

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО НЕВРОЛОГИЯ

**Д-р Ана Вескова Шопова**

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

Научна специалност  
030119 Неврология

**АВТОРЕФЕРАТ**

На дисертация за присъждане на образователна и научна степен

**„Доктор по медицина“**

**Научен ръководител:  
проф. д-р Ивайло Людмилов Търнев, дмн**

**СОФИЯ  
2014**

Дисертационният труд е написан на 216 машинописни страници, включващи 36 таблици, 26 графики, 17 родословия, 14 фигури, 19 снимки. Библиографският списък съдържа 343 литературни източника, от които 7 български и 336 чуждестранни.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на заседание на Катедрата по Неврология на МФ на МУ- София на 24.06.2014 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 12.11.2014 г. от 14.00 ч. в Аудиторията на Клиника по неврология - УМБАЛ „Александровска“ – София, пред научно жури в състав:

1. проф. д-р С. Чернинкова, д.м.н. (рецензия)
2. проф. д-р И. Петров, д.м.н. (рецензия)
3. проф. д-р И. Търнев, д.м.н. научен ръководител на докторанта (становище)
4. доц. д-р Н. Никоевски, д.м.н. (становище)
5. доц. д-р П. Цветанов Георгиев, д.м. (становище)

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ-София и са на разположение на интересуващите се в библиотеката на УМБАЛ „Александровска“, гр. София.

*Забележка: Номерата на таблиците, графиките и родословията в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.*

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО НЕВРОЛОГИЯ

**Д-р Ана Вескова Шопова**

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

Научна специалност  
030119 Неврология

**АВТОРЕФЕРАТ**

На дисертация за присъждане на образователна и научна степен

**„Доктор по медицина“**

**Научен ръководител:  
проф. д-р Ивайло Людмилов Търнев, дмн**

**СОФИЯ  
2014**

There was no correlation found between the degree of involvement of the muscular system and the size of expansion. Results do not show dependencies between the phenomenon anticipation and the number of CTG repeats, and the connection between the existence of this phenomenon and maternal inheritance. A similar correlation was not found between the maternal or paternal line of inheritance and the size of the expansion. In support of the multisystem nature of DM1 the following conclusions were made: a large percentage of patients with DM1 are with data for cardiac disorders, mainly rhythm conduction abnormalities, but without definite correlation with the size of the expansion; reduced respiratory parameters in patients with DM1 do not correlate with cardiac disorders and number of CTG repeats; reported data for axon type peripheral neuropathy in DM1 is not correlated to the number of CTG repeats; no relationships were found between the size of expansion and thus, elevated levels of creatine phosphokinase, gamma-glutamyltransferase and reduced levels of immunoglobulin type G.

A comparative analysis was made between the two types of myotonic dystrophy in the clinical manifestations, take into account the differences in the effect of individual systems. Although routine clinical tests can identify myotonic dystrophy, forms of DM1 and DM2 in adulthood can not be reliably distinguished from each other using only clinical criteria.

Our results confirm the multisystem disturbances in DM. This study demonstrates a correlation between the earlier age of onset in DM1 patients with the greater size of expansion, which can be considered as a useful tool for DM1 phenotype assessment and presymptomatic testing.

## СЪДЪРЖАНИЕ:

<b>I. Постановка на изследването</b>	
1. Въведение	6
2. Цел и задачи	7
3. Контингент и методи на изследване	8
<b>II. Клинични резултати</b>	<b>11</b>
1. Клинико - диагностичен анализ на пациенти с МД1	12
2. Клинико - диагностичен анализ на пациенти с МД2	24
<b>III. Резултати от генетични изследвания</b>	<b>26</b>
1. Генетични резултати при МД1	26
2. Фамилни фенотип - генотип характеристики при МД1	28
3. Антиципация при МД1	29
4. Мускулна система при МД1	32
5. Клинико-генетични зависимости при пациенти с МД1	33
6. Генетични резултати при пациенти с МД2	38
<b>IV. Дискусия</b>	<b>39</b>
<b>V. Изводи</b>	<b>51</b>
<b>VI. Приноси</b>	<b>52</b>
<b>VII. Публикации, свързани с дисертационния труд</b>	<b>53</b>
<b>VIII. Summary</b>	<b>57</b>

## VIII. SUMARRY

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is caused by expansion of a CTG trinucleotide repeat in the gene DMPK. Although the CTG repeat correlates with the disease phenotype, because of the mitotical instability of the DMPK CTG repeat length, and the somatic mosaicism, the results are still controversial. The aim of this study was the phenotypic characterization and elucidation of genotype-phenotype correlations in myotonic dystrophy and defining the size of expansion in order to predict the clinical manifestation of the disease and determine the risk of anticipation- more severe and early expression in subsequent generations. In total 90 patients with the clinical diagnosis myotonic dystrophy molecular genetic testing confirmed the diagnosis in 84 of 23 families and mutations in the genes responsible for DM1 and DM2 were identified. The following methods have been used: laboratory tests, manual muscle testing, electromyography, functional respiratory testing, electrocardiography, echocardiography, Holter ECG, neuro-ophthalmology consultation in order to evaluate the affected systems in DM patients. We assessed disease expression by clinical evaluation and the molecular genetic test in 56 DM1-patients identified by accurate clinical diagnosis and family segregation. The DM1 patients were separated in two groups according to the expansion size (< 400 and >400 CTG repeats). It was found significant correlation between gender and the age of onset of the disease in the group of patients with onset below 30 years of age, dominated by women. A correlation between the earlier age of onset in patients with the greater size of expansion was reported when analyzing the genetic results. There was no correlation between the type of the first symptoms of the disease and the age of onset of the disease.

5. **Shopova A.**, Shopova S., Bichev S., Savov A., Myotonic dystrophy type 1 families: anticipation as a decision making behavior for presymptomatic DNA testing of asymptomatic children, European Society of Human Genetics conference (ESHG) 06.2014, Milan, Italy.

6. **Shopova A.**, Guergelcheva V., Bichev S., Savov A., Tournev I., Genotype-phenotype correlations in Bulgarian myotonic dystrophy type 1 patients (part 1), 4th International Conference of Human Genetics, 10.2014, Nicosia, Cyprus.

7. Bichev S, **Shopova A.**, Todorov T, Todorova A, Chamova T, Guerguelcheva V, Savov A, Tournev Iv, Implementation of triplet repeat primed PCR (TP PCR) in the molecular diagnosis of myotonic dystrophy type 1 (DM1), European Society of Human Genetics (ESHG), 06.2013, Paris, France.

8. Чамова Т, **Шопова А.**, Гергелчева В, Райчева М, Търнев И. Изследване на антиципацията на когнитивните нарушения при три семейства с миотонична дистрофия тип 1. Национален конгрес по неврология с международно участие, 05.2011 г.

9. Ваврек Е., Василева Е, Александров Ал., **Шопова А.**, Гергелчева В., Търнев И., Изследване на съня при пациент с миотонична дистрофия, Национална конференция по неврология с международно участие, 06.2014 г.

**Участие в научни проекти, свързани с дисертационния труд**

1. Към МОН на тема „Изследване на генотип-фенотип корелациите при когнитивните нарушения на пациенти с невромускулни заболявания” с продължителност 3 г. от 2009 г.- 2012 г

**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 (FEО1)- форсиран експираторен обем за 1 секунда

МД - миотонична дистрофия

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  
ССТГ – цитозин-цитозин-тиамин-гуанин  
СТГ – 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 С  
MEF2A - myogenic enhancer factor 2A

8. Господинова М, **Шопова А.**, Чамова Т, Иванова Р, Търнев И, Денчев С, Сърдечно засягане при миотонична дистрофия тип 1, Българска кардиология, том 29, 2013, №4, 27-31.
9. Чамова Т, Гергелчева В, Райчева М, Златарева Д, Тодоров Т, Чернинкова С, **Шопова А.**, Тодорова А, Търнев И, Генотип-фенотип корелации на когнитивните нарушения и промените на невроизобразяващите изследвания при пациенти с миотонична дистрофия тип 1, Българска неврология, 12.2012, том 13,брой 3, 31-36.

#### **Научни съобщения на български и международни конгреси с публикувани резюмета**

1. **Шопова А.**, Тодорова А, Тодоров Т, Гергелчева В, Търнев И, Пренатална диагностика на миотонична дистрофия тип 1, Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието, с международно участие, София, 10.2010 г.
2. **Шопова А.**, Тодорова А, Тодоров Т, Гергелчева В, Търнев И, Пренатална диагностика на миотонична дистрофия тип 1, трета награда за постерно изготвяне и представяне, XII Национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, 05. 2011г.
3. **Шопова А.**, Чамова Т, Господинова М, Бориславова В, Гергелчева В, Чернинкова С, Търнев И. Антиципация при семейства с миотонична дистрофия тип 1 и тип 2, Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието, с международно участие, 10.2012г.
4. **Shopova A.**, Chamova T, Guerguelcheva V, Tournev I. Anticipation in families with myotonic dystrophy type 1 and type 2. 22 ENS meeting. Prague Czech republic, volume 259, supplement 1, 06. 2012.

## VII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

1. **Шопова А.**, Търнев И, Генотип-фенотип корелации при миотонични дистрофии тип 1 и тип 2 /обзорна статия/, Българска неврология, (под печат).
2. **Шопова А.**, Чамова Т, Гергелчева В, Райчева М., Търнев И. Сравнително представяне на два случая с митонична дистрофия тип 1 и тип 2. Българска неврологична и психиатрична практика. 2010;3-4:7-11.
3. **Шопова А.**, В Гергелчева, И. Търнев, Миотонична дистрофия тип 1: корелация между размер на експанзията и мускулното засягане, Двигателни нарушения, 11/2, 2014 46-52.
4. **Шопова А.**, Тодоров Т., Тодорова А., Трайкова И., Гергелчева В., Търнев И., Перифернонервни , биохимични и невроимунни промени при миотонична дистрофия, Българска неврология, 2014; 15;2;204-208.
5. **Шопова А.**, Ваврек Е., Василева Е., Гергелчева В., Колева Н., Александров А., Търнев И., Респираторна полиграфия при трима болни с миотонична дистрофия тип 1- Щайнерт, Българска неврология, 2014;15;2;208-210.
6. **Shopova A.**, Shopova S., Bichev S., Veresies I., Veresies K., Savov A., Myotonic dystrophy type 1 families: anticipation as a decision making behavior for presymptomatic DNA testing of asymptomatic children, CMJ, 09.2014(in press).
7. Бориславова В, **Шопова А.**, Гергелчева В, Търнев И, Чернинкова С. Невро-фталмологични симптоми при миотонична дистрофия. Български офталмологичен преглед. 2011; 3, 23-28.

## I. ПОСТАНОВКА НА ИЗСЛЕДВАНЕ 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 проксимални 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 определен клиничен фенотип. Същевременно е налице и голяма интер- и интрафамилна вариабилност на клиничната картина при една и съща експанзия.

## **2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **Цел:**

Целта 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.

### **Задачи:**

1. Детайлно фенотипизиране на пациенти с миотонична дистрофия с използването на клинични и функционални методи.
2. Генеалогично проучване на засегнатите семейства 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 размера на експанзията.
7. Изработване на клинични насоки за диференцирано -генетично изследване на Миотонични дистрофии тип 1 и 2 при фамилни и спорадични случаи в България.

## **VI. 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**

- Събрана е голяма кохорта от семейства с миотонична дистрофия.
- Създадена е ДНК банка от всички клинично изследвани семейства, която е основа на настоящите и бъдещи генетични изследвания.
- Допълнен е диагностичният алгоритъм за насочване за молекулярно-генетично изследване на миотоничните дистрофии в българската популация.
- 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.

## **V. ИЗВОДИ**

1. Установява се значима зависимост между пола и възрастта на начало на заболяването, като в групата на пациентите, с начало под 30 годишна възраст, преобладават жените.
2. Не се установява зависимост между типа първи симптоми на заболяването, както с пола на пациентите, така и с възрастта на проява на заболяването.
3. Не се наблюдава правопрпорционална връзка между нарастване на продължителността на заболяването и разпределението на мускулната слабост за четирите крайника, дистално и проксимално. При изследване връзката на степен на засягане на мускулната система и размера на експанзията не се установява подобна корелация.
4. При анализ на генетичните резултати се отчита зависимост по отношение на по-ранната възраст на начало, при пациенти с по-голям размер на експанзията.
5. Не се доказват зависимости между антиципацията при МД1 и по-големият брой повторения, както и връзка между наличието на този феномен и унаследяването по майчина линия. Подобна връзка не се открива и между линията на унаследяване и размера на експанзията.
6. В подкрепа на мултисистемния характер на МД1 са изведени следните заключения:
  - голям процент от пациентите с МД1 са с данни за кардиологични нарушения, основно по типа на ритъмно проводни нарушения, но без установена корелация с размера на експанзията.
  - понижените вентилаторни показатели при пациентите с МД1 не се корелират със сърдечните нарушения и с броят на СТГ повторенията.
  - отчетени са данни за предимно аксонен тип засягане на перифернонервната система при МД1, но без зависимост по отношение броят СТГ повторенията.
  - зависимости между размера на експанзията и съответно, повишените нива на креатинфосфокиназа, гама-глутамилтрансфераза и понижените стойности на имуноглобулин тип Г, не се установяват.

## **3. КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ**

### **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.

### **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; десетстепенната скала на Walton, отчитаща степента на инвалидизация (Walton и сътр., 2006).

2. Неврофизиологични изследвания:
  - 2.1. ЕМГ и ЕНГ (Dantec–Keypoint електромиограф; Natus, Copenhagen, Denmark),
  - 2.2. Функционално изследване на дишането (ФИД).
  - 2.3. ЕКГ(12-канална ЕКГ), Холтер-ЕКГ, ЕхоКГ(стандартна трансторакална Ехо КГ – M-mode, двуразмерна-2D; пулсов-PW и непрекъснат доплер-CW и тъканен доплер-TDI)
3. Лабораторни изследвания: хематологични, биохимични изследвания, серумна електрофореза.
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 (при изпращането на биологични проба-кръв за генетично изследване са попълвани специални протоколи).

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 размера на нормалните алели, съдържащи СТG повторения 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.

Пациентите с МД1 са предимно с дистални начални мускулни прояви, като нито един от тях не съобщава за първоначален симптом на 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. При МД2 се наблюдава по-малък относителен дял и по-слабо изразени хипотрофии в проксимални отдели на долни и горни крайници. **Сърдечната система** е засегната при миотонична дистрофия. Данните на изследваните от нас МД2 пациенти сочат, подобно на автори като Meola G.(2002), Sansone V.A. (2012) и съавтори, за по-леки сърдечни нарушения, в сравнение с тези установени при МД1. Най-честите за МД1 ритъмно-проводните нарушения, установени в голям процент и в нашето изследване, са по-слабо застъпени при МД2. 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. 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 M.C. и съавтори, които откриват значителна зависимост между засягането на периферните нерви и мускулната слабост. По отношение на различията в невроофтalmологичната симптоматика при болни с МД1 и МД2, независимо от малката група болни с МД2, прави впечатление при тях отсъствието на друга невроофтalmологична симптоматика, освен специфичната „цветна“ **катаракта**. За разлика от тях, невроофтalmологичната 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.

повторенията е с ограничена предиктивна стойност при отделните пациенти, главно поради припокриването между размерите на експанзията, наблюдавани в различни фенотипни групи, соматичния мозаицизъм и факта, че ДНК анализът на СТГ повторенията се извършва чрез левкоцити от периферната кръв, вместо от напречнообразените мускули и сърдечния мускул (Antonini G., съавтори, 2006).

Потърсихме зависимост между размера на експанзията и вентилаторните нарушения. От резултатите е видна липсата на статистически значима връзка между броя СТГ и понижените стойности на форсирания витален капацитет ( $p=0,849$ ), от една страна, и на форсирания експираторен обем, 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 клиничните критерии. 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.). 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. При МД1 началната клинична картина е по-различна.

**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 СТГ регион и хибридира 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 повторения 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 повторения 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.

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

1) Дескриптивна статистика:

- 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;

- 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  $\alpha$ . Използван е специализирания статистически пакет SPSS версия 13.0.

## **II. КЛИНИЧНИ РЕЗУЛТАТИ**

За период от три години (2009-2012г.) са изследвани общо 92 болни и представители на техните семейства, насочени към клиниката с диагноза:

Разглеждаме също така и зависимостта между перифернонервната увреда и броя на СТГ повторенията. 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). В тук представеното проучване, от кардиологично изследваните МД1 пациенти, значителен процент (68.1%) от тях са с данни за един или друг тип нарушения. 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. Потърсихме зависимост между занижените стойности на вентилаторните показатели и мускулната слабост проксимално и аксиално. Не установяваме такава връзка за разлика от Mathieu J. и съавтори, които 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). Разгледахме зависимостта между пациентите с ритъмно проводни нарушения и размера на експанзията, тъй като от една страна това са едни от най-честите нарушения, а от друга са най-рискови за внезапна сърдечна смърт. В конкретният случай не се открива връзка ( $p=0.611$ ) между броя СТГ и наличието на проводни нарушения. Склонни сме да се съгласим с Antonini G. и съавтори, които считат, че анализът на СТГ

Инсулиновата резистентност при МД1 може да доведе до множество метаболитни дефекти (Takada H., съавтори, 2012). Въпреки това, честотата на диабет при пациенти с МД1 не е доказана.

При проведените от нас изследвания се установяват в 28% от пациентите данни за периферна полиневропатия (ПНП), която 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. (Peric S., съавтори, 2013). Авторите наблюдават асоциация с наличието на ПНП при МД1 и мъжкият пол, възрастта на пациентите, продължителността на заболяването и определени метаболитни параметри. 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. Асоциираност на ПНП с нарушеният въглехидратен толеранс и 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 безитас. Отбелязваме процентни разлики в групите с под и над 400 СТГ по отношение на отклоненията в ЕМГ записа. 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. не открива обаче зависимост между размера на експанзията и електромиографската находка за миогенна увреда (Khoshbakht R., съавтори, 2013).

„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. Разпределението по пол е съответно 41(49%) мъже и 43 (51%) жени.

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

### **1.1 Разпределение на пациенти според възраст на начало на заболяването и пол.**

Мутации в DMPK гена се установяват при 79 пациенти, 53 от тях произхождащи от 21 семейства, клинично и генетично верифицирани. От общия брой пациенти с МД1, 40 са мъже и 39 са жени. Възрастовият 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 периода от първата година от живота до 58г. Средната възраст на първоначална изява на заболяването е 24.8г.(SD+/-14.53). Трима 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%) началото е 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 МД1 форма, с начало в зряла възраст.

Предвид средната възраст на първоначална изява 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.

### Графика №1 Начална възраст на заболяването при МД1



В изследваната група жени, процентно преобладават тези, които са с прояви  $\leq 30$ г. При мъжете, този процент е по-нисък и е почти равен на групата пациенти с начало  $>30$ г. Наблюдава се статистически значима връзка между пола и възрастта на начало ( $p=0.019$ ).

## 1.2 Мускулно засягане

### 1.2.1 Разпределение на пациентите по първи симптоми и пол.

При всички пациенти с МД1 първите прояви, с инвалидизиращ ефект впоследствие, са мускулната

В проучването е потърсена зависимост между понижените стойности на ИгГ и броят СТГ. В процентно отношение се открива разлика между пациентите с хипогамаглобулинемия и по-голям размер на СТГ копията и групата пациенти с  $<400$  СТГ. Kaminsky P., открива такава корелация между експанзията на СТГ и ИгГ дефицитът (Kaminsky P., съавтори, 2011). Други автори не потвърждават подобна зависимост, при проучване на корелацията между СТГ повторенията и нивата на FcRn транскриптите в мускулната тъкан и лимфоцитите, и серумните нива на ИгГ (Pan-Hammarstrom Q., съавтори, 2003).

При пациентите с по-голяма експанзия, 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 нашите данни, не се потвърждава статистически значима разлика между пациентите с абнормни стойности на ГГТ и по-голям размер на експанзията. Въпреки това някои автори, като Heatwole S., търсят зависимост между тежестта на заболяването и нарушените стойности на гама-глутамилтрансфераза. Те разделят голяма група от пациенти с МД1 на такива с лека до умерена степен на засягане, като демонстрират абнормни стойности на всички изследвани чернодробни ензимни нива (ЛДХ, ГГТ, АСАТ, АЛАТ, АФ), но не наблюдават зависимост с тежестта на заболяването (Heatwole S., съавтори, 2006).

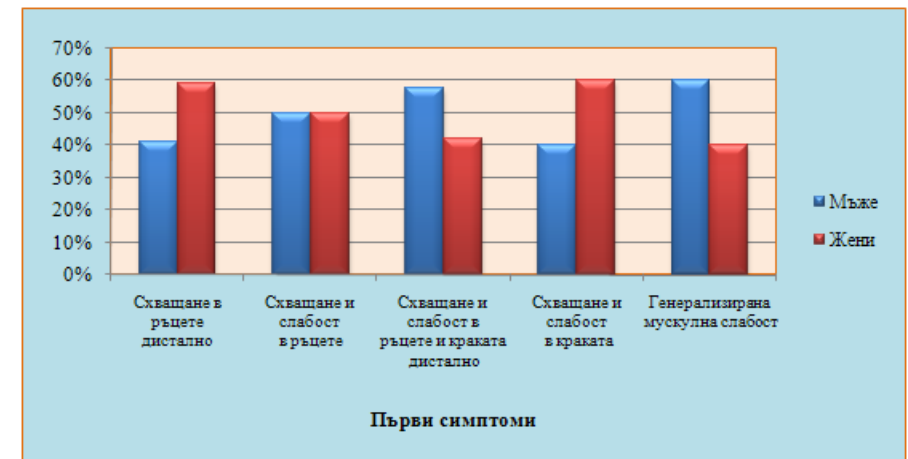
В нашето проучване, в близо 20 % от проведените изследвания, се установяват данни за повишени нива на кръвната захар. Общо трима пациенти са със захарен диабет тип 2, като един от случаите е новооткрит. Четирима пациенти са с данни за нарушен въглехидратен толеранс. Takada H. счита, че пациентите с МД1, които са и с дисгликемия, имат чернодробна и мускулна инсулинова резистентност, както и абнормна секреция на инсулин.

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 броя 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 експанзирания 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). Проява на мускулна увреда са и завишените стойности на мускулния ензим креатинфосфокиназа (КФК). При изследваните от нас пациенти средната стойност на повишената КФК е ~ 334. Потърсена е зависимост между увеличената КФК и броят на СТГ повторенията. 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.

слабост, атрофията и миотонията. Мускулната слабост се обективизира чрез проведеното мануално-мускулно тестване (ММТ). МД1 пациентите съобщават основно за следните първоначални 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 крайниците, аксиалната мускулатура, лицевите и дъвкателните мускули. Резултатите са групирани и представени в табличен вид, съответно спрямо пола и възрастта на начало на заболяването.

**Графика №2 Разпределение на пациенти 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%). Трима от пациентите, които са с вродена форма на заболяването са с 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%). Въпреки, че не се открива статистически значима зависимост на първите симптоми от пола (p=0,813), от графика №2 може да се види, че процентът 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%, както и миотония и слабост в четирите крайника – при мъже 58%, а при жени – 42%.

### **1.2.2 Разпределение на пациентите по първи симптоми и начална възраст на заболяването.**

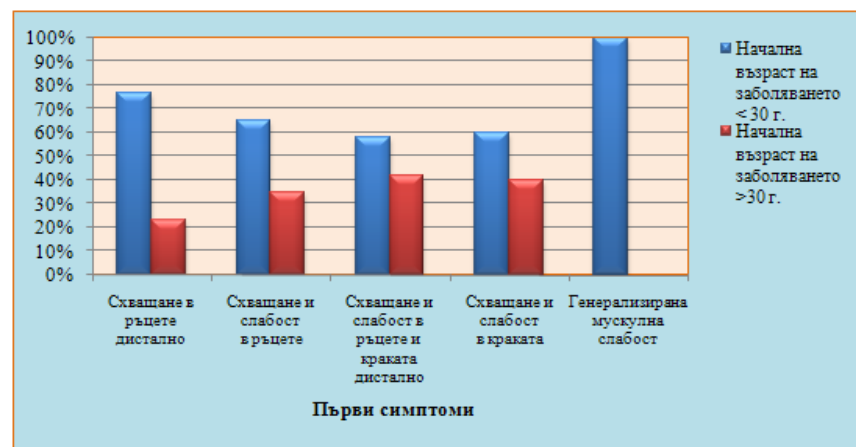
Данните за първите симптоми на заболяването са съотнесени и спрямо условно разделените възрастови периоди (под и над 30г.) (графика №3). **\*Не са включени асимптомни пациенти с МД1 (n=3)**

на пациенти с вродена форма и на тези с начало в ранна детска възраст. Алелът при първите е по-голям от този на майки, чиито потомство е с начало на заболяването в по-зряла възраст. Автори като Lavedan C, Harley H.G., установяват подобна корелация относно майките на индивиди с вродена МД1 (Harley H.G., съавтори, 1993; Lavedan C., съавтори, 1993; Tsilfidis C., съавтори, 1992). Трябва да се има предвид, че членовете на една част от засегнатите семейства, са изследвани с методиката TP-PCR, определяща наличието на експанзия, без точният размер на повторенията, 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. 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 J.W, 2003).

. 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, и 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 броя на CTG тринуклеотидите, 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 експанзията, така и между антиципацията и с размера на експанзията. Анализирани са 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, че първо унаследяването на мутантния ген от майката при >400CTG повторения (87,0%) е по-често срещано, в сравнение със съответното унаследяване от бащата (63,2%), и второ, че при пациентите с по-голям размер на експанзията се наблюдава по-често феномена антиципация в поколенията. За по-детайлно характеризирани механизма на антиципацията разглеждаме средният размер на експанзиран алел при майки

**Графика №3 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%). 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 >30г., са схващане и слабост в четирите крайника, дистално ( $n=10$ , 42%). Въпреки това не се доказва статистически значима зависимост на вида първи симптоми от възрастовия период на изява ( $p=0,691$ ).

### 1.3 Сърдечно засягане

#### 1.3.1 Отчетени кардиологични нарушения при МД1.

При МД1 се наблюдава, като част от мултисистемния характер на заболяването, кардиологично засягане, проявяващо се

предимно като ритъмно-проводно нарушение. В 40.4% (n=17) от общо изследваните с 24- часов Холтер ЕКГ (n=42) са с данни за промени в записа. От общо отчетените ритъмно-проводни нарушения в 82.3% (n=14) се регистрират: редки надкамерни (<100/24ч.) и камерни (<30/час) екстрасистоли. Резултатите от кардиологичните изследвания на пациенти с МД1 показват, че при един пациент се среща повече от едно патологично отклонение.

### **1.3.3 Разпределение на пациентите според мускулната слабост и кардиологичните нарушения.**

От изследваните МД1 пациенти, които са с данни за кардиологични нарушения 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. При останалите 20.5% (n=9) са отчетени стойности от ММТ >3т. 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).

Докато при пациентите с по-малък размер на експанзията, под 400 СТГ, 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 пациенти с МД1, което показва, че прогнозираната дължина на прогениторният алел е основен модификатор за възрастта 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 връзка между размера на повторите и наличието на антиципация (p=0.063). Дори в случаите с по-малък размер на експанзията процентът с антиципация е по-голям от този на групата с по-голяма експанзия.

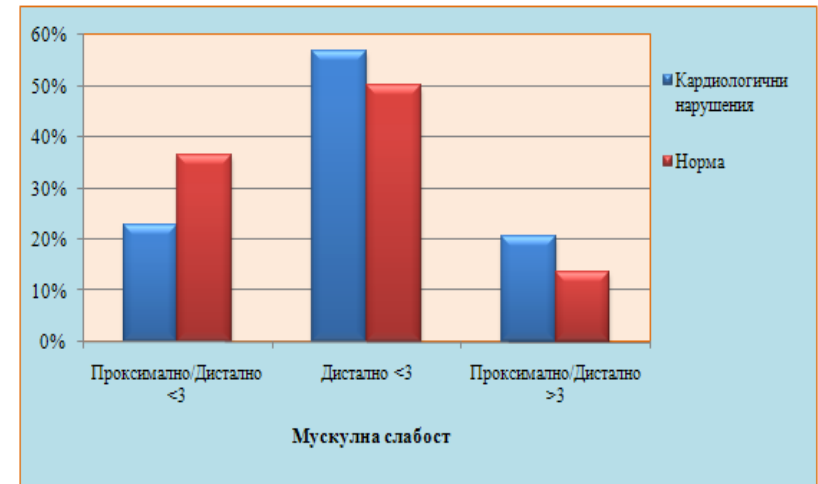
Изследваните МД1 семейства са с установена антиципация, както на базата на нарастване на броя на повторенията, така и на съответните клинични данни, за по-ранно и по-тежко засягане на следващите поколения. Предвид съществуващата хипотеза за значението на пола на родителя, по отношение промяната в броя 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 на 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 по-голяма част, изследваните пациенти са със симптоматична изява между 20 и 50г., представляващи класическата форма на МД1.

От 56 генетично изследвани пациенти чрез Southern blot, с определяне на дължината на триплетният повтор, сме разгледали разпределението на CTG повторенията. В нашата кохорта размерът на експанзията варира от 50-1500 CTG, като средният размер на CTG копията е около 636 CTG. По данни на IDMC от 2000г. (The International Myotonic Dystrophy Consortium), както и на Lavedan С., съавтори, МД 1 индивиди с изява в зряла възраст имат широка гама от брой CTG повторения, грубо между 100 и 1000, средно ~ 650 CTG, докато вродена и в детска възраст форма на МД1 имат повече от 1000 повтора, средно ~ 1200 повтора (Lavedan С., съавтори, 1993; The International Myotonic Dystrophy Consortium - IDMC, 2000). В представеното от нас проучване сме обособили две групи: с  $\leq 400$  и с  $> 400$  повтора CTG. По подобен модел, Valaperta R. разделя пациентите на две групи по отношение на невромускулните и кардиологични нарушения при МД (Valaperta R, съавтори, 2013).

Зависимостта между тежестта и по-ранното начало на фенотипната изява на заболяването е предмет на много противоречиви анализи и заключения в литературата. Резултатите от представеното тук изследване разкриват, известна зависимост на по-ранната възраст на начало и размера на експанзията над гореописания праг. В двете групи пациенти, диференцирани според размера на експанзията, броят на повторенията се съпоставя с тежестта на клиничната картина. Отчитаме, че при по-голяма част от пациентите с над 400 CTG, първите симптоми се проявяват под 30 годишна възраст.

**Графика №4 Мускулна слабост и кардиологични нарушения**



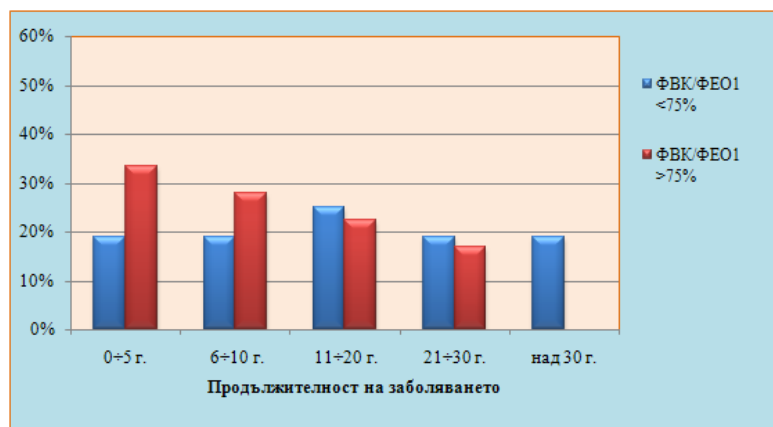
#### 1.4 Вентилаторна слабост

##### 1.4.1 Разпределение на пациентите с МД1 според продължителността на заболяването и вентилаторните нарушения.

Функционално изследване на дишането (ФИД), проведено при 52 пациенти, установява стойности на ФВК и ФЕО1 под нормата (ФВК/ФЕО1 < 75%) при 32 (61.5%) от МД1 пациентите. Представените резултати, очертават нарастване на пациентите, с понижени вентилаторни показатели, аналогично на увеличаващата се продължителност на заболяването. В групата на МД1 пациенти, с продължителност на заболяването над 30 години, се отчитат снижени показатели на дихателните функции при всички изследвани.

Отчита се и статистически значима разлика ( $p=0.049$ ). Сравнено с параметрите на по кратките периоди (от 0-5г. и 6-10г.), където процентът пациенти в норма обхваща по-голяма част от изследваните, и в двете групи без статистически значима разлика ( $p=0.238$ ;  $p=0.459$ ).

**Графика №5 Продължителност на заболяването и ФВК/ФЕО1**



#### 1.4.3 Разпределение на пациентите с МД1 според мускулната слабост и вентилаторните нарушения.

От проведеното ФИД в 32 от случаите стойности на ФВК и ФЕО1 са под нормата. При тези пациенти данните от ММТ показват генерализирана слабост, с по-изразено обхващане и на проксималните 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.). Не се откриват статистически значими разлики ( $p=0.452$ ;  $p=0.874$ ;  $p=0.202$ ).

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.

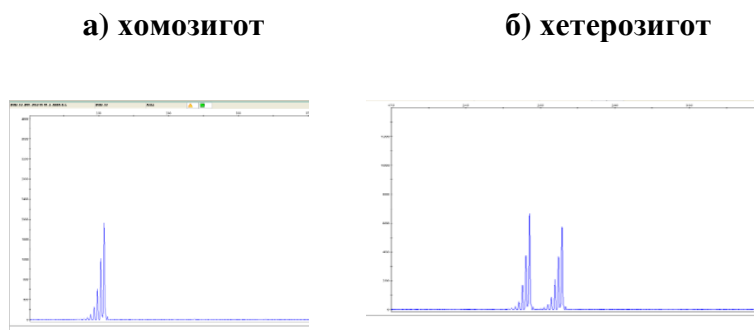
В представеното проучване молекулярно-генетичното изследване потвърждава диагнозата при 84 от изследваните в 23 фамилии. Разпределението по пол на диагностицираните от нас пациенти с МД1 е по равно и е сходно на разпределението, описано в други проучвания (Harper P.S, съавтори, 2001). Относно първите 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.

Нашите наблюдения сочат, че възрастта на изява на първите симптоми обхваща периода от първата година на живота до 58г., както и че средната възраст на първоначална изява 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, 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 по-горе казаното, ние също установяваме вродена форма, с начало в детска и ювенилна възраст.

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.

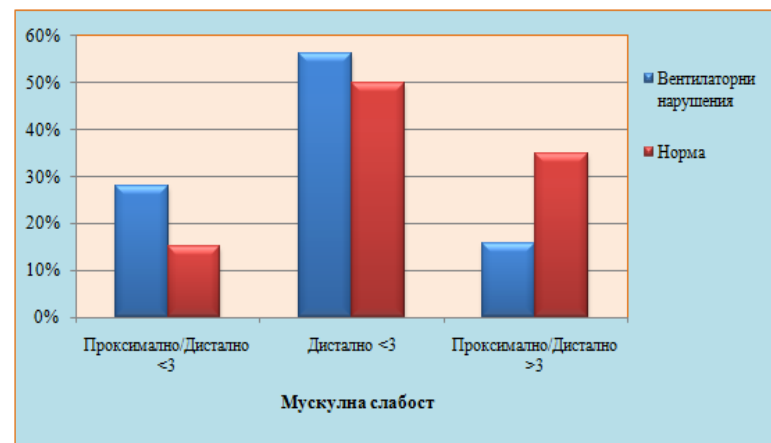
**Фигура 3** Електрофореграма на PCR продукт за амплифициране на CCTG повторената област от *CNBP (ZNF9)* гена:



#### IV. ДИСКУСИЯ

Миотоничната дистрофия е една от най-честите мускулни дистрофии при възрастните, с честота 1:8000 (12,5 на 100 000 души).

**Графика №6** Мускулна слабост и вентилаторни нарушения



#### 1.5 Невроофтالمологични нарушения при пациенти с МД1

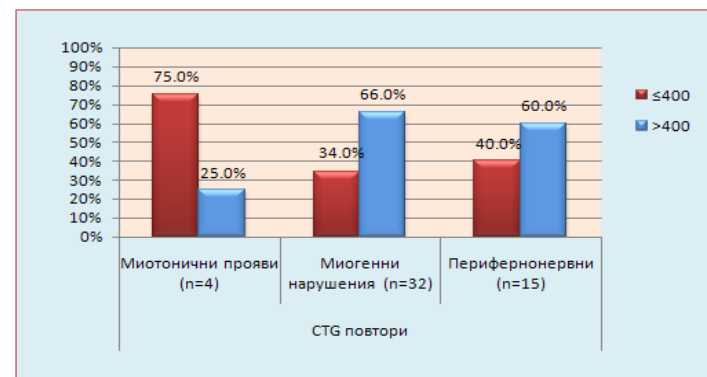
От проведени при 68 пациента невроофтالمологични изследвания при 44 (65%) се открива офтالمологична симптоматика. Като най-чести и специфични за заболяването нарушения са промените в лещата, слабост на м. леватор палпебре супериор и мм.орбикуларес окули, както и в някои случаи – засягане на екстраокуларните 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 околomotorиката, включващи двустранна птоза се диагностицират при 23 пациенти, като при един от тях тя е унилатерална. Хипофункция на екстраокуларните мускули, се наблюдава при 6 пациенти, инсуфициенция на конвергенцията при двама. Откриват се ретинални промени при директна офтالمоскопия 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 пациенти; докато промени в лещата по типа на „*iridescent dust*” (цветен прах) е наблюдавана при 13 пациенти. Тип задна субкапсуларна катаракта (posterior subcapsular cataract) е намерена при 3 от пациентите; комбинирана катаракта (задна субкапсуларна катаракта и иридесцентен прах) е налична при 9 пациенти\*\*. Оперирани от катаракта към момента на изследването са 12 пациенти, на възраст под 60г., като най-ранната възраст е 30г.\**Провел изследването д-р Росен Георгиев,\*\* Провели изследването: проф.д-р С. Черникова, д.м.н; д-р В. Бориславова.*

### 1.6 Неврофизиологични изследвания

Проведени са електромиографии (ЕМГ) при 75 пациенти, както и електроневрографии (ЕНГ) в търсене на перифернонервна увреда. В 97% (n=73) от тях чрез иглено ЕМГ са установени миотонични залпове, миогенни промени, перифернонервна увреда на сетивни и двигателни влакна в четирите крайника. При 87% (n=65) от пациентите с МД1 се наблюдават промени в записа, характерни за миогенна увреда. В 11% (n=8) се установяват миотонични прояви без данни за миогенна увреда. В един от случаите 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 полиневропатия (ПНП) по аксонен тип за двигателните влакна на горни и долни крайници.

**Графика №16 Зависимост между ЕМГ нарушения и брой СТГ**



## 6. 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. 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. 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.

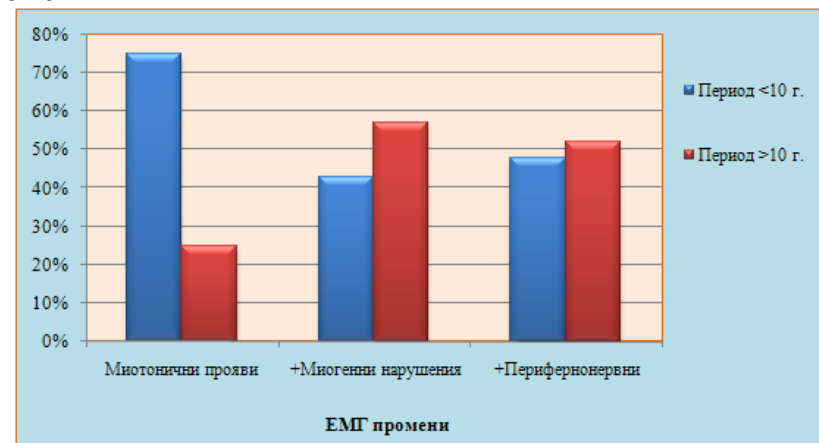
## 5.6 Зависимост между ЕМГ промените и броят СТГ

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 >400 СТГ (66%). Шейсет процента от пациентите с перифернонервно нарушение са с >400 повтора, а останалите са с по-малък размер на експанзията. Потърсена е корелационна зависимост между пациентите с данни от ЕНГ за перифернонервна увреда и броят на повторите в експанзирания алел, но не се открива подобна връзка ( $p=0.809$ ). От графиката са видни процентните разлики, в групите с под и над 400 СТГ, 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  $\leq 400$  СТГ и в 66% от групата с >400 СТГ. 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 ( $p=0.809$ ).

## 1.6.1 Разпределение на пациентите според ЕМГ промените и продължителност на заболяването, пол, възраст, захарен диабет тип 2, дислипидемия.

При 57% периодът на развитие на заболяването е >10г., 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) и 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 обеситас III степен.

Графика №7 Продължителност на заболяването и ЕМГ промени



## 1.7 Промени в лабораторни показатели на пациенти с МД1:

1.7.1 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 и до 570 U/L при жените.

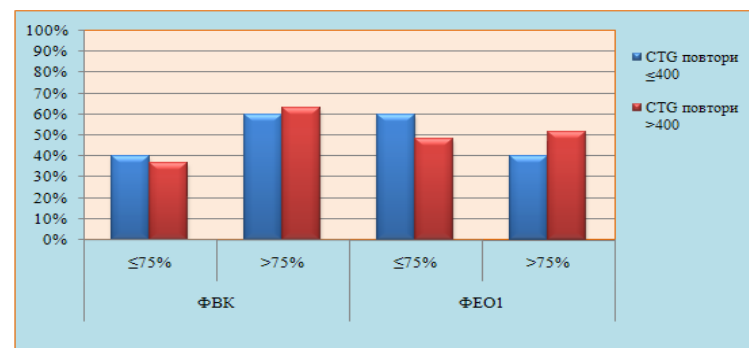
1.7.2 Гама-глутамилтрансфераза (ГГТ)- от общо 58 изследвани пациенти с МД1, стойностите на ГГТ са повишени при 19 (33%), като при мъжете те достигат до 463 U/L, а при жените до 296 U/L. Трябва да се подчертае липсата на чернодробна патология от друг произход по време на изследването.

1.7.3 Щитовидни хормони (Т3, Т4, ТСХ)- при 53 изследвани пациенти с МД1, стойностите на Т3, са в референтни граници. Стойностите 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 на 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, а в други два случая е понижено, съответно до 0.015 и 0.199 mU/L.

1.7.4 Имуноглобулини: от изследвани общо 38 пациенти с МД1, за имуноглобулин тип Г (ИгГ), снижение под прицелните стойности, се отчита при 18 (47%).

1.7.5. Кръвна захар: От проведените изследвания за кръвна захар на 66 пациенти с МД1, 13 (19.7%) са с данни за повишени стойности.

## Графика №14 Относителен дял на пациентите по ФВК/ФЕО1 и брой СТГ



## 5.5 Зависимост между ритъмно-проводните нарушения и броят СТГ повтори

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 СТГ е без данни за статистически значима разлика (p=0,611).

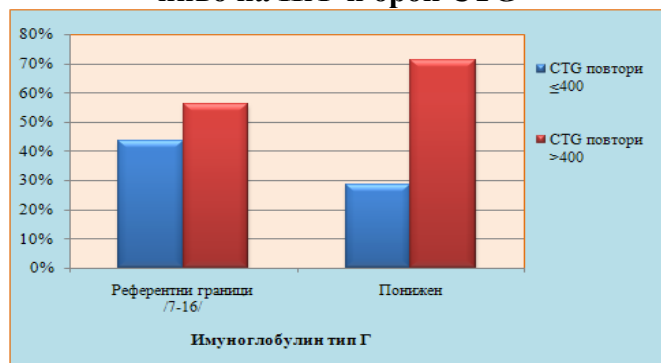
## Графика №15 Ритъмно-проводни нарушения и брой СТГ



### 5.3 Разпределение на пациентите според нивото на имуноглобулин тип Г и СТГ

Серумните нива на имуноглобулините са изследвани при 29 от МД1 пациентите, които са с определен брой СТГ повторения. Процентния дял на пациенти с понижени стойности на ИгГ и размер на експанзията >400 СТГ е по-голям (71,4%) от този на пациентите с понижени стойности на ИгГ и СТГ ≤ 400 (28,6%). Не се установява статистически значима разлика между съответните групи (p= 0,389).

Графика №13 Относителен дял на пациентите по ниво на ИгГ и брой СТГ



### 5.4 Зависимост между понижените вентилаторни показатели и броят СТГ

Потърсена е зависимост между броя повтори и проявите на вентилаторна слабост, като не се наблюдава статистически значима такава между понижените стойности на форсирания витален капацитет (ФВК) и броят на СТГ повторенията (p=0,849) от една страна, и на форсираният експираторен обем (ФЕО1) и СТГ от друга (p=0,461).

## 2. КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕН АНАЛИЗ НА ПАЦИЕНТИ С МД2

Клинико-генетично са изследвани шест пациенти с МД2, от които двама мъже и четири жени. Възрастовият диапазон на пациентите към момента на прегледа варира от 42г. до 57г., средната възраст е 55,5г. Възрастта на изява на първите симптоми обхваща периода от 40 - 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. 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 проксималните мускулни групи в четирите крайника. Данните от ЕМГ записите показват патологична находка при петима пациенти. 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 от ЕНГ изследванията.

По отношение на кардиологичните нарушения при пациенти с МД2, могат да се отдиференцират: нарушена левокамерна релаксация/диастолна дисфункция – двама от изследваните; горногранична дебелина на лява камера с дегенеративни промени на аортната клапа и митрална регургитация в един случай; пароксизмална аритмия при 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 неврофотальмологичен признак, който е налице в 100% от изследваните пациенти. Наблюдават се, при пациент с МД2, множество цветни опакитати (сини и зелени), с 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.

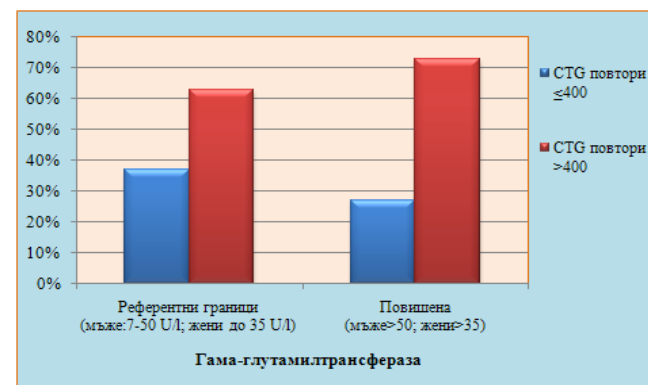
**Графика №11 Относителен дял на пациентите по ниво на КФК и СТГ**



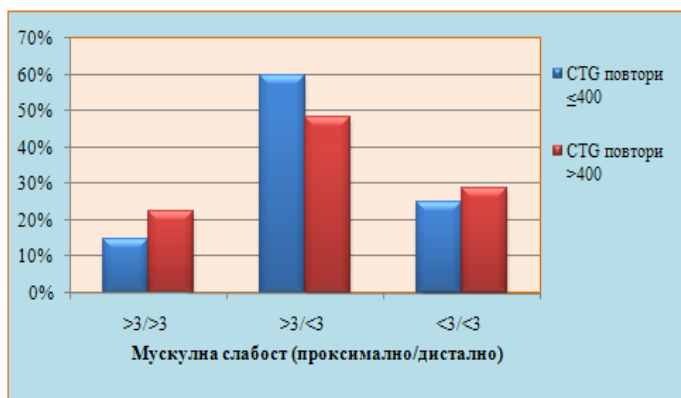
### 5.2 Разпределение на пациенти според ниво на гама-глутамилтрансфераза и СТГ

В резултатите, на общо изследваните 45 пациенти както за брой СТГ така и за ГГТ, не се установява съществена процентна разлика между групата с над 400 (73%) и тази с под 400 СТГ (63%) по отношение на абнормните стойности на ГГТ. Не се установи и статистически значима зависимост между съответните показатели (p=0.502).

**Графика №12 Ниво на гама-глутамилтрансфераза и СТГ**



**Графика №10** Относителен дял на пациентите по мускулна слабост и брой СТГ



### 5. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНИ ЗАВИСИМОСТИ ПРИ МД1 ПАЦИЕНТИ.

От изследваните пациенти с определен размер на експанзията (n=56), се потърси зависимост между броят на СТГ повторенията 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.

#### 5.1 Разпределение на пациентите според нивото на креатинфосфокиназа и СТГ.

В процентно отношение над половината (56.5%) от пациентите с установени повишени стойности на КФК, са с > 400 СТГ. В групата на пациентите с нормални стойности на КФК в 70.8% от случаите също се касае за пациенти с >400 СТГ. Не се установява корелация между броят на СТГ при МД1 и повишените стойности на мускулният ензим (p=0,307).

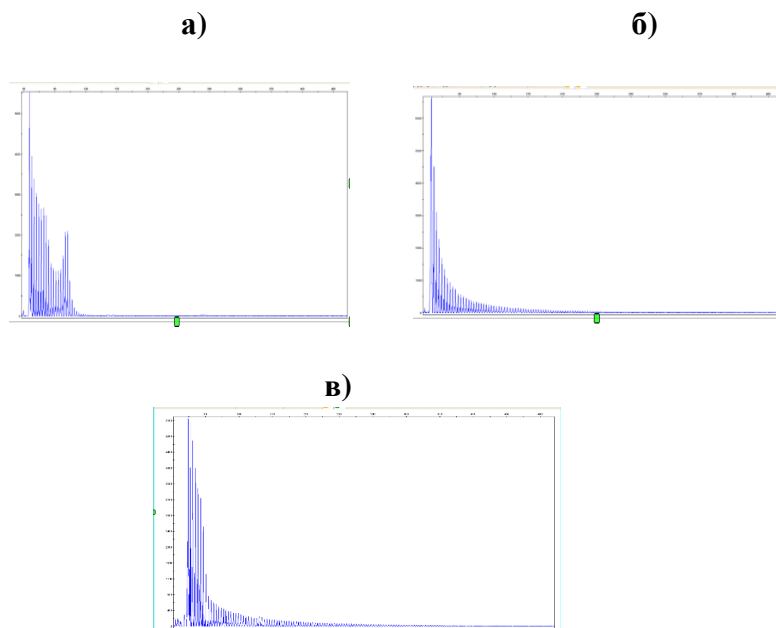
## III. РЕЗУЛТАТИ ОТ ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Клинично диагностицирани са 92 пациенти с МД. От тях 84 са с генетично потвърдена диагноза, като анамнестично се описва фамилност при 66 от тях (79%), с генетично потвърждение при 55 (65%) от случаите. Установени са мутации в гените, отговорни за МД1 и МД2. 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.

### 1. ГЕНЕТИЧНИ РЕЗУЛТАТИ ПРИ МД1.

При 56 от установените с МД1 пациенти е приложен PCR/Southern blot метод за определяне броя на СТГ повторенията 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 алела с експанзия, но без точното определяне размера на експанзията. При тези пациенти първоначално, като метод за отхвърляне на диагнозата МД1, се използва PCR анализ. Анализът на резултатите показва, че най-честият, немутантен алел е с 5СТГ, отбелязан при над половината от изследваните, като от друга страна най-тежкият, нормален алел е с 39 СТГ. Пациентите с отхвърлена чрез PCR анализ диагноза, са хетерозиготи или хомозиготи с два нормални алела. Останалите 23 пациенти са с неотхвърлена МД1 диагноза - те са хетерозиготи с един нормален и един мутантен алел. При тях се продължава изследването чрез TP-PCR. На фигура №1 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 СТГ), докато във втория (б) се наблюдава само един нормален алел с 5 СТГ и един алел с увеличени (>50) СТГ; в третия резултат (в) има един нормален алел с 12 СТГ и налична експанзия.

**Фигура №1** Електрофореграми на TP-PCR продукти, амплифицирани CTG-повторения в DMPK гена:



Обхватът от CTG повторите е от 50 до 1500. В най-голям процент (80,3%,n=45) са с обхват от 150 до 1000. При изследваните от нас пациенти средният размер на CTG повторенията 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 пациенти с МД1, са разделени условно на две групи: 33 с брой на CTG >400 и 23 с брой на CTG ≤ 400.

**Графика №9** Относителен дял на пациентите по начало на заболяване и брой CTG

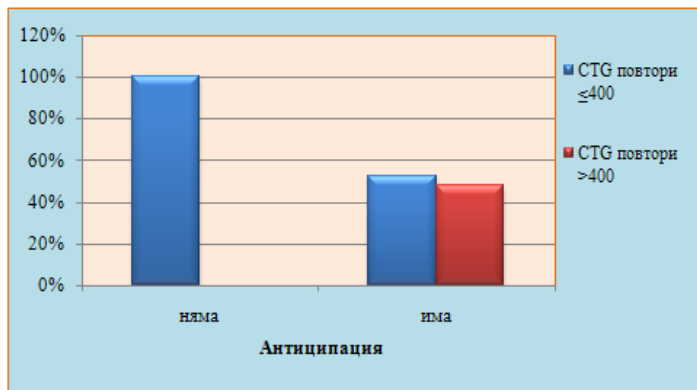


#### **4. МУСКУЛНА СИСТЕМА ПРИ МД1.**

##### **4.1 Зависимост на мускулната слабост от броят на CTG**

Оценени чрез ММТ, мускулните групи с изразена слабост са тези < 3т. От групата с ≤400 CTG, 60% са с по-изразена слабост дистално (>3/<3), а при тези с >400 CTG процентът е 48.4%. Дялът пациенти с оценка <3т. в дистални и проксимални мускули е почти еквивалентен в групите с под (25%) и над (29%) 400 CTG. Не се установява и статистически значима разлика между изследваните показатели в отделните групи (p=0.759;0.601;0.993).

**Графика №8 Относителен дял на пациентите по антиципация и брой СТГ**



### 3.4 Зависимост между възрастта на начало и броят СТГ

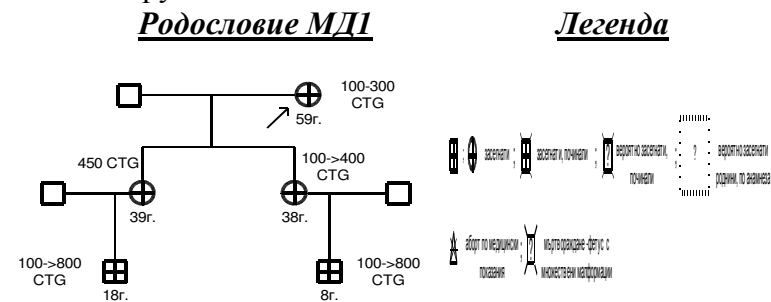
Когато обаче се сравняват брой повторения и възраст на начало на заболяването се отчита, че при 69,7% от пациентите с проява на първите симптоми във възраст под 30г. са с установени от генетичното изследване брой повторения > 400 СТГ.

В групата пациенти с изява на симптомите над 30г. се отчитат в по-голям процент от тях ≤ 400 СТГ. Намерена е и зависимост между възрастта на начало и броят повторения в експандирания алел ( $p=0,032$ ).

## 2. ФАМИЛНИ ФЕНОТИП-ГЕНОТИП ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИ МД1.

За да се илюстрира наличието на антиципация, са разгледани 14 семейства с МД1, селектирани според клинично-генетичната им характеристика\*. Проследява се възрастта на начало и тежестта на заболяването в поколенията, съпоставени с броя на СТГ повторенията.

**Семейство МД1:** Индексен пациент е жена на 59г., с две дъщери на 39г. и 38г. и техните две деца съответно на 18г. и 8г. С начало при индексната пациентка на възраст 43г. и при една от дъщерите (38г.) на възраст 25г., с прояви на слабост и миотония в ръцете дистално. При другата (39г.) дъщеря заболяването е с начало на 15 г. със слабост в краката. При по-малкият от внуците (8г.), първите симптоми са с начало от 7 годишна възраст, а при по-големият (18г.) от 16г. При по-големият (18г.) внук се отчитат хипотрофии и в четирите крайника, перонеална и тибиялна пареза, еквиноварусни деформитети на стъпалата, хипотрофии на дъвкателни мускули, дисфагия, леко умствено изоставане, IQ=55. От генетичното изследване: мозаицизъм и нарастване на броя СТГ: от 100-300 СТГ в I-во, съответно 450 СТГ и 100->400 СТГ в II-ро, до 100->800 СТГ в III-то поколение. Тези и клиничните данни предполагат наличие на механизми на антиципация.\*Останалите семейства са описани в дисертационния труд.



### **3. АНТИЦИПАЦИЯ ПРИ МД1**

От МД1 семействата, 14 са с установен феномен на антиципация\*. В три от останалите седем семейства са изследвани членове, които са сиблинги и не е възможно установяването на този феномен. В другите четири фамилии, членовете са изследвани с TP-PCR метод, който определя наличието на експанзия, без точен брой СТG. Изследваните 14 семейства са с установена антиципация както на базата на нарастване на броя на повторенията 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.\**Описани подробно в дисертационния труд.*

#### **3.1 Зависимост между антиципацията и линията на унаследяване**

От 25 семейства, 90% (n=9) от случаите, в които заболяването се унаследява чрез майката, са с данни за антиципация. При тези с унаследяване по бащина линия, в 86.7% (n=13) са 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 повторенията при майки на пациенти, както с вродена форма, така и с начало в ранна детска възраст (1-5г.).

В първият случай броят е ~700 СТG и е съответно по-голям от този на майки, чието поколение е с начало на заболяването в юношеска и зряла възраст, където средният размер е ~360 СТG.

#### **3.2 Зависимост между броят СТG и линията на унаследяване**

От разгледаната връзка между броят на повторенията и линията на унаследяване, се вижда, че в 87% от случаите с унаследяване на заболяването по майчина линия, СТG повторенията са над 400. От тези с унаследяване по бащина линия 63.2% са с >400 СТG. Не се открива статистически значима корелация между показателите (p=0.075).

#### **3.3 Зависимост между наличието на антиципация и броят СТG**

Опит за установяване на подобна зависимост, е направен и по отношение на пациентите с диагностициран брой на повторенията и наличието на антиципация. Пациентите са разделени на две групи, съответно с  $\leq 400$  СТG повторения и с >400 СТG. При 52.2% от пациентите с по-малък размер на експанзията се установява наличие на антиципация, в сравнение с 47.8% от пациентите с по-голяма дължина на повторенията. Не се открива зависимост с антиципацията (p=0.063).