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

Завеждащ Катедра: проф. д-р Юлия Петрова, дмн

Научна специалност 030119 Неврология

Д-р Ани Стефанова Танева-Рачева

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

Автореферат

на дисертационен труд

за присъждане на образователната и научна степен "Доктор"

Научни ръководители:

Проф. д-р Ивайло Людмилов Търнев, дмн

Доц. д-р Теодора Кънчева Чамова, дм

София, 2023 година

Дисертационният труд е написан на 186 машинописни страници, включващи 9 таблици и 27 фигури. Библиографският списък съдържа 453 литературни източника, от които 6 на кирилица и 447 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрен съвет на Катедра по неврология при Медицински университет- София на 22.11.2022г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 03.05.2023г. от 14:00 ч. в Аудиторията на Клиника по нервни болести, УМБАЛ „Александровска“- София, при научно жури в състав :

1. Доц. д-р Десислава Богданова, дм (рецензия)
2. Проф. д-р Пенка Атанасова, дмн (рецензия)
3. Проф. д-р Силвия Чернинкова, дмн (становище)
4. Доц. д-р Росен Русев, дм (становище)
5. Доц. Д-р В. Гергелчева, дм (становище)

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ- София и са на разположение на интересуващите се в Библиотеката на Клиника по нервни болести- УМБАЛ „Александровска“, София, бул. “Св. Георги Софийски“ №1.

Забележка: Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Съдържание

Въведение 5

1. Цел и задачи 6

1.1. Цели на проучването: 6

2.1 Задачи на проучването: 6

2. Клиничен контингент и методи на изследване 7

2.1. Контингент 7

2.2. Методи на изследване 7

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ 11

3.1. Генотип-фенотип корелации и епидемиологични данни при групите с ПКМД 12

3.1.1. Гамасаркогликанопатия 12

3.1.2. Калпаинопатия 18

1.1.2. Телетонинопатия 34

1.1.3. ПКМД 2Z/R21- POGLUT1 асоциирана 43

1.1.4. Аноктаминопатия 50

2. ИЗВОДИ 53

3. ПРИНОСИ 54

7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД: .. 55

Публикации: 55

Използвани съкращения:

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

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

Въведение

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

Сред тях, Пояс-крайник прогресивната мускулна дистрофия (ПКМД) е широка и хетерогенна група наследствени мускулни заболявания, включващи слабост на проксималните тазови или раменни мускули. Клиничният фенотип варира и включва както тежки форми с ранно начало в детска възраст, така и такива с начало в юношеска възраст, по-леки форми с късно начало, при които засегнатите индивиди имат бавна прогресия на мускулната слабост и относително запазена продължителност на живота. Те са генетично хетерогенна група, при която все още молекулярно- генетичната диагноза остава предизвикателство.

Основна цел на настоящото изследване е проучване на клинико- генетичните корелации и генетичната епидемиология на формите на Прогресивна мускулна дистрофия тип пояс-крайник в България. До сега не е провеждано подобно проучване в България, което да обобщи тази патология в българската популация, да фенотипизира българските пациенти, и да определели спецификата на разпространение на заболяването. Това би могло да бъде в полза при диагностицирането на подобни случаи в бъдеще, както и да даде основата на следващи проучвания в тази област.

1. Цел и задачи

1.1. Цели на проучването:

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

2.1 Задачи на проучването:

За постигането на гореописаните цели са поставени следните задачи:

1. Събиране на кохорта от пациенти със следните клинични характеристики:
   •проксимална мускулна слабост, ангажираща долни и/или горни крайници, които отговарят на посочените в определението за ПКМД.
2. Извършване на генеалогичен анализ на семействата на тези пациенти.
3. Потвърждаване на диагнозата с необходимия ДНК анализ за определяне на генотипа на всички пациенти.
4. Провеждане на подробно клинично изследване на пациентите за прецизно определяне на фенотипа им и сравняване с характерния за заболяването фенотип.
5. Провеждане при възможност на невроизобразяващи изследвания на мускули при пациентите и сравняване на резултатите с описания в литературата модел на мускулно засягане при съответната форма на заболяването.
6. Проучване на епидемиологията на формите на заболяването с установени по-голям брой пациенти.
7. Информиране на пациентите относно стандартите на грижи и необходимостта и важността от проследяване на сърдечната и дихателната функция.
8. Насочване на пациентите и техните семейства за провеждане на генетично консултиране и информиране за възможността за генетична профилактика в семейството.
9. Включване на пациентите в регистри, за да имат възможността да бъдат включени в бъдещи варианти за етиологично или патогенетично лечение.

2. Клиничен контингент и методи на изследване

2.1. Контингент

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

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

- 73 пациенти с гама-саркогликанопия.
- 34 пациенти, като 32 са с АР форма, а двама представители са семейство баща и дъщеря, носители на мутация, отговорна за АД калпаинопатия;
- 19 пациенти с телетонинопатия
- 3 пациенти с POGLUT1 свързана ПКМД 2Z/R21
- 1 пациент с аноктаминопатия.

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

2.2. Методи на изследване

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

1 Пълна анамнеза, включително фамилна;

2 Неврологично изследване;

3 Физиотерапевтична оценка-

Физиотерапевтичната оценка като част от неврологичния преглед е проведена с цел да се установи обективно мускулната слабост по мускулни групи посредством скала MRC (Medical research council);

4 Биохимични- креатинфосфокиназа (КФК);

5 Електрофизиологично изследване- ЕМГ, ЕНГ; провеждани са в Клиниката по нервни болести в УМБАЛ „Александровска“ и на теренни проучвания с преносим електромиограф Dantec– Keypoint (Natus, Copenhagen, Denmark);

6 Изследване на дихателната функция с функционално изследване на дишането (ФИД);

7 Изследване на сърдечната функция с електрокардиограма (ЕКГ) и ехокардиография (ЕхоКГ);

8 Генетично изследване:

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

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

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

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

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

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

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

Процедура:

- Намножаване на желания ДНК фрагмент чрез PCR:

Извършва се при установените оптимални условия за съответния участък.

- Пречистване на намножения продукт:

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

- Провеждане на секвенционна реакция:

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

- Преутаяване на секвенционния продукт:

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

- Разтваряне на секвенционния продукт:

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

- Визуализиране и отчитане на пробите:

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

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

- 17 пациенти с телетонинопатия. От всеки пациент са взети 10 ml. периферна кръв в K2EDTA епруветки. Процедурата на изсоляване е използвана за екстракция на ДНК от получените проби, концентрацията на ДНК е оценена на спектрофотометър nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc). За PCR амплификация са използвани два комплекта праймери за екзон 1 и екзон 2 на TCAP ген. Тези праймери генерират

ампликони съответно от 294 и 506 bp. Всички проби бяха амплифицирани на Applied BiosystemsTM VeritiTM Thermal Cycler, (Thermo Fisher Scientific Inc). Секвенирането на PCR продукти се извършва с помощта на BigDye terminator v3.1 на ABI PRISM 3130xl генетичен анализатор.

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

- MYO-SEQ project – Международно изследователско сътрудничество, което прилага целенасочено секвениране на целия екзом (WES) на най-голямата събирана кохорта от пациенти (1000) с недиагностицирана проксимална мускулна слабост. ДНК пробите бяха изпращани в Newcastle Medical Research Council (MRC) Centre Biobank for Neuromuscular Diseases. Таргетно пълно екзомно секвениране (WES) е извършено в Broad Institute с помощта на Illumina exome capture и 38 Mb таргетни примамки с >250 ng ДНК. Наборът от потенциални варианти е качен в xBrowse и е извършен анализ на 169 кандидат- гени за пояс-крайник тип мускулна слабост. Използваната технология е HiSeq X Ten, Illumina Genome Analyzer IIx, Illumina HiSeq 2000. По този проект от нашата кохорта са доказани 1 пациент с аноктаминопатия, 2 пациенти с *CAPN3*, 1 пациент с телетонинопатия и 3ма пациенти с *POGLUT1* асоциирана ПКМД 2Z/R 21.

- Саркогликанопатия:

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

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

-извършва се директна амплификация на екзон 8 на *g-SG* гена върху сухи кръвни петна от карти на Guthrie, последвана от анализ на полиморфизъм на едноверижна конформация (SSCP). Наличието на мутацията е потвърдено чрез RsaI рестрикционно смилане.

Проби с различен SSCP модел на миграция са секвенирани с ABI PRISM 310 генетичен анализатор.

9. Образна диагностика

- На двама пациенти с телетонинопатия е оценен моделът на мускулно засягане на долните крайници с образно-диагностично изследване. Мускулите на долните крайници на 1 пациент са изследвани с 3 Tesla МРТ апарат (Siemens Verio). Протоколът за изследване включва неусилени T1 и PD Fat Sat секвенции са приложени на мускулите на тазовия пояс, бедрата и подбедриците. Дебелината на среза е 10 мм, а разстоянието между срезовете е13 мм. За оценка на фибро-мастното заместване на мускулна тъкан на T1 изображенията е приложен Mercuri score. (Приложение 2) Тази скала има четири степени на нарастващ интензитет на сигнала, който корелира с дистрофичните мускулни промени. За наличието на миоедем са оценени изображения с Fat Sat. протонна плътност. Компютърна томография (CT) на мускулите на долните крайници при 1 пациент е извършена на Aqulion 64 (Toshiba- 64 слайда).
- На 12 пациенти с гамасаркогликанопатия са осъществени КТ или МРТ на мускули по време на клинико- генетично и епидемиологично проучване на ПКМД гамасаркогликанопатия с C283Y мутация сред ромите в България;
- На 3 пациенти с калпаинопатия е проведено МРТ изследване на долни крайници по изследователски прокет ГРАНТ с вх. № 4874/09.07.2018 г. на тема: „Клинико-генетичен спектър на прогресивни мускулни дистрофии тип пояс-крайник в България“ в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Използван е апарат магнитен резонанс „GE Signa HDxt” 1,5 T напрегнатост на полето;
- Пациентите с *POGLUT 1* асоциирана ПКМД 2Z/R 21 са изследвани 3 Tesla МРТ — (Siemens Verio) с използвани T1 и PD Fat Sat секвенции и дебелината на среза е 10 мм.

10. Статистически методи

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

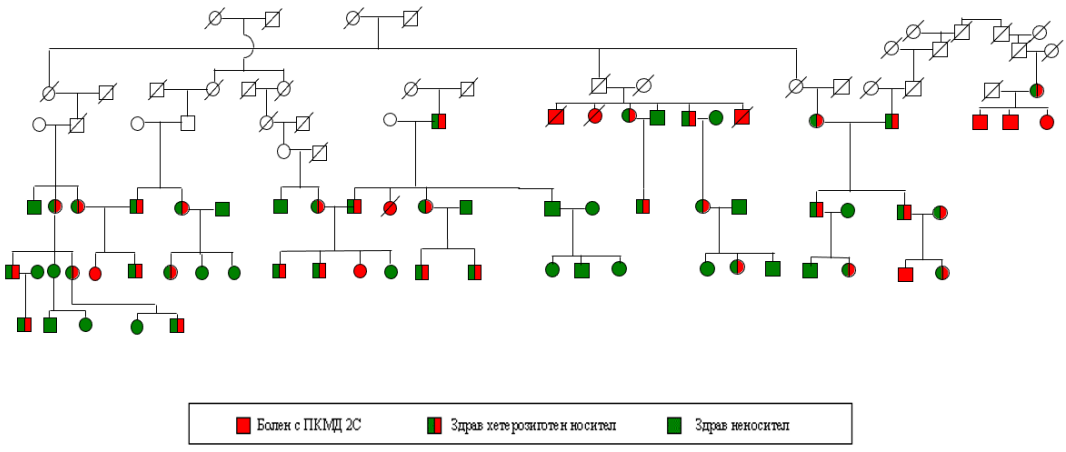
3.1. Генотип-фенотип корелации и епидемиологични данни при групите с ПКМД

3.1.1. Гамасаркогликанопатия

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

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

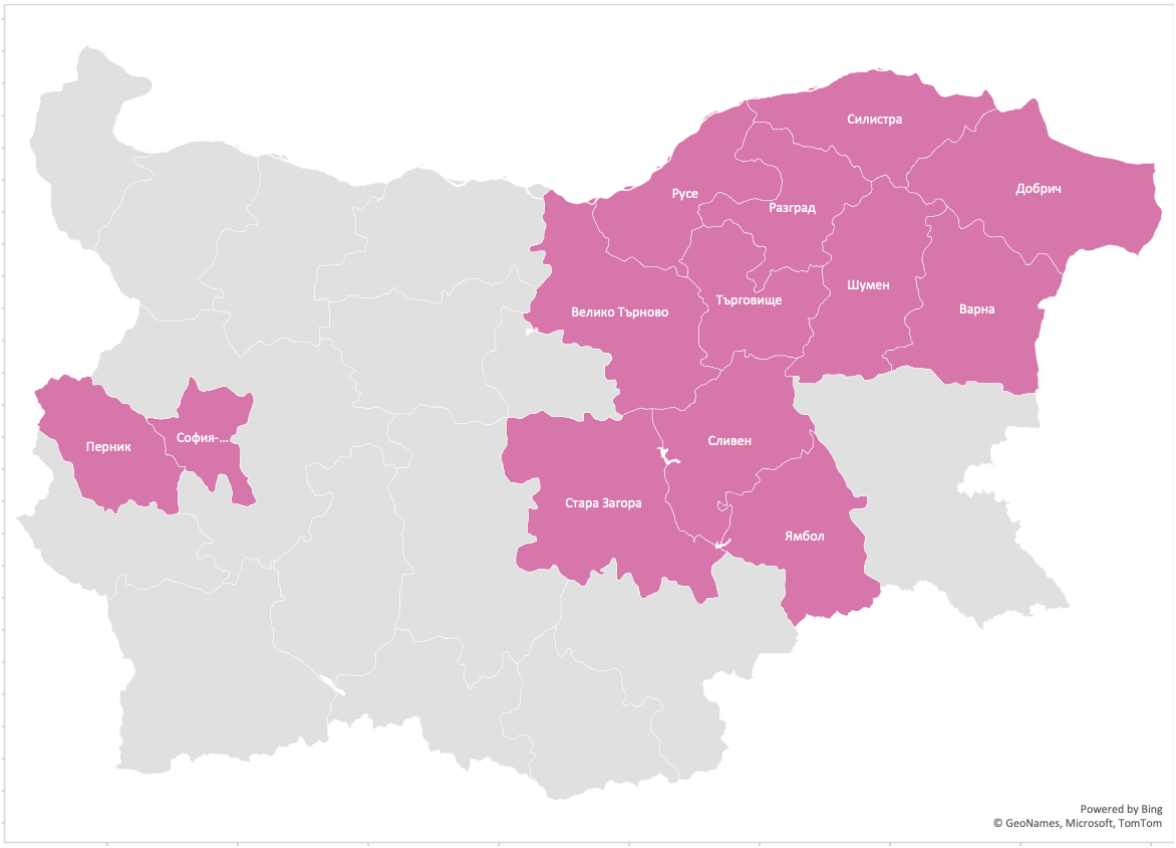
По време на теренни проучвания са идентифицирани 35 родословия със заболяването. Всички пациенти принадлежат към групата на уседналите роми мюсюлмани - милет. Няма идентифицирани случаи на ПКМД 2С в други ромски групи (Фигура 1).



Фигура 1. Родословие с ПКМД 2С, с. Априлово, с. Голямо Ново, с. Еленово, Търговищка област, с. Синя вода и с. Раковски, Разградски регион.

Заболяването е идентифицирано в 13 области- 11 в Източна България: Търговищка, Разградска, Русенска, Силистренска, Добричка, Великотърновска (най-

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



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

Заболяването в тази група пациенти започва обикновено с поява на оплаквания от промяна в походката, чести падания, ходене на пръсти, затруднения при изкачване на стълби, тичане и изправяне от клекнало положение. Средната възраст на пациентите по време на изследването е 21.9 ± 7.8 (за жените - 22.9 ± 8.7; за мъжете – 20.9 ± 7.0). Възрастта на началото на заболяването варира между 2 и 13 години.

Средната възраст на началото е 6.7 ± 2.5 г. (за жените тя е 7.8± 2.5, а за мъжете – 5.7 ± 2.0). Средната възраст на инвалидизация е 13.6 г.±3.2. За жените тя е 14.9 ± 3.7, а за мъжете – 12.4 ± 2.1. Средната продължителност на ходене след дебюта на заболяването е 6.9±3.1(за жените тя е 7.1.±3.8, а за мъжете – 6.7.±2.3). Средната възраст на настъпване на смъртта е 28.13 ± 3.5 (за жените 32.6 ± 3.1, а за мъжете 25.9 ± 3.8) Първоначално се установява мускулна слабост в тазовия пояс, а по-късно и в раменния с поява на криловидни лопатки (фигура 3).



Фигура 3. Пациент с ПКМД 2С на 13г., с. Майско, общ. Елена.

На по-късен етап се засяга паравертебралната мускулатура, проявяваща се с лумбална хиперлордоза. Контрактури на глезенните стави се откриват след 8-годишна възраст. В по-напредналите стадии мускулната слабост става дифузна, въпреки че най-тежко са засегнати тазовия и раменния пояс, и особено mm. glutei, psoas, sacrospinalis, periscapularis и trapezius. В проксималната мускулатура на крайниците е налице ранно селективно засягане на флексорите (m.biceps bachii и m.flexor femoris) с относително добро съхранение на екстензорите (m.triceps brachii и m.quadriceps). Дисталната мускулна сила е запазена дори и при най-възрастните пациенти. При нито един

пациент не се установява лицева и булбарна мускулна слабост. Псевдохипертрофия на подбедриците, криловидни лопатки и лумбална хиперлордоза се наблюдават при повечето пациенти на по-ранните стадии. Макроглосия се установява при 21 от 56 пациенти (при 8/27 жени и при 13/29 мъже). Прогресираща сколиоза със значителна ригидност в шията се открива при 18 пациенти, като всички те са инвалидизирани. Сколиоза се установява при 10 мъже и 8 жени. Контрактури – при 17/29 мъже и при 15/27 жени.

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

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

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

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

КТ и МРТ на мускули на долни крайници са осъществени при 12 пациенти. Степента на мускулното засягане корелира с възрастта и етапа на заболяването при съответните пациенти. Наблюдава се симетрично засягане на поясната мускулатура, като промените прогресират дистално- по-дисталните мускулни групи се запазват по-дълго в хода на заболяването. Mm. glutei (medius и minimus) са минимално засегнати при двамата по-млади пациенти, които могат самостоятелно да изкачват стълби;

умерено засегнати при 10 до 12 годишни пациенти, които ходят все още самостоятелно; тежко засегнати са при пациентите, които са неспособни да ходят; напълно заместени с мастна тъкан при най- възрастните и най-тежко инвалидизираните пациенти. M. subscapularis и m. trapezius са минимално засегнати при по-младите пациенти, при които m. deltoideus е съхранен. Тежко засегнати на възраст между 12 и 14 години, когато m. deltoideus е минимално до умерено засегнат; и напълно атрофични при най-възрастните пациенти, при които се откриват следи от m. deltoideus. Селективно засегнати мускули при всички изследвани пациенти са mm.glutei, mm. adductori, flexor femoris, abdominalis, spinalis, supraspinatus, infraspinatus, subscapularis и soleus. В по-ранните стадии се открива относително по-тежко засягане на флексорните, отколкото на екстензорните мускулни групи в четирите крайника. В стадия на пълна инвалидизация повечето мускули са атрофични или напълно заместени от мастна тъкан, докато mm. deltoideus, quadriceps, sartorius, gracilis и gastrocnemius са относително съхранени.

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

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

При 7 пациенти е изследвана е имунохистохимичната характеристика на саркогликановите и дистрогликановите компоненти при седем пациенти с ПКМД 2С. При всички изследвани пациенти се установяват сходни промени: постоянна липса на α- дистрогликан и добре запазен β- дистрогликан. Чрез използване на различни домен-специфични антитела срещу α- саркогликана се откри относително запазване на неговия интрамембранен домен и липса на С- и N-терминалните му части. Бета-саркогликанът е тежко редуциран или липсва. Напълно липсва и γ- саркогликанът при всички пациенти. Делта- саркогликанът е относително най-добре запазен и се експресира в значително по-голяма степен при ПКМД 2С, отколкото при ПМД тип Дюшен.

Обсъждане:

ПКМД 2С е най-честата миопатия сред ромите в България, въпреки че има регионално разпространение в източна част на страната. Всички пациенти принадлежат към групата на уседналите роми мюсюлмани - милет. Няма идентифицирани случаи на ПКМД 2С в други ромски групи. Проучването на засегнатите семейства включва генетично хомогенна група от хомогенната група от 73 пациенти с ПКМД 2С, всички хомозиготни за мутацията С283Y. Заболяването е идентифицирано само в 11 региона на Източна България. Клиничните наблюдения при пациентите с ПКМД 2С подкрепят констатациите на съвместното европейско проучване [Merlini L и съавт., 2000, Merlini L и съавт., 2001] по отношение на естествения ход на заболяването, скоростта на прогресиране на увреждането, модела на мускулно засягане и липсата на когнитивно увреждане. Рестриктивният тип дихателна недостатъчност е често срещана находка [Politano L и съавт., 2001, Calvo F и съавт., 2000, Melacini P и съавт., 1999, Boito C и съавт., 2003], като в българската популация е установен само един пациент тежка дихателна недостатъчност с необходимост от инвазивна белодробна вентилация.

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

засегнати деца в едно семейство и пет допълнителни семейства с прояви на два фенотипа в тях.

Важна особеност за пациентите с гама-саркогликанопатия е значителното по-тежко протичане при мъже. Въпреки че не са наблюдавани разлики свързани с пола по отношение на началната възраст на мускулното засягане, загубата на самостоятелната походка настъпва по-рано при мъжете. По-леките фенотипове са значително по-чести сред пациентите от женски пол, с изключение на един представител, при когото е настъпила тежка дихателна недостатъчност с необходимост от ИБВ.

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

3.1.2. Калапаинопатия

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

Клиничният контингент включва 34 пациенти с генетично верифицирана калпаинопатия, принадлежащи към 29 семейства. Тридесет и двама са с ПКМД 2A/R1, а двама са представители на семейство с АД калпаинопатия- ПКМД D4. От изследваните пациенти 24 са жени (66,5%), а 12 (33.5%) са мъже.

Използвани са данни, събирани по време на теренни проучвания и чрез документацията на Клиника по нервни болести, УМБАЛ „Александровска“. Пациентите с техните генетични и клинични характеристики са описани в Таблица 1.

Таблица 1. Клинични и генетични характеристики на пациентите с ПКМД.

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

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

19;17	М	c550delA c550delA	15	11	Ходи на пръсти, качване на стълби	4/5 -	-	5/5	Не	Глезени	Да	5321	-	-	Не
20;18	М	pGlu323X pArg49His	51	13	Качване на стълби, чести падания	3/5 3/5	-	4/5	Не	Глезени, лакти	-	269	Не	-	Да, на 30
21;19	М	c.550delA /c.773G>C	11	3-4	Ходи на пръсти, болка и схващане в петите, затруднено изправяне	4+/5 5/5	Не, 5/5	5/5	да	Скъсени АС	да	9824	не	не	не
22;220	Ж	1337 G>T p.Gly446Val	17	14-15	Изправяне от клекнало положение, трудно качва стълби	3+/5 3+/5	не	4/5 4/5	да	Скъсени АС	не	3163	не	не	не
23;220	М	1337 G>T (p.Gly446Val	16	11	Умора след натоварване, повишена КФК	2/5	не	3/5 3/5	да	Скъсени АС, торако-лумбална сколиоза.	не	3681	не	не	не
24;221	ж	c550delA c550delA	36	16	Изправяне от клекнало положение, трудно качва стълби	4/5 4/5	не	4/5 4/5	да	Скъсени АС, ЛХ	не	391	не	не	Ходи с подкрепа от 34 г.в.
25;222	ж	c550delA екзон 4 9675G/T Екзон 7	24	9	Тичане	3/5 3/5	3/5	3/5	-	хиперлордоза, скъсени АС	не	2066	не	не	не
26;223	м	c550delA c550delA	12	27	Качване на стълби, тичане	2/5 2/5	5/5	2/5	да	ЛХ, лакти, коленна, глезени	не	777	нр, ФИ 56%	не	не, от 24 г.в.
27;224	ж	c550delA c550delA	16	14	Изкачване на стълби, изправяне от клекнало положение	4/5 4/5	5/5	4/5	Не	Скъсени АС, ЛХ	да, от ранна възраст	3170	не ФИ 68	не	не
28;225	ж	c550delA c550delA	12	9	Ходи на пръсти	3/5 4/5	4/5	3/5	да, Д>Л	Скъсени АС, Пес кавус	да	4092	не	не	не
29;226	м	c.550delA p.Thr184ArgfsTer36	18	11-12	Ходене на пръсти, скъсени Ах сухожилия	3/5 4/5	3/5	5-/5	да	Скъсени АС	не	114	Не, ФИ 61%	не	не
30;227	ж	c.1504_1505delAT	16	11-12	Промяна в походката, трудно ставане от клекнало положение	3/5 3/5	3/5	4/5	да	Скъсени АС ригиден гръбнак, коленни, лакътни стави	не	1376	Не, ФИ 66%	не	не
31;227	ж	c.1504_1505delAT	14	14	асимптомна	5/5 5/5	5/5	5/5	не	не	не	1666	не	не	не
32;228	ж	c550delA екзон 4 985G/A Екзон 7	30	27	Трудно качване на стълби/ Ходене по нагорнище	3/5 3/5	не	5/5/ 4/5	Да, Д>Л	ЛХ, скъсени АС	Да, Д>Л	1179, 1981 2870	Не, ФИ 66%	не	не
33;229	ж	C598_612 del хетерозигот	26	11	Болки в подбедрици като при мускулна треска, лесна умора	1/5 0/5	3/5	2/5	Да	ЛХ, скъсени АС	Да, в по-ранна възраст	2879, 481	Не	не	не
34;229	м	C598_612 del хетерозигот	56	-	асимптомен	5/5 5/5	5/5	5/5	не	Хипотрофии на бицепс, трицепс	не	259	не	не	не

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

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

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

При един от пациентите се наблюдава атипична проява на заболяването- с ригиден гръбнак и ранни контрактури, без сърдечно засягане (пациент № 30). Тя и асимптомната ѝ сестра са носители на неописана до сега мутация в *CAPN3* гена- p.Ile502TrpfsTer74. При 4 от пациентите има установени нормални стойности на КФК, като двама от тях са в напреднал етап на заболяването (Пациенти №4 и №14). При останалите пациенти има значителни вариации в стойностите на КФК, вариращи от леко повишени – 250 IU при норма до 200 и 11000 IU.

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

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

Общо 32% (12) от пациентите са хомозиготи за c.550delA, а 20.5 % (7) го носят поне на един алел (Таблица 1).

Мутацията c.550delA е нуклеотидна делеция и вероятно е стара мутация с ефект на родоначалника с много високо разпространение- около 75% в Югоизточна Европа. [Canki-Klain N и съавт., 2004, Fanin M и съавт., 2015]. Резултатите от проучването потвърждават високото разпространение на тази мутация при пациенти с ПКМД 2А от България. Мутациите на втория алел при тези пациенти е съответно- при двама p.Glu323X, двама с del12-8, един пациент с 985G/A и един с c.773G>C.

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

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

При пациентите от проучването се срещат и други мутации, при които не е установен втори мутантен алел, като при тях не са провеждани новите методи за генетичен анализ (NGS). Те са следните- p.Gly333 Asp, pArg169Gly, pAsp735Asn, Thr184ArgfsTer36. Един от пациентите е с установено двойно хетерозиготно носителство на pGlu323X и pArg49His (Пациент №20). Пациентите с открита само една мутация, след пълно секвениране на гена *CAPN3* и извършен скрининг за големи делеции на ниво РНК [Todorova A и съавт., 2007] показват изключително вариабилна клинична изява на заболяването, което противоречи на хипотетичния лек фенотип, свързан с единичен генен дефект. [Piluso G и съавт., 2005]. Установените резултати са повече в съответствие с данните на Saenz и съавт. от 2005г, показващи голяма вариабилност в началото и тежестта на заболяването в случаите с единична *CAPN3* мутация. От друга страна, мутацията p.Asp753Asn се открива в три независими проучвания като единична мутация при пациенти с ПКМД 2А и всички те се характеризират с по-късно начало и лека проява на заболяването. [Fanin M и съавт., 2005, Saenz и съавт., 2005].

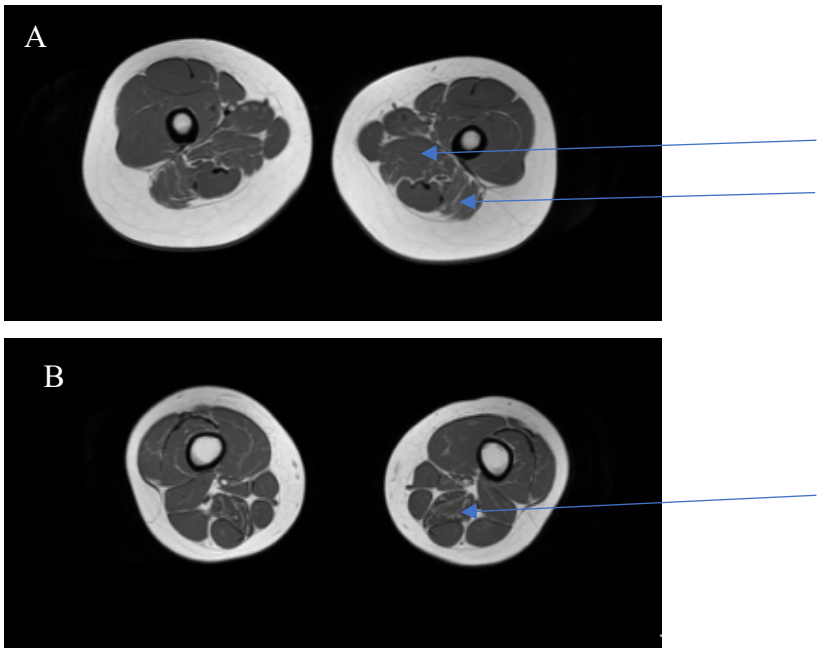
Останалите пациенти са фамилни случаи с по двама представители носители на мутации в хомозиготно състояние (c.1811_1812delTC , c.1504_1505delAT, 1337 G>T p.Gly446Val, съответно семейства № 13, 20 и 27) с фамилна анамнеза, съответстваща на АР тип на унаследяване, както и двама са баща и дъщеря (семейство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

Находки от проведената образна диагностика

В кохортата пациенти в проучването с калпаинопатия на 6ма е проведено МРТ изследване на мускули. Резултатите на пациенти №, 30, 31 и 33 ще бъдат представени по-долу в отдел Клинични случаи.

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

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

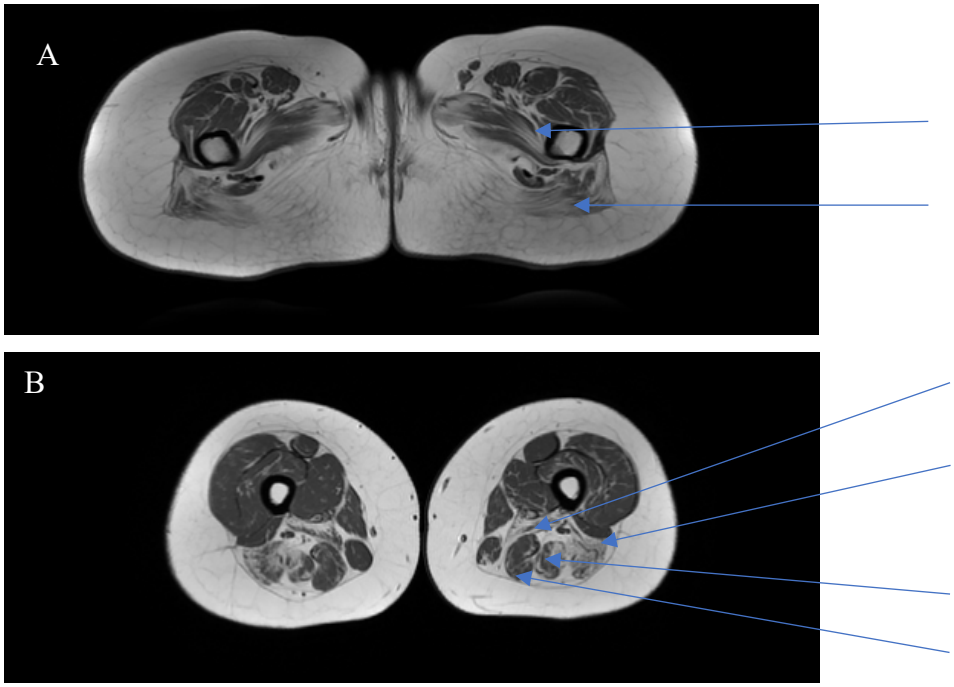


Фигура 4. МРТ на бедрена мускулатура- проксимална и дистална част.

Наблюдават се дискретни промени със заместване на мускулната тъкан с мастна инфилтрация за проксималната част на бедрото на част от м. m. gluteus maximus, m. adductor magnus, m. biceps femoris (фигура 4А). В по-дисталната част на бедрото прави впечатление мастна атрофия единствено на m. semimembranosus (фигура 4В).

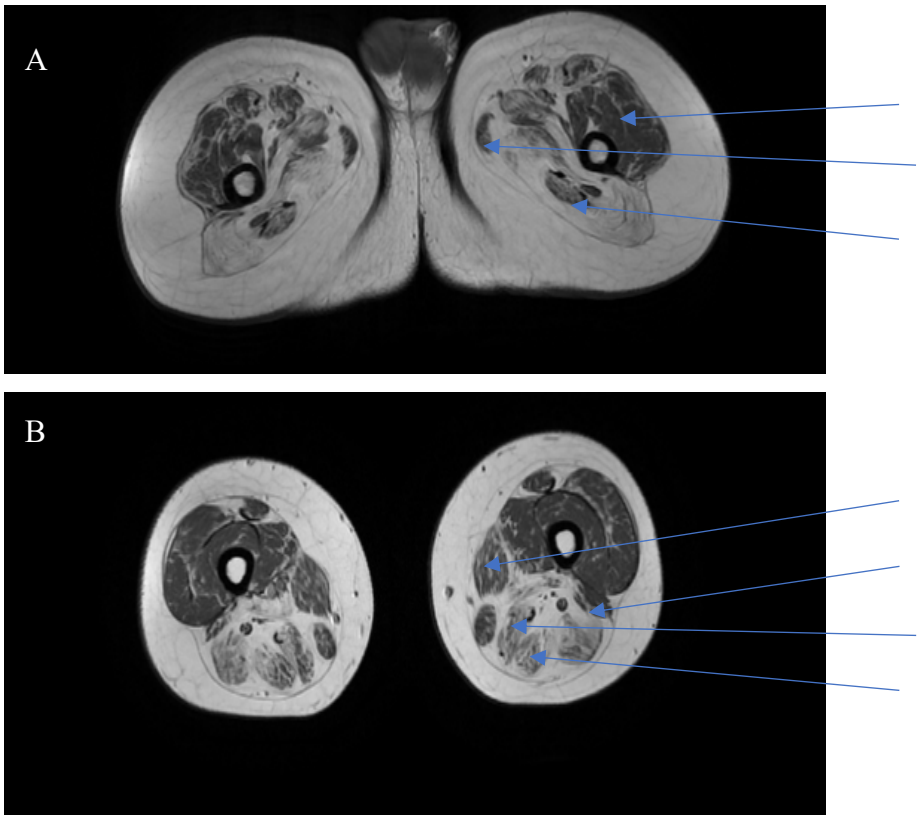
МРТ образна диагностика е проведена и на пациенти № 22 и 23. Пациентите са брат и сестра, носители на 1337 G>T, p.Gly446Val в хомозиготно състояние, която не е описвана преди това в *CAPN3* гена. Майката на пациентите е хетерозиготен носител. Пациентите са етнически турци.

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



Фигура 5. Представяне на мускулите на тазовия пояс и дисталната част на бедрото- пациент №22. Наблюдава се значително засягане на тазовия пояс, с изразена мастна инфилтрация на m. gluteus maximus, m. obturator externus. Аддукторната група мускули са със сравнително запазена характеристика (5А). При мускулите в проксималната част на бедрото прави впечатление ангажирането на задната група мускули- m. semimembranosus, semitendinosus, m. biceps femoris. В най-голяма степен е изразена мастрана инфилтрация на m. biceps femoris- късата и дългата глава (5В).

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



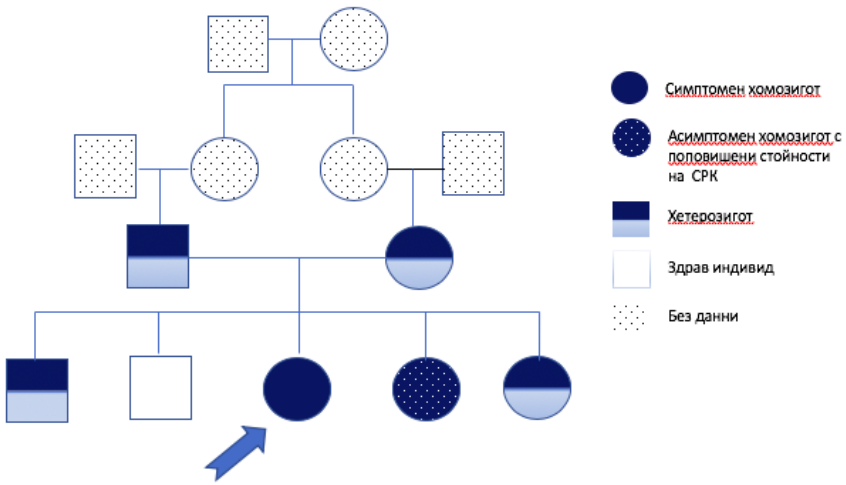
Фигура 6. Представяне на мускулите на тазовия пояс и дисталната част на бедрото-пациент №23. На нивото на тазовия пояс се наблюдава относително съхранение на m. vastus lateralis и m. gracilis, m. semitendinosus. Тежко изразена замяна на мускулна с мастна тъкан се вижда в аддукторната група мускули (6A). На нивото на проксималната част на бедрото се наблюдава мастна атрофия на телата на мускулите от задно-медиалната група- късата и дългата глава на m. biceps femoris, m. semitendinosus, semimembranosus, adductor longus (6B).

Ангажираните от мастно- дистрофичния процес мускули следват характерния модел на мускулно засягане при калпаинопатиите, описан от Barp A. и сътр. през 2019г, с преобладаващо засягане на бедрените мускули на долните крайници и главно на адукторите (m. adductor magnus), някои от задната група мускули (m. semitendinosus, m. semimembranosus и дългата глава на m. biceps femoris) и m. gluteus minimus, заедно с относително запазване на m. sartorius, m. gracilis, m. quadriceps, късата глава на m. biceps femoris и m. iliopsoas.

1.1.1.1. Клинични случаи

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

Семейството има 5 деца- две са хомозиготни по съответната мутация, като симптомно протичане на заболяването с разгърната клинична картина има при едното, а при другото има установени повишени стойности на КФК в серум. Други две от децата, едно момиче и едно момче, както и родителите, са хетерозиготи, а едно от децата (момче) не е носител на мутацията (фигура 7).



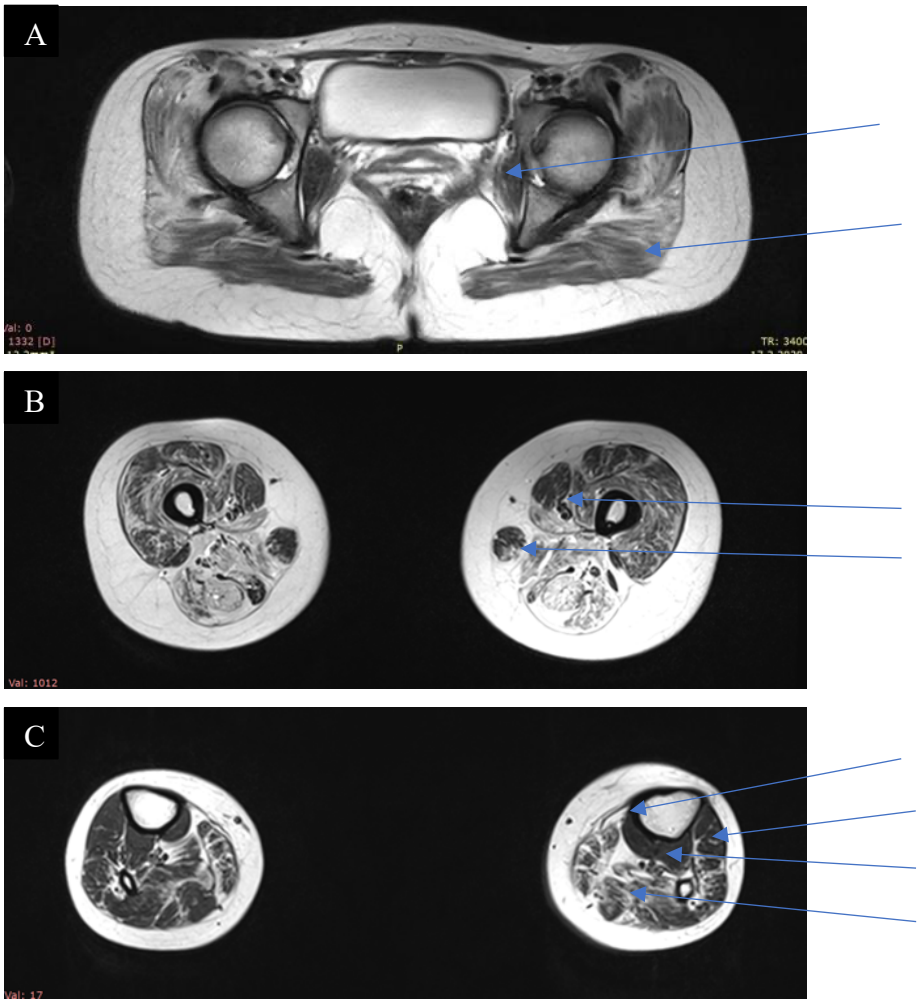
Фигура 7. Родословие на изследваното семейство**.**

Децата са родени от кръвнородствен брак- родителите са първи братовчеди. Индексният пациент е момиче на 16 г.в. , родено от трета нормално протекла бременност и раждане на термин с т.м. 3000 кг. С нормално невропсихично развитие. Проходила на 1 г., фразеологична реч от 1 г. и 2 месеца. Оплакванията и датират от 11-12 г.в., когато се променила походката, «започнала да ходи с повдигане на ходилата». Впоследствие се затруднило изправянето от клекнало положение и изкачването на стълби. Променила се стойката, с издаване на корема напред, при ходене започнала да усеща болка в лумбалната област. Затруднило се изправянето от легнало положение.

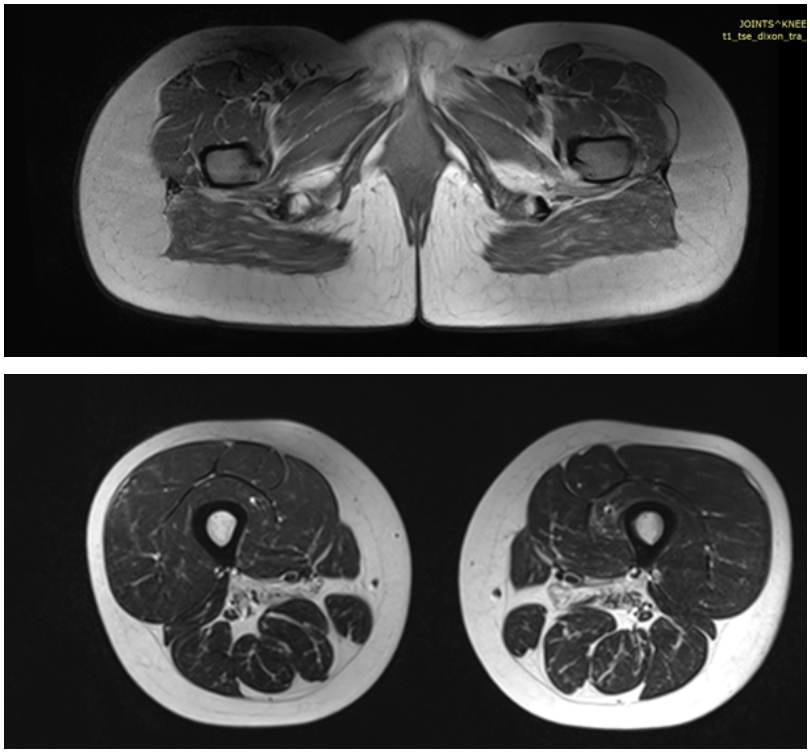
От неврологичния статус е налице миопатен синдром, изразен за проксимални мускули на горни, проксимални и дистални мускули на долни крайници, аксиална слабост. Затруднено е изправянето от клекнало и легнало положение с положителен (+) симптом на Gowers. Сухожилните рефлекси (СР) са отслабени в ръцете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

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

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



Фигура 8. МРТ на мускули на тазов пояс и долни крайници на индексната пациентка. При индексната пациентка се наблюдават мастна инфилтрация на глутеалните мускули (8A), изразено ангажиране на бедрената мускулатура, като най-засегнати са аддукторнага група мускули, задната група мускули, и в по-малка степен m. quadriceps femoris, на фона на който m. vastus medialis е най-съхранен. Изключение са m. gracilis и m. rectus femoris (8B). При мускулите на подбедрицата са ангажирани медиалните части на m. gastrocnemius и в по-малка степен на m. soleus, tibialis posterior, tibialis anterior, m. extensor digitorum longus. Правят впечатление по-изразените патологични промени в дясната подбедрица, които нямат клинична изява с асиметрична слабост (8C).



Фигура 9. МРТ на тазов пояс и бедрена мускулатура на пациентката асимптомен хомозигот. Наблюдава се нормална находка на изследваните мускули.

Pollitt и колект. (2001) и Mercuri и колек. (2005) и Landires и колект. (2020), независимо един от друг докладват за подобни варианти на клинична експресия на калпаинопатия, при който се наблюдават ранни контрактури и ригиден гръбнак. Описаните в тези клинични случаи патогенни варианти се различават от тези, установени при нашите пациенти, с което допълнихтелно се разширява фенотипния и генотипния спектър на калпаинопатите.

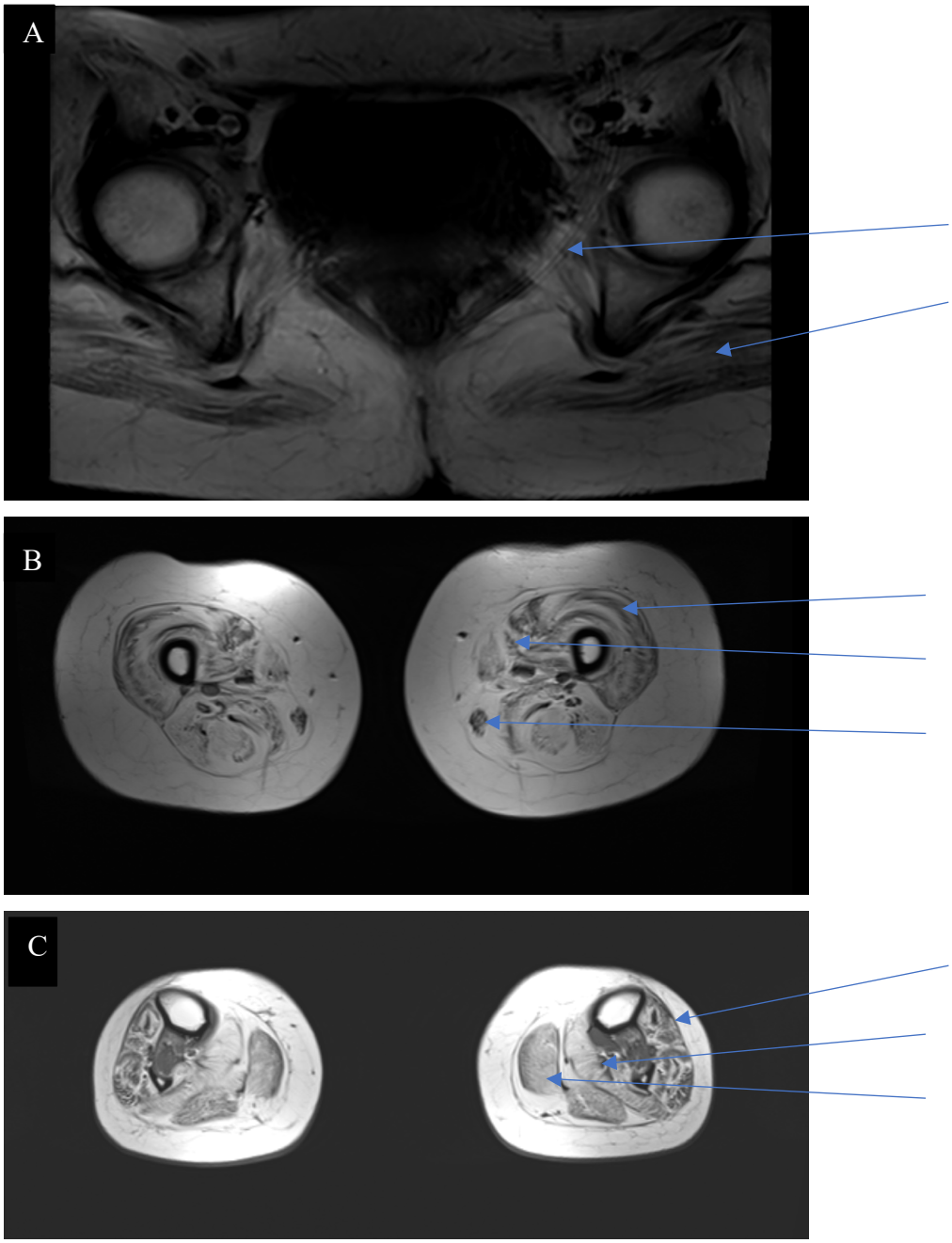
Представяне на семейство с автозомно- доминантна форма на *CAPN3* свързана Пояс-крайник мускулна дистрофия.

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

При дъщерята се наблюдава разгърната клинична картина на заболяването. Родена от първа нормална протекла бременност и раждане, с тегло 3500гр. и ръст 52см. Проходила на 1г., проговорила на 1г. и 2 месеца. Оплаквания датират от 11г.в., когато се появили болки в краката- мускули на бедра, подбедрици, стъпала, усещащи се като

мускулна треска, започнала да се изморява по-лесно. Постепенно се появили трудности при бягане, скачане, започнана по-бавно и трудно да се изкачва и слиза по стълби, затруднило се изправянето от клекнало положение. Съобщава за момент, в който прасците са били по-големи (трудно си е намирала ботуши), в последствие са намалели по обем. От 13- 14 г.в. забелязала, че започва по-често да се спъва, с чести падания, поради затруднено изправяне на стъпалото. От около 14- 15 г. в. се добавила слабост в ръцете- предимно в мишниците, които започнали да отслабват по обем. В последствие се ангажирали и мускулите на раменната област. Гореописаните оплаквания прогресират във времето. От 25 г.в. има необходимост от подкрепа при ставане от седнало положение и при ходене. От проведения неврологичен преглед е с данни за миопатен синдром с генерализирана мускулна слабост, по- силно изразена за проксималните мускули на четирите крайника и на аксиалната мускулатура, генерализирана арефлексия, невъзможно изправяне от клекнало положение, невъзможно изправяне от легнало положение, миопатно- клатушкаща се походка с едностранно подпомагане; Лумбална хиперлордоза; Криловидни лопатки двустранно; скъсени Ахилесови сухожилия двустранно. Наблюдават се хипотрофии на проксималната мускулатура на долни крайници и раменен пояс.

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



Фигура 10. МРТ образи на тазов пояс, подбедрици, бедра, аксиален срез, Т1 секв. Описани са изразени атрофични промени в параспиналната мускулатура (не е представена снимка). При бедрата се наблюдава дифузна тежка атрофия със заместване от мастна тъкан на m. iliacus, mm. glutei maximi, minimi, medii двустранно, както и m. vastus lateralis et medialis. M. gracillis е сравнително съхранен като сигнален интензитет (10A,B). При изследване на подбедриците правят впечатление изразени атрофични промени в m. gastrocnemius, m. soleus. M. tibialis posterior, както и m. flexor halucis longus и m. flexor digitorum longus, m popliteus са съхранени. Забелязва се

умерено към силно изразена атрофия на m. tibialis anterior, което не е обичайна находка при това заболяване (10C).

Бащата на пациентката не съобщава за субективно оплакване от мускулна слабост. Поради това в началото е поставена погрешна диагноза- АР калпаинопатия. От проведените преглед и изследвания при него се установяват хипотрофии на мукулите на мишниците – m. biceps brachii и m. triceps brachii (Фигура 11), без обективно да има слабост в тях (пациентът работи тежка физическа работа с ръцете си).



Фигура 11. Снимка на хипотрофии на m. biceps brachii и m. triceps brachii при съхранени mm.deltoidei двустранно.

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

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

Обсъждане:

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1.2. Телетонинопатия

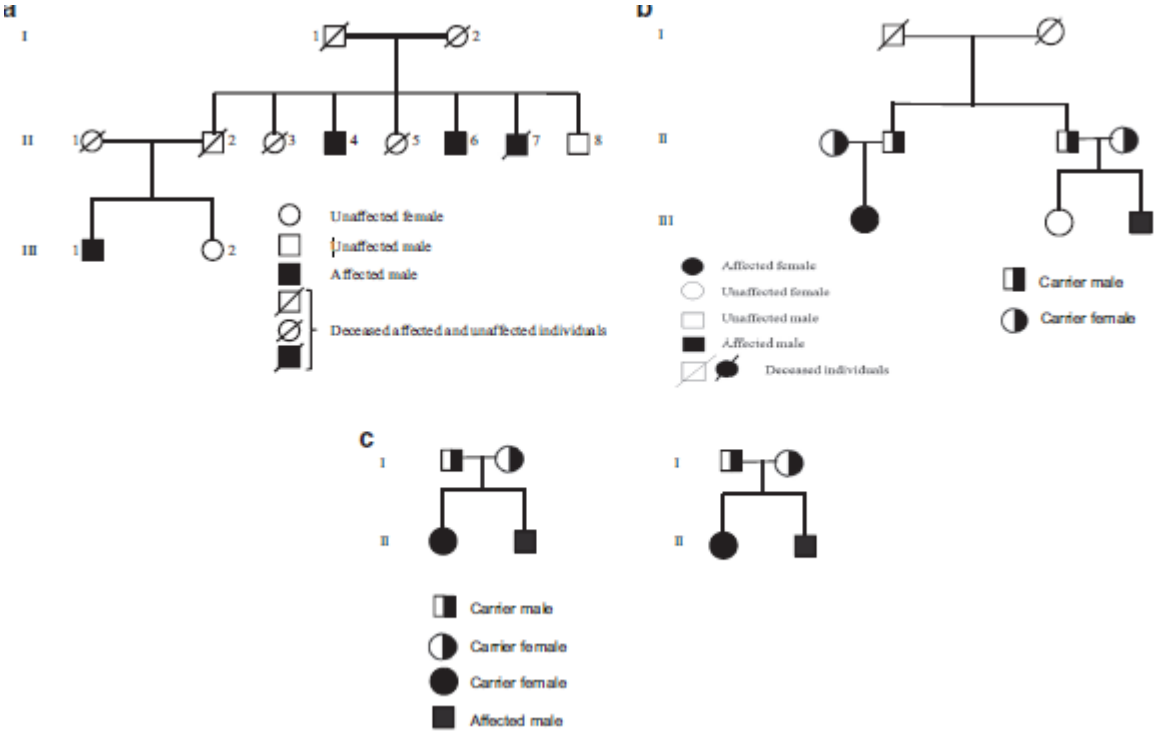
Клиничният контингент включва 19 болни (13 мъже и 6 жени) от 12 родословия, като информацията е събрана за период от между 2012 и 2021г. Използвани да данни, събирани по време на теренни проучвания и чрез документацията на Клиника по нервни болести, УМБАЛ „Александровска“.

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

Генетични находки: Десетима от пациентите съобщават за положителна фамилна анамнеза с родословна структура в съответствие с АР модел на унаследяване. (фигура 12) 18 от засегнатите хомозиготни за c.75G>A, p.Trp25*мутация, а един е двоен хетерозигот, носещ Glu132Val в екзон 2 на гена *TCAP* като втора мутация.

Заместването на TGG към TGA в кодон 25 на екзон 1 се очаква да замени триптофан в тази позиция със стоп сигнал (Trp25X) и е довело до пресечена молекула телетонин, която завършва на позиция 25 вместо нормална 167.

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



Фигура 12. Родословия на фамилните случаи с ПКМД 2G

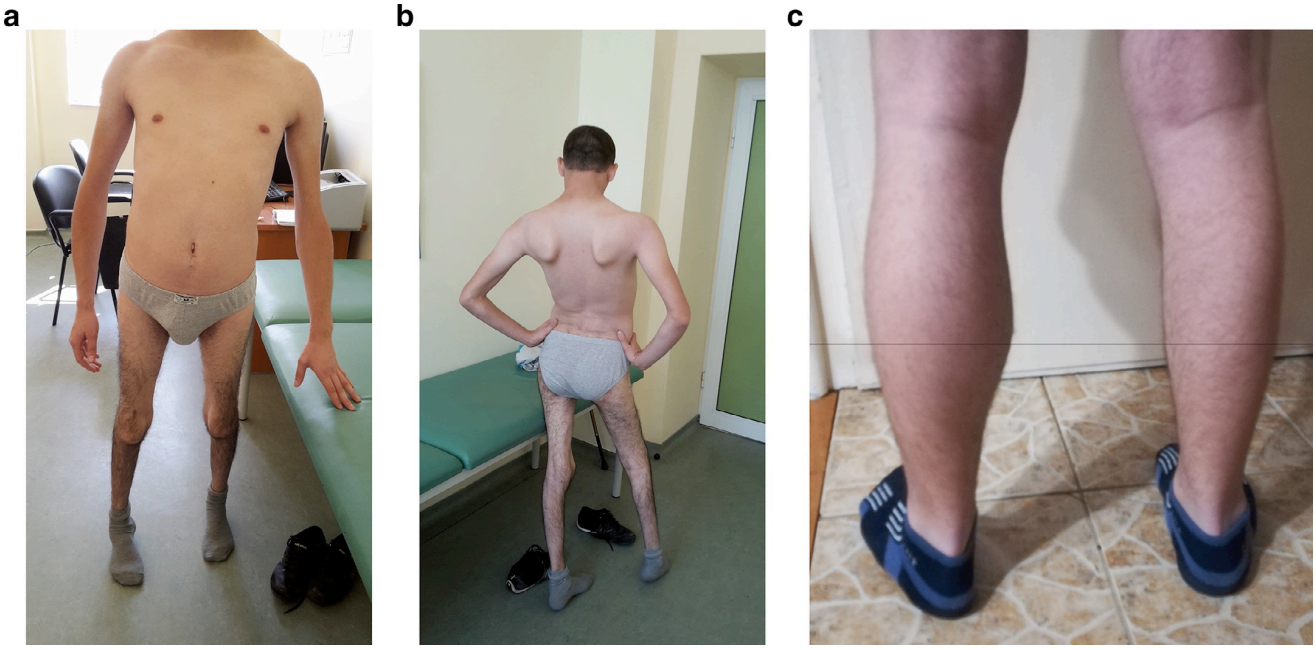
Пациентите с техните генетични и клинични характеристики са описани в таблица (Таблица 2).

Таблица 2. Генетични и клинични характеристики на пациенти с телетонинопатия.

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

Средната възраст на началото е 28,4 години, вариращa между 3 и 25 години, като при жените е значително по-рано- 24 години, докато при мъжете е 30,54 г. Първоначалните прояви при повечето от пациентите (14/19) включват проксимална мускулна слабост в долните крайници с прогресивни затруднения при бягане, изкачване на стълби и изправяне от стол, последвано от затруднения в дорзалната флексия на глезена. При 4 от засегнатите проксималната и дисталната слабост в краката са настъпили едновременно. Първоначално и по-тежко засегнати са мм. gluteus maximus, gluteus medius, hamstring мускули, бедрени аддуктори и m. tibialis

anterior. Проксималните мускули на горните крайници се ангажират 5-9 години след началото на заболяването. Криловидни лопатки и лумбална хиперлордоза се развиват късно в хода на заболяването. Сколиоза е наблюдавана при един пациент (№15) 9 години преди мускулната слабост. Контрактури на глезена и хипертрофия на прасеца неизменно присъстват при 14/17 пациенти. При двама пациенти е описана едностранна псевдохипертрофия на подбедриците. Екстраокуларните и лицевите мускули са запазени при всички засегнати. (фигура 13)

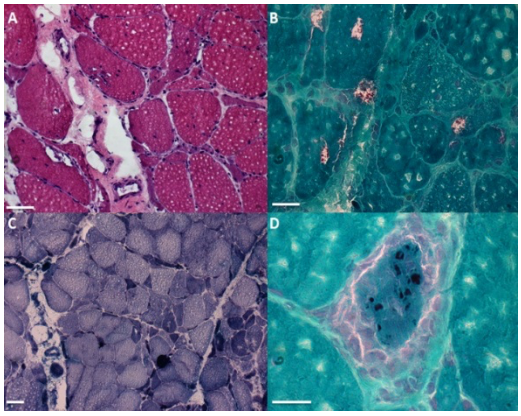


Фигура 13. Клиничен фенотип на пациент 1 на 25 г.в., хомозигот за c.75G > A, p.Trp25X. (13A) Хипотрофии на бедрените мускули, m. tibialis anterior, двустранен пес еквиноварус, по-изразен в дясно. (13B) Криловидни лопатки. хипертрофия на подбедриците. (13C) Асиметрия между лява и дясна подбедрица при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

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

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

Мускулна биопсия, взета от m. quadriceps femoris на пациент №12 демонстрира умерено заместване на мастна и съединителна тъкан, вариация на размера на влакната и централно разположени мионуклеуси. В единични влакна са описани „rimmed" вакуоли и немалинови пръчици (Фигура 14). Рядко се наблюдава некроза на единични влакна и фагоцитоза. Имунохистохимичните изследвания показват нормална реакция за трите епитопа на дистрофин (пръчка, карбокси край, амино край), саркогликани (алфа, бета, гама, делта), десмин, кавеолин, дисферлин и емерин.

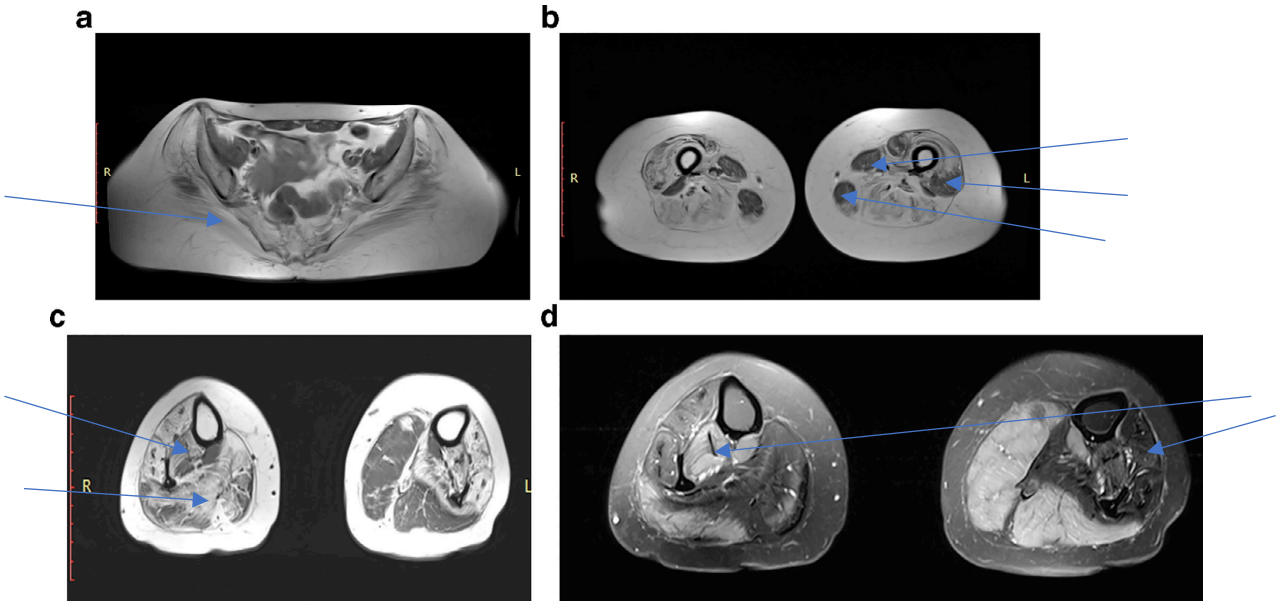


Фигура 14. Хистологична находка от m. quadriceps femoris на пациент № 9 на възраст 18 години. (14A) H&E оцветяването показва миопатна трансформация на мускулната тъкан с лека фиброза, интернализирани ядра и увеличаване на вариабилността на размера на влакната. (14B + D) Трихромното оцветяването на разкрива единични влакна с включени вакуоли и немалинови пръчки. (14C) NADH реакцията показва тъмносини, но не и лобулирани влакна (баровете в A-D се регулират на 50 μm).

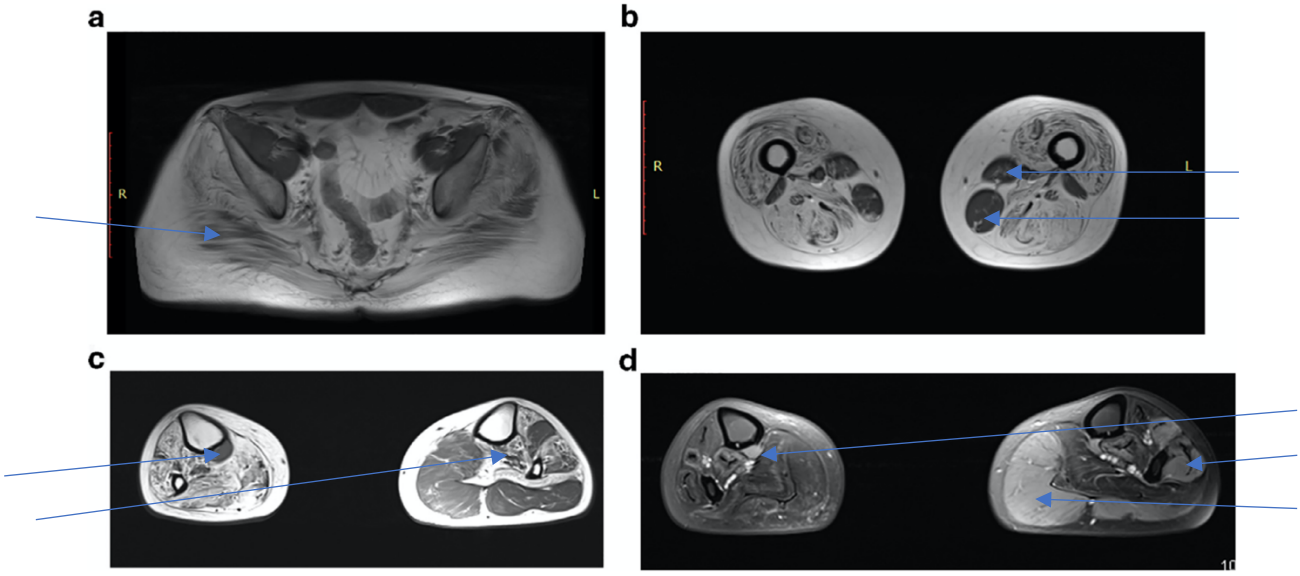
ЕМГ изследването демонстрира миогенни промени с ниски потенциали на двигателната единица.

От проведената образна диагностика на двама пациенти МРТ на тазовия пояс на пациент №16, направена на 39 г.в. демонстрира тежки фибро- мастни изменения и на двата mm. glutei maximi, tensor fasciae latae мускули и десен obturator internus, съпроводено с атрофия на mm. Iliopsoas и sartorius (фигура 15). Най-тежки промени са открити в предната и задната част на двете бедра. Мускулите sartorius и gracilis са относително запазени без признаци на миоедем. В подбедриците е установено двустранно тежко фибро-мастно заместване на предния отдел и m. soleus. Освен това desсния заден отдел са силно засегнати. Описани са и ранни фибро-мастни промени в

медиалната глава на левия m. gastrocnemius. На секвенциите PD Fat Sat е описан миоедем на m. tibialis posterior, латерална глава на двата mm. gastrocnemius и медиалната глава на левия m. gastrocnemius (Фигура 15D).



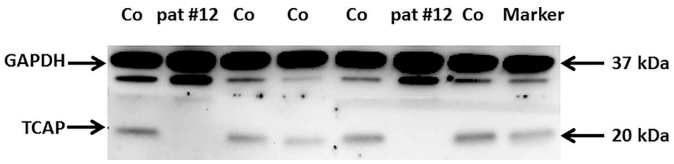
Фигура 15. МРТ на мускули на тазов пояс и долни крайници на пациент № 10 (Ж), на 39 г.в. (15A) T1 аксиален срез на ниво бедра – тежка атрофия на mm. glutei minimi, medii, maximi и mm piriformi, среднотежка строфия на m. Ileopsoas. (15B) T1 аксиален срез на ниво на двете бедра - Mercuri score 4 – краен етап на засягане на предните и задните отдели. Мускулите са заменени със съединителна и мастна тъкан. Mm. vastus medialis и laterali на левия крак са по-малко засегнати. Относително запазване на m. sartorius и gracillis и късата глава на m. biceps femoris. (15C) Всички мускули с изключение на m. flexor digitorum longus в дясно са с изразена мастна дегенерация. В лява подбедрица е налице тежка фибро-мастна замяна на антеролатералния отдел и m. soleus, а в средната глава на m. gastrocnemius се наблюдават ранни фибромастни промени. (15D) Fat Sat на двата долни крака - миоедем на m. tibialis posterior, латерална глава на двата mm. gastrocnemii и медиалната глава на левия m. gastrocnemius.



Фигура 16. МРТ на тазовите мускули и мускулите на долните крайници на пациент №7 (мъж), на 35 години (16А.) Т1 аксиален срез на нивото на бедрата - тежки фибро-мастни двустранни промени на мускулите mm. glutei minimi, medii, maximi, piriformis. (16В) Т1 аксиален срез на нивото на двете бедра. Тежка мастна дегенерация на предни и задни части. Относително запазване на мускулите m. sartorius, gracilis и късата глава на двуглавия бедрен мускул, които са леко засегнати. (16С) Т1 TSE на двете подбедрици - аксиален срез - Всички мускули с изключение на m. flexor digitorum longus показват тежка мастна дегенерация от дясната страна. В лявата подбедрица се представя фибро-мастно заместване на антеролатералния дял и mm. solei с ранни фибро-мастни промени в медиалната глава на m. gastrocnemius. Промените са относително по-слабо изразени в левия крак в сравнение с пациент №10. (16D) PD Fat Sat на двете подбедрици- аксиален срез- миоедем на задния тибиален мускул, латерална глава на двата mm. gastrocmenii и медиална глава на ляв m. gastrocnemius.

Средната сърдечна честота на изследваните пациенти е 76±8 удара в минута, средното систолно артериално налягане - 112±8 mmHg и средното диастолно артериално налягане -74±5 mmHg. На ЕКГ не са регистрирани патологични отклонения. Ехокардиографията показва нормална систолна функция със средна фракция на изтласкване 66±4%. Параметрите на диастолната функция също са в референтните граници. Липсват признаци на ЛК хипертрофия – средната дебелина на септума е 9,4±0,9 mm. При изследваните пациенти дихателната функция е запазена със стойности на FVC в диапазона 73-108%.

Стойностите на КФК са повишени 2 до 25 пъти над горната граница на нормата. Western blot анализът, извършен с 20 kDa моноклонално антитело срещу TCAP показва пълно отсъствие на протеина при пациент № 9 (Фигура 17).



Фигура 17. TCAP Western blot при пациент № 9. Western blot анализ с моноклонално антитяло срещу TCAP показва пълно отсъствие на телетонин при 20 kDa при пациент № 9. GAPDH е представен като контролен протеин.

Обсъждане:

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

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

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

В заключение, въпреки че се счита за рядка в световен мащаб, ПКМД 2G е често срещана форма сред българо-мохамеданите, която трябва да се има предвид при диагностицирането на такива пациенти. Високата степен на носителство на c.75G>A, p.Trp25* в *TCAP* сред тази група може да наложи създаването на програма за скрининг за носители сред това религиозно малцинство, за да се предотвратят нови случаи. Хомозиготността за c.75G>A, p.Trp25*мутация е свързана с хомогенна клинична изява по отношение на модела на мускулно засягане. Клиничният ход и тежестта на

заболяването обаче показват вътрешно- и междуфамилни вариации въпреки хомогенността на мутацията.

1.1.3. ПКМД 2Z/R21- POGLUT1 асоциирана

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

Тримата пациенти са представители на едно семейство - три сестри от български етнос. Генетичното изследване е осъществено по проект MyoSeq, като е установено носителство на pR98W(p.Arg98Trp) мутация в хомозиготно състояние в *POGLUT1* гена. (Таблица 3).

Таблица 3. Клиничната характеристика на пациентите с ПКМД2Z/R 21.

	Пациент 1	**Пациент 2**	**Пациент 3**
начало на оплакванията	25 г.	44 г.	22 г.
първи прояви на заболяването	трудно изкачване на стълби, изправяне от клекнало положение	затруднено изкачване на стълби, изправяне от клекнало, седнало и легнало положение и бърза умора при физическо натоварване	трудно изкачване на стълби, изправяне от клекнало положение, трудно стъпване на пети
засягане на горни крайници (г.в.)	около 45	50	около 40
засегнати мускулни групи	проксимални групи на четирите крайника, дистална в краката, аксиална мускулатура	проксимални мускули в горни и долни крайници и аксиални мускулатура	проксимална мускулатура на горни и долни крайници, аксиалната мускулатура, предна тибиална мускулатура
стойности на КФК	122, 146, 172	125, 75, 121	133, 110, 135
ЕМГ находка	миогенна увреда	миогенна увреда	миогенна увреда
криловидни лопатки	Л>Д	Л>Д	Л>Д
лумбална хиперлордоза	да + тораколумбална сколиоза	да + дясно конвексна сколиоза	да
дихателно/ сърдечно засягане	не/не	не/не	не/не
АК замени	p.R98W/ p.R98W	p.R98W/ p.R98W	p.R98W/ p.R98W
възраст на поставяне на диагнозата	52/F	47/F	50/F
Долни крайници/проксимално (MRC)	4-	2	2

долни крайници дистално (MRC)	5	5	5
горни крайници проксимално (MRC)	4	4	4
горни крайници дистално (MRC)	5	5	5
FVC (%)	72	53	76
Загуба на походка	Не	Не	Не

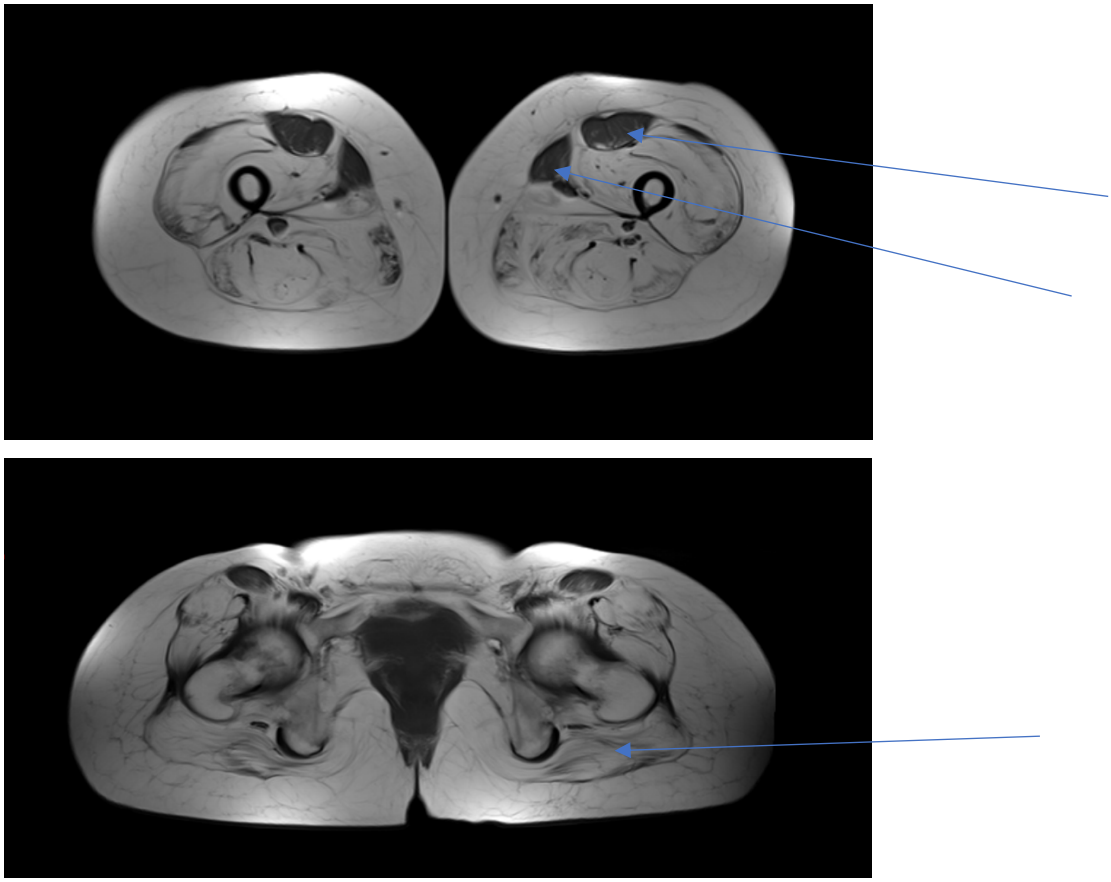


Фигура 18. Клинично представяне на пациент 3 (снимките са публикувани със съгласието на пациентката).

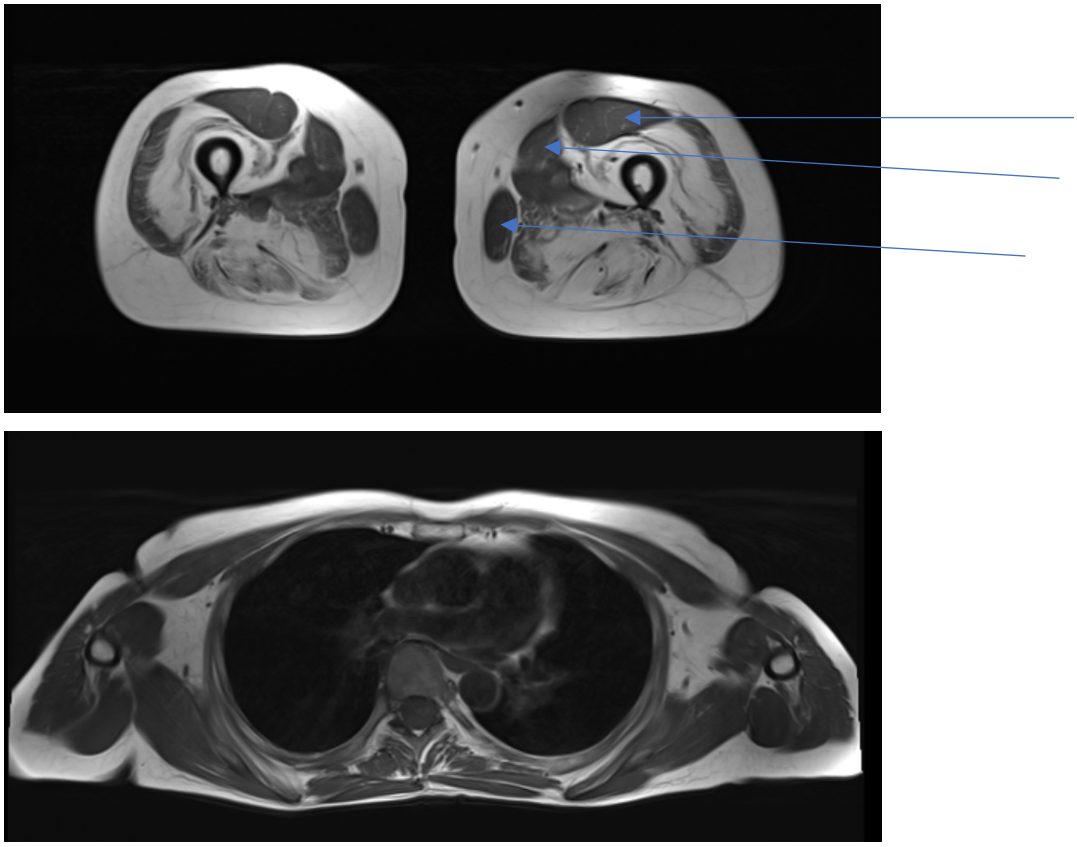
Пациентите от проучването са единствените описани с pR98W. C. Paradas и колектив изследват функциите на всички мутации, установени при пациентите с ПКМД 2Z/R21. Те установяват, че p.R98W, както и p.I129T, p.C102F и p.W308L мутации дестабилизират POGLUT1 протеините.

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

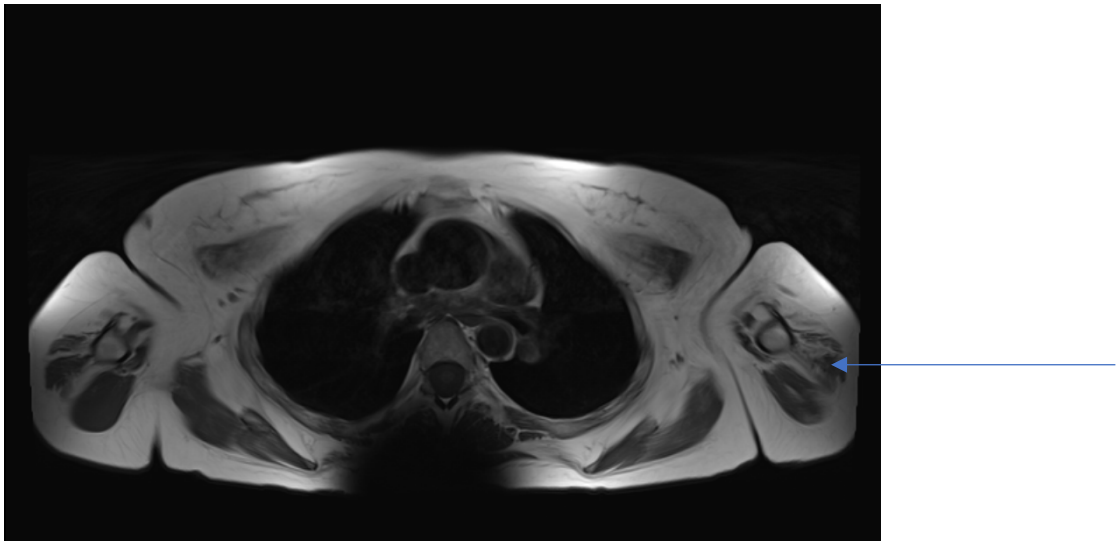
От проведената образна диагностика на пациентите се установява характерната за заболяването находка- модел „отвътре навън“ мастна дегенерация на мускулите (фигура 19). Описан е при всички пациенти докладвани в литературата.

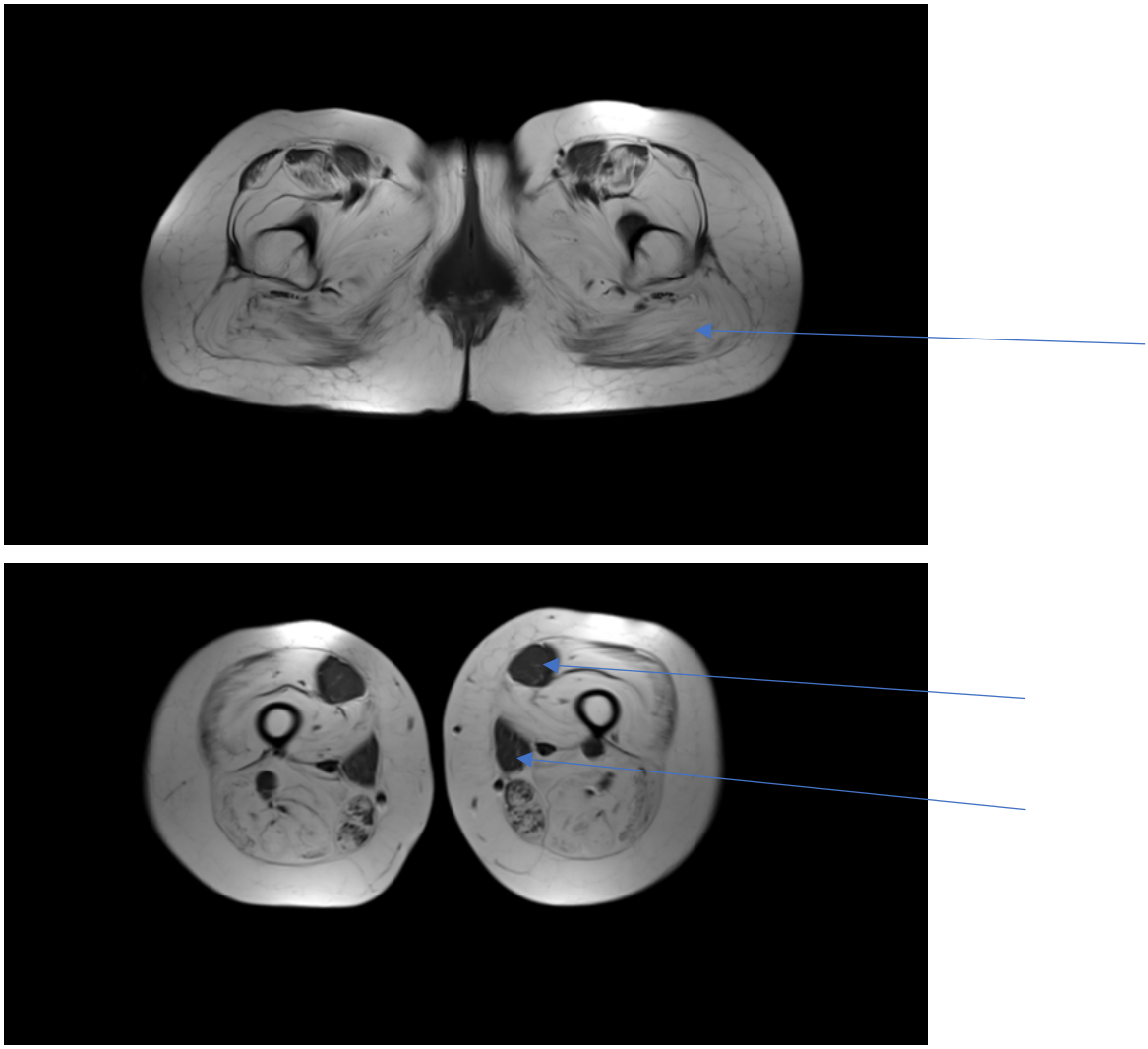


Фигура 19. Пациент № 1 МРТ на мускули на тазов пояс и бедрена мускулатура с данни за атрофия и мастна дегенерация на вътрешните части на мускулите на бедрата при относителна съхраненост на външните.



Фигура 20 Пациент № 2 Наблюдава се по-лека изразеност на замяната на мускулна тъкан с мастна, следваща същия модел на мускулно засягане.





Фигура 21. Пациент № 3. МРТ на мускули на тазов и раменен пояс и бедрена мускулатура. Тежко изразени промени на заместване на мускулна тъка с мастна, в по-малка степен в раменен пояс.

Забележимо е, че при пациент №1 и пациент № 3, които са с по-ранно начало на оплакванията, дистрофичният процес е по-напреднал. Наблюдава се симетрична мастна дегенерация на повечето мускули в тазовия пояс и бедрената мускулатура. Значително запазени се виждат m. rectus femoris, m. sartorius, в по-малка степен m. gracilis и при двете пациентки. Медиалните частни на m. gluteus maximus относително по-слабо засегнати, в сравнение с останалите наблюдавани мускули (Фигури 17 и 21). От МРТ изследване на раменния пояс на пациент № 3. се наблюдава симетрична мастна дегенерация на m. deltoideus (Фигура 21).

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

Обсъждане:

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

Най-забележителната характеристика, свързана с мутациите на POGLUT1, е образната диагностика на мускули, особено на нивото на бедрата. Моделът на изобразяване на мускулите е мастна дегенерация с характеристика "отвътре навън",

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

1.1.4. Аноктаминопатия

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

Пациентът от проучването по време на първоначалния преглед е бил на 49 г.в. Начало на заболяването е от 35 г. в, когато по повод на опресия в гърдите са установени инцидентно повишени стойности на СРК над 1000. Впоследствие се добавила проксимална и по-лека дистална слабост в мускулите на долните крайници, която пациентът свързвал с проблемите с левия си крак (След преживяна катастрофа в юношеска възраст и след операция по повод фрактура на ляв крак е със скъсяване на

същия с около 5 см.). Затруднило се стъпването на пети. От 41 г.в. не може да се изправя сам от клекнало положение. От 42-43 г.в. проксималната слабост в долните крайници станала по-изразена и започнал да пада често. Проксималните мускули на долните крайници постепенно изтънели. Добавила се и проксимална слабост в горните крайници от около 43 г.в. Гореописаната слабост, по-изразена за проксималните мускули на четирите крайника, бавно прогресира във времето.

От неврологичния статус е с Миопатен синдром по-изразен за проксимални мускули на четирите крайника: Генерализирана мускулна хипотония; СР-отслабени стилорадиални, бицепсови и трицепсови и липсващи коленни и Ахилови рефлекси; Походка миопатна, клатушкащо се-степажна (по-изразен степаж за ляв крак); Невъзможно самостоятелно изправяне от клекнало положение; Хипотрофии на мишници, глутеална мускулатура, бедрена мускулатура; Торакална кифосколиоза; Леко набелязани псевдохипертрофии на подбедриците (таблица 4).

Таблица 4. Сравняване на мускулната слабост при пациента с ММТ (MRC scale).

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

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

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

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

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

Сърдечната функция в оценена с ЕхоКГ :

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

(2017г.) ФИ= 60%. Ляво предсърдие 36мм, ЛП площ 15мм^2, Ао корен 32мм, ЛК: ДРЛК 48мм, СРЛК 33мм, ФС 32%, ТДО 128мл, ТСО 36мл, ФИ 60%, септум 12мм, ЗСЛК 12мм. Заключение: Нормални размери на сърдечни кухини, лекостепенна хипертофия на миокарда на ЛК с диастолна дисфункция на ЛК. Без ДК обременяване. Преди генетичното поставяне на диагнозата, пациентът е бил изследван за възпалителна миопатия (миозитен панел антитела), Болест на Помпе, ПМД тип Бекер, калпаинопатия и телетонинопатия, които резултати са били негативни.

Обсъждане:

Въпреки, че в световен мащаб това е много често срещана форма на ПКМД и е обявена като третата най-честа форма на ПКМД в Северна Европа. [Hicks D и съавт., 2010, Witting N и съавт., 2013], в българската популация е диагностициран само 1 пациент с аноктаминопатия. Възможно е поради обичайно късното начало на клиничната симптоматика и сравнително лекия фенотип, да бъде пропуснато диагностицирането на такива пациенти. [Nigro V и съавт., 2014] Отличителни черти на ПКМД 2L/R12 спрямо другите форми на ПКМД, са наличието на полово обусловени разлики в протичането- жените са по-рядко, но по-тежко засегнати от мъжете [Sarkozy A и съавт. 2013], асиметричното ангажиране на мускулите [Mercuri E и съавт., 2013], болка след и интолеранс към физическо натоварване, характерни за метаболитни или възпалителни миопатии [Milone M и съавт., 2011]. Насоченото ни внимание към тези симптоми, би могло да подобри диагностиката на аноктаминоаптия.

Изследваният пациент е носител на две мутации, които до сега не са били описвани в литературата в двойно хетерозготство. Клиничната картина следва основните характеристики на заболяването с асиметрично мускулно засягане, началото на заболяването в зряла възраст и запазването на самостоятелна походка в

късна възраст. Наблюдавано е и начало на заболяването с установени случайно повишени стойности на КФК, умора и нарушен толеранс към физическо натоварване. От сравнителната таблица на стойностите от ММТ не се наблюдава значителна прогресия при проследяване на пациента, което корелира с доброкачествения ход на заболяването, описан в литературата [Magri F и съавт., 2011, Penttila S и съавт., 2012]. От биохимичните изследвания е с повишени стойности на КФК 5 до 15 пъти над нормата. Описано е леко изразена рестриктивен тип дихателна слабост. Установено е сърдечно засягане с лека ЛК диастолна дисфункция и спадане на ФИ на 60% при проследяване за пациента. Обичайно сърдечната и дихателната функция са запазени. Редките сърдечни промени, описани в литературата могат да включват кардиомиопатия и/или левокамерна дисфункция [Hicks D и съавт., 2011], както е при изследвания пациент.

Поради малката бройка на пациентите, няма как да установим дали са налични полово-обусловени разлики във фенотипа, което е отличителна черта на заболяването. Предвид изразената интрафамилна вариабилност на заболяването описана при носителите на гореспоменатата мутация и липсата на данни от повече пациенти, генотип-фенотип корелации трудно могат да бъдат установени.

2. ИЗВОДИ

1. Пояс-крайник мускулната дистрофия в България е генетично и клинично хетерогенна.
2. Автозомно- рецесивните пояс-крайник прогресивни мускулни дистрофии са значително по-чести в България, отколкото автозомно-доминантните форми.
3. Въпреки че АР калпаинопатия е най-честата в световен мащаб, в българската популация най-честа е гамасаркогликанопатия.
4. Най-честата мутация при пациентите с калпаинопатия е c.550delA, която е най-честа в европейстата популация.
5. Телетонинопатията е най-разпространена сред затворената религиозна общност на българомохамеданите в Смолянска област.
6. Гамасаркогликанопатията в България се среща само сред роми мюсюлмани – милет, главно в Източна България.

7. Въпреки, че ПКМД 2Z е рядка форма в световен мащаб, трябва да се има предвид при пациенти с пояс-крайник мускулна слабост характерната находка от на засягане на мускулите „отвътре навън“ от МРТ изследването.
8. Сърдечно засягане е наблюдавано сравнително рядко при пациентите с всички форми на ПКМД в българската популация, но това не отменя необходимостта от ежегодно проследяване на сърдечната функция.
9. Дихателна слабост се наблюдава при пациентите с гамасаркогликанопатия и по-рядко с калпаинопатия, което затвърждава необходимостта от редовно проследяване на дихателната функция.
10. Образната диагностика с МРТ на мускули е неинвазивен метод, който допълва диагностиката на мускулните заболявания, поради типичните специфики при някои от формите и може да се използва за насочване към конкретна диагноза, както и установяване на мускулно засягане в предклиничен стадий на заболяването.
11. Новите методи за генетични изследвания (WES, NGS) са методи на избор на изследване на неясни случаи на миопатия и пациенти с атипично протичане, като те разширяват генотипния и фенотипния спектър на невромускулнте заболявания и в частност ПКМД.

3. ПРИНОСИ

Научно-теореотични:

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

4. Описано е семейство с автозомно- доминантна калпаинопатия, демонстриращо разпространението на тази иначе рядко описвана форма.
5. Установени са етнически и религиозни специфики в разпространението на ПКМД.

Приложни:

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

6. ЛИТЕРАТУРА:

Използвани са 453 литературни източника. Използваните източници са представени в дисертационния труд.

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

Публикации:

1. **Танева А.**, Чамова Т., Търнев И. Клиничен спектър на кавеолинопатиите, сп. Медикарт, 2018.
2. **Танева А**, Чамова Т, Бичев С, Тодоров М, Господинова М, Кастрева К, Златарева, Д, Крупев М, Хаджииванов Р, В. Гергелчева, Л. Грозданова, Д. Цонева, А. Хюбнер, М. В. дер Хаген, Б. Шосер, Х. Лохмюлер, А. Тодорова, И. Търнев. Пояс- крайник мускулна дистрофия 2G в религиозно малцинство на

българо- мохамедани, хомозиготи по мутация c.75G>A, p.Trp25x. Българска неврология 2019, 2, 71-76.

3. Чамова Т, **Танева А**, Атемин С, Тодоров Т, Господинова М, Тодорова А, Търнев И. Колаген 6 свързани миопатии. Първото генетично доказано семейство в България с вродена миопатия на Бетлем. сп. Педиатрия, том LXI, 1, 2019.
4. **Танева А,** Чамова Т, Търнев И. Прогресивни мускулни дистрофии тип пояс-крайник. Българска неврология 23, 2, 2022.
5. Gospodinova, M., Chamova, T., **Taneva, A.,** Todorova, A., Denchev, S., & Tournev, I. CARDIAC INVOLVEMENT IN MUSCULAR DYSTROPHIES. Advances in Bulgarian Science, 2018.
6. Chamova T, Bichev S., Todorov T., Gospodinova M , **Taneva A.**, Kastreva K., Zlatareva D., Krupev M., Hadjiivanov R., Guergueltcheva V., Grozdanova L., Tzoneva D., Huebner A.,Von der Hagen M. Schoser B., Lochmuller H., Todorova A, Tournev I., Limb Girdle Muscular Dystrophy 2G in a religious minority of Bulgarian Muslims homozygous for the c.75G>A, p.Trp25X mutation. Neuromuscular Disorders. 2018, 28, 8.**.** IF 2.612
7. Servián-Morilla E, Cabrera-Serrano M, Johnson K, Pandey A, Ito A, Rivas E, Chamova T, Muelas N, Mongini T, Nafissi S, Claeys KG, Grewal RP, Takeuchi M, Hao H, Bönnemann C, Lopes Abath Neto O, Medne L, Brandsema J, Töpf A, **Taneva A,** Vilchez JJ, Tournev I, Haltiwanger RS, Takeuchi H, Jafar-Nejad H, Straub V, Paradas C. POGLUT1 biallelic mutations cause myopathy with reduced satellite cells, α-dystroglycan hypoglycosylation and a distinctive radiological pattern. Acta Neuropathol. 2020, 139, 3, 565-582. IF 17.088
8. Atemin S, Todorov T., Maver A., Chamova T., Georgieva B., Tincheva S., Pacheva I., Ivanov I., **Taneva A**, Zlatareva D., Tournev I., Guergueltcheva V., Gospodinova M., Chochkova L. Peterlin B., Mitev V., Todorova A. MYH7- related disorders in two Bulgarian families: Novel variants in the same region associated with different clinical manifestation and disease penetrance. MYH7-related disorders in two Bulgarian families: Novel variants in the same region associated with different clinical manifestation and disease penetrance. Neuromuscular Disorders. 2021, 31, 25. IF 3.538

Участие в конгреси:

Постери:

1. А.Танева, Т. Чамова, И. Търнев 18-21.05.2017г. Участие в XVI Национален конгрес по Неврология с международно участие с постер на тема: Автозомно-рецесивни пояс-крайник мускулни дистрофии тип 2A и 2G, обусловени от хомозиготни мутации при българо-мохамедани.
2. 08-10.09.2017г. Участие в 12th Balkan Congress of Human Genetics, 2017 с постер на тема Clinical and genetic spectrum of Limb-Girdle Muscular Dystrophies (LGMD) in Bulgaria.
3. 05.2018 г. Участие в XVII Национален конгрес по Неврология с международно участие с постер на тема: "Представяне на нова форма пояс-крайник мускулна дистрофия тип 2Z с мутация в POGLUT1 гена при трима български пациенти"
4. 06.2018г. Участие в 4-ти Конгрес на Европейска академия по Неврология, Лисабон, Португалия, юни 2018 с постер на тема „Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) in Bulgaria"
5. 02-06.10.2018г. Участие в 23-ти Международен конгрес на World Muscle Society, Мендоса, Аржентина, с постер на тема „Limb-girdle muscular dystrophy 2Z in a Bulgarian family,"
6. 16-19.05.2019г. Участие в XVIII Национален конгрес по Неврология с международно участие с два постера- „Клинична и генетична вариабилност на MYH7 - свързаните миопатии в България" и „Първите генетично доказани случаи в България с вродена миопатия на Bethlem."
7. 27-31.10.2019г. Участие в XXIV Световен конгрес по Неврология, Дубай, ОАЕ с постер на тема „Targeted screening for detection of Pompe disease in patients with unclassified Limb-Girdle Muscular Dystrophy (lGMD) using Dried-Blood Spot (DBS) test: Bulgarian experience."
8. Участие на участие в XXI Национален конгрес по неврология, 2022г. с постер на тема „Представяне на семейство с автозомно- доминантна форма на *CAPN3* свързана Пояс- крайник мускулна дистрофия."

Орални презентации:

1. 11-12.10.2018 г. Национална научна конференция по Детска неврология, Психиатрия и Психология на развитието с международно участие, София 11-12.10. 2018, орална презентация на тема: "Пояс-крайник мускулни дистрофии"
2. 28-29.02.2020г. Участие в Научно- практическа конференция "Ден на редките болести в България" с първа наглада за орална презентация по тема "Епидемиологично проучване на автозомно- рецесивните форми на пояс-крайник мускулна дистрофия в България." А.Танева, Т. Чамова, Т. Тодоров, М. Господинова, Д. Златарева, А. Тодорова, И Търнев
3. 01-02.09.2021г Участие в Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието с доклад на тема Клиничен спектър на калпаинопатиите. Представяне на семейство с атипична форма на каллаинопатия с ригиден гръбнак.

Спечелени научни проекти ГРАНТ:

Два проекта към МУ- София в конкурс "Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения- 2018"**,** оценени с отлична оценка с теми:
1. **„**Клинико- генетичен спектър на прогресивни мускулни дистрофии тип пояс-крайник в България"
2. **„**Изследване на генотип- фенотипните корелации при пациенти с дистония- тремор синдром- вариант на Болест на Louis- Bar, обусловен от хомозиготна мутация p.V2716A в *ATM* гена"