "warm-up" phenomenon in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve.* 2005;32:35–42
181. Logigian E.L, Martens W.B, Moxley R.T 4th, McDermott M.P, Dilek N, Wiegner A.W, Pearson A.T, Barbieri C.A, Annis C.L, Thornton C.A, Moxley R.T,3rd. Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 2010; 74(18): 1441–8.
182. Machuca-Tzili L., Brook D., Hilton-Jones D. Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve.* 2005;32(1):1–18.
183. Magee A, Nevin NC. The epidemiology of myotonic dystrophy in Northern Ireland. *Community Genet.* 1999;2:179–183
184. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science.* 1992;255,1253–1255.
185. Malter H.E, Iber J. C., Willemsen R et al., "Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes," *Nature Genetics*,1997, vol. 15, no. 2, 65–169.

186. Mamah D, Conturo TE, Harms MP, Akbudak E, Wang L, McMichael AR, et al. Anterior thalamic radiation integrity in schizophrenia: a diffusion-tensor imaging study. *Psychiatry Res.* 2010;183:144–150
187. Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, Krym M, Thornton C.A. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 2000; 289(5485): 1769–1773.
188. Mankodi A, Takahashi M.P, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, Cannon SC, Thornton CA. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell.* 2002;10:35–44
189. Manley K, Shirley T.L, Flaherty L, Messer A, “Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntingtondisease transgenic mice,” *Nature Genetics*,1999, vol. 23, no. 4, 471–473.
190. Marchini C, Lonigro R, Verriello L, Pellizzari L, Bergonzi P, Damante G, “Correlations between individual clinical manifestations and CTG repeat amplification in myotonic dystrophy,” *Clinical Genetics*, 2000,vol. 57, no. 1, 74–82.
191. Markowska E., Zalewska R., Maria Z., Malgorzata W.; Ocular findings in patients with Steinert myotonic dystrophy; *Przegląd Lekarski.*, 2006, 63(8):662-663.
192. Martínez-Rodríguez JE, Lin L, Iranzo A, Genis D, Martí MJ, Santamaria J, et al. Decreased hypocretin-1 (Orexin-A) levels in the cerebrospinal fluid of patients with myotonic dystrophy and excessive daytime sleepiness. *Sleep.* 2003;26:287–290.
193. Martorell L, Johnson K, Boucher C.A, Baiget M, “Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)(n) repeat during human fetal development,” *Human Molecular Genetics*, 1997,vol. 6, no. 6, pp. 877–880.

194. Martorell L, Monckton D.G, Gamez J. et al., “Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients,” *Human Molecular Genetics*, 1998, vol. 7, no. 2, pp. 307–312.
195. Martorell L, Monckton D.G, Sanchez A, Lopez de Munain A, Baiget M, “Frequency and stability of the myotonic dystrophy type 1 premutation,” *Neurology*, 2001, vol. 56, no. 3, pp. 328–335.
196. Martorell L, Monckton DG, Gamez J, Baiget M: Complex patterns of male germline instability and somatic mosaicism in myotonic dystrophy type 1. *Eur J Hum Genet* 2000, 6:423-430
197. Mastrogioacomo I, Bonanni G, Menegazzo E, et al. Clinical and hormonal aspects of male hypogonadism in myotonic dystrophy. *Italian Journal of Neurological Sciences*. 1996;17(1):59–65.
198. Mathieu J, Allard P, Potvin L, Prevost C, Begin P, A 10- year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy, *Neurology* May 1, 1999 vol.52, no.8:1658
199. Matsumura T, Iwahashi H, Funahashi T, et al. A cross-sectional study for glucose intolerance of myotonic dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*. 2009;276(1-2):60–65.
200. Maurage CA, Udd B, Ruchoux MM, Vermersch P, Kalimo H, Krahe R, et al. Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease. *Neurology*. 2005;65:1636–1638.
201. McMurray C.T, “DNA secondary structure: a common and causative factor for expansion in human disease,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, vol. 96,1823–1825.
202. Medica I, Markovic D, Peterlin B. Genetic epidemiology of myotonic dystrophy in Istria, Croatia. *Acta Neurol Scand*. 1997;95:164–166
203. Meola G, Sansone V, Marinou K, Cotelli M, Moxley RT, Thornton CA,

- De Ambroggi L. Proximal myotonic myopathy: a syndrome with a favourable prognosis? *J Neurol Sci.* 2002;193:89–96.
204. Meola G, Sansone V, Perani D, Collelouri A, Cappa S, Dragoni C, et al.: Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic dystrophy (PROMM/DM-2). *Neuromuscul Disord* 2003,10:813-821.
205. Meola G, Sansone V, Perani D, Colleluori A, Cappa S, Cotelli M, Fazio F, Thornton CA, Moxley RT. Reduced cerebral blood flow and impaired visual-spatial function in proximal myotonic myopathy. *Neurology.*1999;53:1042–1050.
206. Meola G, Sansone V, Perani D, Scarone S, Cappa S, Dragoni C, Cattaneo E, Cotelli M, Gobbo C, Fazio F, Siciliano G, Mancuso M, Vitelli E, Zhang S, Krahe R, Moxley RT. Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2). *Neuromuscul Disord.* 2003;13:813–821
207. Meola G, Sansone V. Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve.* 2007;36:294–306.
208. Merino J.L, Carmona JR, Fernandez-Lozano I, Peinado R, Basterra N, Sobrino JA. Mechanisms of sustained ventricular tachycardia in myotonic dystrophy: implications for catheter ablation. *Circulation.* 1998;98:541–546
209. Merlevede K, Vermander D, Theys P, Legius E, Ector H, Robberecht W, “Cardiac involvement and CTG expansion in myotonic dystrophy,” *Journal of Neurology,* 2002, vol. 249, no. 6, pp. 693–698.
210. Messano L, Sanna T, Casella M, De Martino G, De Ponti R, Pace M, Giglio V, Ierardi C, Zecchi P, Crea F, Bellocchi F. Widespread electroanatomic alterations of right cardiac chambers in patients with myotonic dystrophy type 1. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006;17:34–40

211. Miller J.W, Urbinati C.R, Teng □ Umuay P, Stenberg M.G, Byrne B.J, Thornton C.A, Swanson M.S. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 2000; 19(17): 4439 □ 4448.
212. Minnerop M, Luders E, Specht K, Ruhlmann J, Schneider-Gold C, Schröder R, et al. Grey and white matter loss along cerebral midline structures in myotonic dystrophy type 2. *J Neurol.* 2008;255:1904–1909.
213. Minnerop M., Bernd Weber, Cornelia Kornblum: The brain in myotonic dystrophy type 1 and 2 : evidence for a predominant white matter disease, *Brain* 2011, December, 134(12) :3527-3543
214. Minnerop M., Bernd Weber, Cornelia Kornblum: The brain in myotonic dystrophy type 1 and 2 : evidence for a predominant white matter disease, *Brain* 2011, 134(12) :3527-3543.
215. Mirkin S.M, “Expandable DNA repeats and human disease,” *Nature*,2007, vol. 447, 932–940.
216. Mitsuoka T, Watanabe C, Kitamura J, Ishigame K, Nakamura S. Movement-related cortical potentials in myotonic dystrophy. *Clin Neurophysiol.* 2003;114:99–106.
217. Mladenovic J, Pekmezovic T, Todorovic S, et al. Epidemiology of myotonic dystrophy type 1 (Steinert disease) in Belgrade (Serbia) *Clin Neurol Neurosurg.* 2006;108:757–760
218. Mladenovic J., Pekmezovicv T, S. Todorovic et al., “Survival and mortality of myotonic dystrophy type 1 (Steinert's disease) in the population of Belgrade,” *European Journal of Neurology*, 2006, vol. 13, 451–454.
219. Modolell I, Mearin F, Baudet JS, Gamez J, Cervera C, Malagelada JR. Pharyngo-esophageal motility disturbances in patients with myotonic dystrophy. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 878-882.
220. Modoni A, Silvestri G, Pomponi MG, Mangiola F, Tonali PA, Marra C:

- Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol* 2004;61:1943-1947
221. Modoni A, Silvestri G, Vita MG, Quaranta D, Tonali PA, Marra C. Cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1 (DM1): a longitudinal follow-up study. *J Neurol*. 2008;255:1737–1742;
222. Moller D.E, Yokota A, Caro JF, Flier JS. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Molecular Endocrinology*. 1989;3(8):1263–1269.
223. Monckton D.G., Wong L. J. C., Ashizawa T, Caskey C.T, “Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses,” *Human Molecular Genetics*, 1995, vol. 4,1–8.
224. Morales F, Couto J.M, Higham C.F. et al., “Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity,” *Human Molecular Genetics*, 2012, vol. 21, 3558–3567.
225. Mörner S, Lindqvist P, Mellberg C, Olofsson BO, Backman C, Henein M, Lundblad D, Forsberg H. Profound cardiac conduction delay predicts mortality in myotonic dystrophy type 1. *J Intern Med*. 2010;268:59–65.;
226. Moxley R.T 3rd. Proximal myotonic myopathy: mini-review of a recently delineated clinical disorder. *Neuromuscul Disord*. 1996;6:87–93;
227. Moxley R.T, Meola G. The myotonic dystrophies. In: *The Molecular and Genetic Basis of Neurologic and Psychiatric Disease*. Rosenberg RN, DiMauro S, Paulson HL, Ptacek L, Nestler EJ, eds. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer; 2008:532-541.
228. Mueller C.M., Hilbert J.E., Martens W., Thornton C.A., Moxley R.T., III, Greene M.H. Hypothesis: neoplasms in myotonic dystrophy. *Cancer Causes Control*. 2009;20(10):2009–2020
229. Mulders S.A, van den Broek W.J, Wheeler T.M, et al., Triplet-repeat

- oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2009, 18;106(33):13915-13920.
230. Musova Z, Mazanec R, Krepelova A et al., “Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene,” *American Journal of Medical Genetics A*, 2009, vol. 149,1365–1369.
231. Nakagawa, M., Yamada, H., Higuchi, I., Kaminishi, Y., Miki, T., Johnson, K., Osame, M., Joseph, J. T., Richards, C. S., Anthony, D. C., Upton, M., Perez-Atayde, A. R. & Greenstein, P., A case of paternally inherited congenital myotonic dystrophy Congenital myotonic dystrophy pathology and somatic mosaicism. *J Med Genet*, 1994,31, 397- 400
232. Nakamura A, Kojo T, Takeda S, Reduction of serum IgG level and peripheral T-cell counts are correlated with CTG repeat lengths in myotonic dystrophy patients, *Neuromuscul Disord*.1996,6(3):203-210
233. Napierala M., Krzyzosiak W.J, CUG Repeats Present in Myotonin Kinase RNA Form Metastable “Slippery” Hairpins, *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 31079-31085.
234. New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1. The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC), *Neurology* 2000;54:1218-1221;
235. Newman B, Meola G, O'Donovan DG, Schapira AH, Kingston H. Proximal myotonic myopathy (PROMM) presenting as myotonia during pregnancy. *Neuromuscul Disord*. 1999;9:144–149.
236. Nguyen H.H, Wolfe JT, Holmes DR, Edwards WD. Pathology of the cardiac conduction system in myotonic dystrophy: a study of 12 cases. *J Am Coll Cardiol*. 1988;11:662–671.
237. Nowak T.V, Ionasescu V, Anuras S. Gastrointestinal manifestations of the muscular dystrophies. *Gastroenterology* 1982; 82: 800-810.

238. O'Hoy K.L, Tsilfidis C, Mahadevan M.S et al., "Reduction in size of the myotonic dystrophy trinucleotide repeat mutation during transmission," *Science*, 1993,vol. 259, 809–812.
239. Oliveri M, Brighina F, La Bua V, Aloisio A, Buffa D, Fierro B. Magnetic stimulation study in patients with myotonic dystrophy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1997;105:297–301.
240. Ono S, Inoue K, Mannen T, Kanda F, Jinnai K, Takahashi K. Neuropathological changes of the brain in myotonic dystrophy—some new observations. *J Neurol Sci*. 1987;81:301–320.
241. Ono S., Kanda F., Takahashi, K., Fukuoka, Y., Jinnai, K., Kurisaki, H., Mitake, S., Inagaki, T. and Nagao, K., Neuronal loss in the medullary reticular formation in myotonic dystrophy: a clinicopathological study.*Neurology*,1996, 46, 228-231.
242. Ono S, Takahashi K, Jinnai K, Kanda F, Fukuoka Y, Kurisaki H, et al. Loss of catecholaminergic neurons in the medullary reticular formation in myotonic dystrophy. *Neurology*. 1998A;51:1121–1124
243. Ono S, Takahashi K, Jinnai K, Kanda F, Fukuoka Y, Kurisaki H, et al. Loss of serotonin-containing neurons in the raphe of patients with myotonic dystrophy: a quantitative immunohistochemical study and relation to hypersomnia.*Neurology*. 1998b;50:535–538
244. Ota M, Sato N, Ohya Y, Aoki Y, Mizukami K, Mori T, et al., Relationship between diffusion tensor imaging and brain morphology in patients with myotonic dystrophy. *Neurosci Lett*. 2006;407:234–239
245. Otten, A.D., Tapscott, S.J. Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1995; 5465–5469
246. Oyamada R, Hayashi M, Katoh Y, Tsuchiya K, Mizutani T, Tominaga I, et al. Neurofibrillary tangles and deposition of oxidative products in the brain in cases of myotonic dystrophy. *Neuropathology*. 2006;26:107–114.

247. Panaite P., Thierry K., Geneviève G., Johannes A., et al, Functional an histopathological identification of the respiratory failure in a DMSXL transgenic mouse model of myotonic dystrophy, *Dis. Model. Mech.*,2013, vol. 6,622-631
248. Pan-Hammarstrom Q, Wen S., Ghanaat-Pour H., et al., Lack of correlation between the reduction of serum immunoglobulin concentration and the CTG repeat expansion in patients with type 1 dystrophia myotonica, *J. Neuroimmunol.* 2003,144(1-2):100-104
249. Park J.D, Radtke RA. Hypersomnolence in myotonic dystrophy: demonstration of sleep onset REM sleep. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995;58:512–513.
250. Penchovsky R. Engineering Integrated Digital Circuits with Allosteric Ribozymes for Scaling up Molecular Computation and Diagnostics. Department of Genetics, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Synthetic Biology, 2012.
251. Peric S, Stojanovic V.R, Nikolic A, Kacar A, Basta I, Pavlovic S, Lavrnica D, Peripheral neuropathy in patients with myotonic dystrophy type 1, *Neurol Res*,2013;35:331-335.
252. Perini G.I, Menegazzo E, Ermani M, Zara M, Gemma A, Feruzzi E, *et al.*: Cognitive impairment and CTG (n) expansion in myotonic dystrophy patients. *Biol Psychiatry* 1999, 3:425-431.
253. Perseghin G, Caumo A, Arcelloni C, et al. Contribution of abnormal insulin secretion and insulin resistance to the pathogenesis of type 2 diabetes in myotonic dystrophy. *Diabetes Care.* 2003;26(7):2112–2118.
254. Petri H, Vissing J, Witting N, Bundgaard H, Køber L. Cardiac manifestations of myotonic dystrophy type 1. *Int J Cardiol.* 2012;160:82–88
255. Philips A.V, Timchenko LT, Cooper TA. Disruption of splicing regulated

- by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science*. 1998;280:737–741
256. Pincherle A, Patruno V, Raimondi P, Moretti S, Dominese A, Martinelli-Boneschi F, Pasanisi MB, Canioni E, Salerno F, Deleo F, Spreafico R, Mantegazza R, Villani F, Morandi L. Sleep breathing disorders in 40 Italian patients with Myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*. 2012;22:219–224
257. Rakočević-Stojanović V, Savić D, Pavlović S, Lavrnić D, Romac S, Apostolski S, “Correlation between cardiac involvement and CTG repeat amplification in myotonic dystrophy type 1,” *Acta Myologica*, 2003, vol. 22, 26–27.
258. Rakočević-Stojanović V, Pavlović S, Lavrnić D et al., “Peripheral neuropathy in patients with myotonic dystrophy,” *Acta Myologica*, 2002, vol. 21, no. 1, pp. 36–37.
259. Rakocevic-Stojanovic V, Savic D, Pavlovic S, Lavrnic D, Stevic Z, Basta I, Romac S, Apostolski S. Intergenerational changes of CTG repeat depending on the sex of the transmitting parent in myotonic dystrophy type 1. *Eur J Neurol*. 2005;12:236–237
260. Ranum L.P, Day J.W. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet*. 2004;74:793–804.
261. Ranum L.P, Day J.W. Myotonic dystrophy: clinical and molecular parallels between myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2002;2:465–470;
262. Reardon W., Newcombe, R., Fenton, I., Sibert, J. and Harper, P. S., The natural history of congenital myotonic dystrophy: mortality and long term clinical aspects. *Arch. Dis. Child.*, 1993,68, 177-181
263. Reddy S, Smith D.B.J, Rich M, Leferovich J.M, Reilly P, Davis B.M, Tran K, Rayburn H, Bronson R, Cros D, Balice-Gordon R, Housman D, *Nat Genet.*, 1996, 13:325–334

264. Redman JB, Fenwick RG, Fu YH, Pizzuti A, Caskey CT. Relationship between parental trinucleotide GCT repeat length and severity of myotonic dystrophy in offspring. *JAMA*. 1993;269:1960–1965.
265. Reiter C, Gramer E; Anticipation in patients with iridescent multicoloured posterior capsular lens opacities (“Christmas tree cataract”): The role in the diagnosis of myotonic dystrophy; *Ophthalmology*. 2009,106(12):1116-1120.
266. Richards R.I, “Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease,” *Human Molecular Genetics*, 2001,vol. 10,2187–2194.
267. Richards R.I, Sutherland G.R, “Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease,” *Cell*, 1992,vol. 70, 709–712.
268. Ricker K, Grimm T, Koch MC, Schneider C, Kress W, Reimers CD, Schulte-Mattler W, Mueller-Myhsok B, Toyka KV, Mueller CR. Linkage of proximal myotonic myopathy to chromosome 3q. *Neurology*. 1999;52:170–171.
269. Ricker K, Koch M.C, Lehmann-Horn F, Pongratz D, Otto M, Heine R, Moxley RT. Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts. *Neurology*. 1994;44:1448–1452.
270. Ricker K. Myotonic dystrophy and proximal myotonic myopathy. *J Neurol*. 1999;246:334–338
271. Romeo V, Pegoraro E, Ferrati C, Squarzanti F, Sorarù G, Palmieri A, et al. Brain involvement in myotonic dystrophies: neuroimaging and neuropsychological comparative study in DM1 and DM2. *J Neurol*. 2010;257:1246–1255.
272. Romigi A, Izzi F, Pisani V, Placidi F, Pisani LR, Marciani MG, et al. Sleep disorders in adult-onset myotonic dystrophy type 1: a controlled polysomnographic study. *Eur J Neurol*, 2011, 1468-1331

273. Ronnblom A, Andersson S, Hellstrom P.M, Danielsson A. Gastric emptying in myotonic dystrophy. *Eur J Clin Invest* 2002; 32(8): 570–574.
274. Ronnblom A, Danielsson A, El-Salhy M. Intestinal endocrine cells in myotonic dystrophy: an immunocytochemical and computed image analytical study. *J Intern Med* 1999; 245: 91-97
275. Rönnemaa T, Alaranta H, et al. Increased activity of serum gamma-glutamyltransferase in myotonic dystrophy. *Acta Med Scand.* 1987;222:267–273.
276. Rosa N, Lanza M, Borrelli M, Palladino A, Gregorio M.G., Politano L; Intraocular Pressure and Corneal Biomechanical Properties in Patients with Myotonic Dystrophy; *Ophthalmology*, 2009, vol. 116, 231-234.
277. Rubinsztein JS, Rubinsztein DC, Goodburn S, Holland AJ. Apathy and hypersomnia are common features of myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;64:510–515.
278. Rudnik-Schoneborn S, Schneider-Gold C, Raabe U, Kress W, Zerres K, Schoser BG. Outcome and effect of pregnancy in myotonic dystrophy type 2. *Neurology.* 2006;66:579–580
279. Salehi L.B, Bonifazi E, Di Stasio E, Risk prediction for clinical phenotype in myotonic dystrophy type 1: data from 2,650 patients,” *Genetic Testing*, 2007, vol. 11, 84–90.
280. Salisbury E, Sakai K, Schoser B, Huichalaf C, Schneider-Gold C, Nguyen H, Wang G.L, Albrecht J.H, Timchenko L.T. Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. *Exp Cell Res* 2008; 314(11–12): 2266–2278.
281. Sansone VA, Brigonzi E, Schoser B, Villani S, Gaeta M, De Ambroggi G, Bandera F, De Ambroggi L, Meola G. The frequency and severity of cardiac involvement in myotonic dystrophy type 2 (DM2): Long-term outcomes. *Int J Cardiol.* 2012.

282. Savić D., Keckarević D., Branković-Srećković S., Apostolski S., Todorović, and S. Romac, “Clinical case report: atypical myopathy in a young girl with 91 CTG repeats in DM1 locus and a positive DM1 family history,” *International Journal of Neuroscience*, 2006, 116, 1509–1518.
283. Savić D, Rakočević-Stojanović V, Keckarević D et al., “250 CTG repeats in DMPK is a threshold for correlation of expansion size and age at onset of juvenile-adult DM1,” *Human Mutation*, 2002, vol.19,131–139.
284. Savkur R.S, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nature Genetics*. 2001;29(1):40–47
285. Savouret C, Garcia-Cordier C, Megret J, Riele H.T, Junien C, Gourdon G, “MSH2-dependent germinal CTG repeat expansions are reproduced continuously in spermatogonia from DM1 transgenic mice,” *Molecular and Cellular Biology*, 2004, vol. 24, 629–637.
286. Schneider C, Ziegler A, Ricker K, Grimm T, Kress W, Reimers CD, Meinck H, Reiners K, Toyka KV. Proximal myotonic myopathy: evidence for anticipation in families with linkage to chromosome 3q. *Neurology*. 2000;55:383–388.
287. Schoser B.G, Kress W, Walter MC, Halliger-Keller B, Lochmuller H, Ricker K. Homozygosity for CCTG mutation in myotonic dystrophy type 2. *Brain*. 2004A;127:1868–1877
288. Schoser B.G, Schneider-Gold C, Kress W, Goebel HH, Reilich P, Koch MC, Pongratz DE, Toyka KV, Lochmuller H, Ricker K. Muscle pathology in 57 patients with myotonic dystrophy type 2. *Muscle Nerve*. 2004c;29:275–281
289. Segel R, Silverstein S, Lerer I, et al. Prevalence of myotonic dystrophy in Israeli Jewish communities: inter-community variation and founder premutations. *Am J Med Genet A*. 2003;119:273–278.
290. Sergeant N, Sablonniere B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Muraige

- CA, Wattez A, et al. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2143–2155.
291. Serisier D. E., Mastaglia F. L. and Gibson, G. J., Respiratory muscle function and ventilatory control. I in patients with motor neurone disease. II in patients with myotonic dystrophy. *Q. J. Med.* 51, 1982, 205-226.
292. Seznec H, Lia-Baldini A.S, Duros C et al., “Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability,” *Human Molecular Genetics*, 2000, vol. 9, 1185–1194.
293. Shen J, Barbera J, Shapiro CM. Distinguishing sleepiness and fatigue: focus on definition and measurement. *Sleep Med Rev.* 2006;10:63–76
294. Shepard P, Lam EM, St Louis EK, Dominik J. Sleep disturbances in myotonic dystrophy type 2. *Eur Neurol.* 2012;68:377–380.
295. Siciliano G, Pasquali L., Rocchi A., Advanced oxidation protein products in serum of patients with myotonic disease type I: association with serum gamma-glutamyltransferase and disease severity, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2005,43(7):745-747.
296. Siciliano G, Manca M, Gennarelli M, et al. Epidemiology of myotonic dystrophy in Italy: re-appraisal after genetic diagnosis. *Clin Genet.* 2001;59:344–349
297. Simmons Z, Thornton C.A, Seltzer W.K, Sue Richards C, “Relative stability of a minimal CTG repeat expansion in a large kindred with myotonic dystrophy,” *Neurology*, 1998, vol. 50, 1501–1504.
298. Sorensen S.A, Fenger K, Olsen JH. Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer.* 1999;86:1342–1346
299. Sovari AA, Bodine CK, Farokhi F. Cardiovascular manifestations of myotonic dystrophy-1. *Cardiol Rev.* 2007;15:191–194

300. Spranger M, Spranger S, Tischendorf M, Meinck HM, Cremer M. Myotonic dystrophy. The role of large triplet repeat length in the development of mental retardation. *Arch Neurol.* 1997;54:251–254.,
301. Sund R, Pukkala E, Patja K. Cancer incidence among persons with fragile X syndrome in Finland: a population-based study. *J Intellect Disabil Res.*2009;85–90.
302. Suokas K.I, Haanpaa M, Kautiainen H, Udd B, Hietaharju AJ. Pain in patients with myotonic dystrophy type 2: a postal survey in finland. *Muscle Nerve.* 2012;45:70–74.
303. Suominen T, Bachinski LL, Auvinen S, Hackman P, Baggerly KA, Angelini C, Peltonen L, Krahe R, Udd B. Population frequency of myotonic dystrophy: higher than expected frequency of myotonic dystrophy type 2 (DM2) mutation in Finland. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:776–782.
304. Takada H, Oyama Y, Kon S, Goto T, Glucose intolerance in myotonic dystrophy type 1, *Rinsho Shinkeigaku* 2012;52(11): 1259-1260.
305. Takasugi T., Ishihara T., Kawamura, J. and Kawashiro, T., [Respiratory failure:respiratory disorder during sleep in patients with myotonic dystrophy]. *Rinsho Shinkeigaku* 35, 1995, 1486-1488
306. Taneja K.L, McCurrach M, Schalling M, Housman D, Singer RH. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* 1995; 128(6): 995–1002.
307. Tapscott S.J, Deconstructing Myotonic Dystrophy, *Science*, 8 September, 2000, volume 289,1701-1702
308. The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC),“New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1),” *Neurology*,2000, vol. 54,1218–1221.
309. Thornton C. The myotonic dystrophies. *Semin Neurol.* 1999;19:25–33.
310. Thornton C.A, Johnson K, Moxley R.T. III, “Myotonic dystrophy

- patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes,” *Annals of Neurology*, 1994, vol. 35, 104–107.
311. Thornton C.A, Wymer JP, Simmons Z, McClain C, Moxley RT., III Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet.* 1997;16:407–409
312. Tieleman A.A, den Broeder A.A, van de Logt A.E, van Engelen B.G. Strong association between myotonic dystrophy type 2 and autoimmune diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80(11): 1293–1295.
313. Tieleman A.A, Knoop H, van de Logt AE, Bleijenberg G, van Engelen BG, Overeem S. Poor sleep quality and fatigue but no excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy type 2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81:963–967.
314. Tieleman A.A, van Vliet J, Jansen JB, van der Kooij AJ, Borm GF, van Engelen BG. Gastrointestinal involvement is frequent in Myotonic Dystrophy type 2. *Neuromuscul Disord.* 2008;18:646–649.
315. Timchenko L.T, Miller J.W, Timchenko N.A, DeVore D.R, Datar K.V, Lin L, et al: Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucl Acids Res*, 1996, 24:4407–4414.
316. Timchenko N.A, Cai Z.J, Welm A.L, Reddy S, Ashizawa T, Timchenko L.T. RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 7820–7826.
317. Timchenko N.A, Patel R, Iakova P, Cai Z.J, Quan L, Timchenko LT. Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 2004; 279(13): 13129–13139.
318. Trottier Y, Biancalana V, Mandel J.L, “Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset,” *Journal of Medical Genetics*, 1994, vol. 31, 377–382.
319. Tsilfidis C, MacKenzie A.E, Mettler G, Barceló J, Korneluk R.J,

- Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy, *Nature Genetics*, 1992,1,192–195.
320. Turkbey E.B, Gai N, Lima JA, van der Geest RJ, Wagner KR, Tomaselli GF, Bluemke DA, Nazarian S. Assessment of cardiac involvement in myotonic muscular dystrophy by T1 mapping on magnetic resonance imaging. *Heart Rhythm*. 2012;9:1691–1697
321. Udd B, Krahe R, “The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges,” *Lancet Neurology*, 2012, vol. 11, 891–905.
322. Udd B, Meola G, Krahe R, Thornton C, Ranum L, Day J, Bassez G, Ricker K. Report of the 115th ENMC workshop: DM2/PROMM and other myotonic dystrophies. 3rd Workshop, 14-16 February 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2003;13:589–596
323. Udd B, Meola G, Krahe R, Thornton C, Ranum L.P, Bassez G, Kress W, Schoser B, Moxley R. 140th ENMC international workshop: Myotonic dystrophy DM2/PROMM and other myotonic dystrophies with guidelines on management. *Neuromuscul Disord* 2006; 16(6): 403–413.
324. Udd B, Meola G, Krahe R, Wansink DG, Bassez G, Kress W, Schoser B, Moxley R. Myotonic dystrophy type 2 (DM2) and related disorders report of the 180th ENMC workshop including guidelines on diagnostics and management 3-5 December 2010, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2011;21:443–450
325. Valaperta R, Sansone V, Fortunata Lombardi, et al, Identification and Characterization of DM1 Patients by a New Diagnostic Certified Assay: Neuromuscular and Cardiac Assessments, *BioMed Research International*,2013, 1-6.
326. Van den Broek W.J.A.A, Nelenc M.R, Wansink D.G et al., “Somatic expansion behaviour of the (CTG)<sub>n</sub> repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch-repair proteins,” *Human Molecular Genetics*, 2002,11,191–198.

327. van der Meché FG, Bogaard JM, van der Sluys JC, Schimsheimer RJ, Daytime sleep in myotonic dystrophy is not caused by sleep apnoea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:626–628.
328. Van der Werf S, Kalkman J, Bleijenberg G, van Engelen B, Fatigue Research Group The relation between daytime sleepiness, fatigue, and reduced motivation in patients with adult onset myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74:138–139.
329. Vazquez J.A, Pinies JA, Martul P, De los Rios A, Gatzambide S, Busturia MA. Hypothalamic-pituitary-testicular function in 70 patients with myotonin dystrophy. *Journal of Endocrinological Investigation*. 1990;13(5):375–379.
330. Vielhaber S, Jakubiczka S, Gaul C, et al, Brain 1H magnetic resonance spectroscopic differences in myotonic dystrophy type 2 and type 1, *Muscle and nerve*, September 9, 2006, 34(2):145-152.
331. Vihola A., Bassez G. et al, Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 and PROMM/DM2, *Neurology* 2003;60:1854-1857.
332. Wahbi K, Meune C, Bécane HM, Laforêt P, Bassez G, Lazarus A, Radvanyi-Hoffman H, Eymard B, Duboc D. Left ventricular dysfunction and cardiac arrhythmias are frequent in type 2 myotonic dystrophy: a case control study. *Neuromuscul Disord*. 2009;19:468–472
333. Walsh J.C, Turtle JR, Miller S, Mcleod JG. Abnormalities of insulin secretion in dystrophia myotonica. *Brain*. 1970;93(4):731–742;
334. Wang G.S, Kearney D.L, De Biasi M, Taffet G, Cooper T.A. Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 2007; 117(10): 2802–2811.
335. Wansink D. G., Wieringa B. Transgenic mouse models for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Cytogenet. Genome Res.* 2003, 100, 230-242;

336. Weber Y.G, Roebing R, Kassubek J, Hoffmann S, Rosenbohm A, et al. Comparative analysis of brain structure, metabolism, and cognition in myotonic dystrophy 1 and 2. *Neurology*. 2010;74:1108–1117;
337. Weingarten T.N, Hofer RE, Milone M, Anesthesia and myotonic dystrophy type 2: a case series. *Can J Anaesth*. 2010; 57:248–255.
338. Wells R.D, T. Ashizawa, *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases*, Elsevier, 2nd edition, 2006.
339. Wheeler T.M, Thornton CA. Myotonic dystrophy: RNA-mediated muscle disease. *Curr Opin Neurol*. 2007;20:572–576.
340. Win A.K, Perattur PG, Pulido JS, Pulido CM, Lindor NM. Increased cancer risks in myotonic dystrophy. *Mayo Clin Proc*. 2012;87:130–135
341. Winblad S, Lindberg C, Hansen S, “Cognitive deficits and CTG repeat expansion size in classical myotonic dystrophy type 1 (DMI),” *Behavioral and Brain Functions*, 2006, vol. 2, article 16.
342. Winblad S, Lindberg C, Hansen S. Temperament and character in patients with classical myotonic dystrophy type 1 (DM-1). *Neuromuscul Disord*. 2005;15:287–92
343. Wöhrle D, Kennerknecht I, Wolf M, Enders H, Schwemmle S, Steinbach P, “Heterogeneity of DM kinase repeat expansion in different fetal tissues and further expansion during cell proliferation in vitro: evidence for a causal involvement of methyl-directed DNA mismatch repair in triplet repeat stability,” *Human Molecular Genetics*, 1995, vol. 4, 1147–1153
344. Wong L.J.C, Ashizawa T, Monckton D.G, Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent, *American Journal of Human Genetics*, 1995, vol. 56, 114–122.
345. Wozniak J.R, Mueller BA, Ward EE, Lim KO, Day JW. White matter abnormalities and neurocognitive correlates in children and adolescents with myotonic dystrophy type 1: a diffusion tensor imaging study. *Neuromuscul Disord*. 2011;21:89–96.

346. Yamagata H, Miki T, et al., "Detection of a premutation in Japanese myotonic dystrophy," *Human Molecular Genetics*, 1994,3, 819–820.
347. Yamashita T., Matsubara E., Nagano I., Shoji M. and Abe K.; "Bilateral extraocular muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1;" *Neurology* 2004 63:4 759-760.
348. Yu H, Laberge L, Jaussent I, Bayard S, Scholtz S, Raoul M, et al. "Daytime sleepiness and REM sleep characteristics in myotonic dystrophy: a case-control study." *Sleep*. 2011;34:165–170.
349. Zalewska R., Mariak Z., Markowska E., Czaban S; "Problems of perioperative period in patients with Steinert's myotonic dystrophy operated due to cataract;" *Klinika Oczna.*, 2005, 107(1-3):113-114.
350. Zeesman S, Carson N, Whelan DT. "Paternal transmission of the congenital form of myotonic dystrophy type 1: a new case and review of the literature." *Am J Med Genet*. 2002;107:222–226
351. Zifko U. A., Hahn A. F., Remtulla H., George, C. F., Wihlidal W. and Bolton, C. F. "Central and peripheral respiratory electrophysiological studies in myotonic dystrophy," *Brain*, 1996, vol.119, 1911-1922