

**Molekuláris és funkcionális biomarkerek vizsgálata
dystrophia myotonicában**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Lovadi Emese Ildikó

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Klinikai Idegtudományi Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: **Prof. Dr. Komoly Sámuel DSc.**

Programvezető: **Prof. Dr. Janszky József DSc.**

Témavezetők: **Dr. Pál Endre PhD., Med. Habil.**

Dr. Sebők Ágnes PhD.

PTE Klinikai Központ, Neurológiai Klinika



Pécs, 2021

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	8
1.1. A dystrophia myotonica.....	9
1.1.1. Genetikai háttér és patogenezis.....	9
1.1.2. Fenotípusok.....	13
2. Célkitűzések.....	25
3. FGF-21 szint vizsgálata dystrophia myotonicában és mitochondriális betegségekben	26
3.1. Irodalmi áttekintés.....	26
3.1.1. Az izomdystrophiák biomarkerei.....	26
3.1.2. Biomarkerek dystrophia myotonicában.....	27
3.1.3. Az FGF-21 fehérje mint biomarker.....	28
3.2. Célkitűzések.....	28
3.3. Anyag és módszer	29
3.3.1. Beteganyag.....	29
3.3.2. Módszer	30
3.4. Eredmények	32
3.5. Megbeszélés.....	34
3.6. Jövőbeli célkitűzések.....	36
4. Myotonia során jelentkező kortikális aktiváció fMRI vizsgálata dystrophia myotonicában.....	37
4.1. Irodalmi áttekintés.....	37
4.2. Célkitűzések.....	37
4.3. Anyag és módszer	38
4.3.1. Betegek	38
4.3.2. Képzéskészítés	39
4.4. Eredmények	43

4.5. Megbeszélés	47
4.6. Jövőbeli célkitűzések.....	49
5. Az új eredmények összefoglalása	50
6. Melléletek.....	52
7. Irodalomjegyzék.....	57
8. Publikációs jegyzék	67
Köszönetnyilvánítás.....	70

Rövidítések jegyzéke

BDNF	agyi neurotrophicus factor
BMI	testtömeg index
BOLD	blood oxigen level dependent - vér oxigén szint függő
CBZ	karbamazepin
CK	kreatin kináz
CNBP	CCHC-típusú cink-ujj nukleinsavat kötő fehérje génje
COX-SDH	cytochrome-c oxidáz + szukcinát dehidrogenáz
CUGBP1	CUG-kötő fehérje 1
dACC	dorsalis anterior cingularis cortex
DM	dystrophia myotonica
DM1	dystrophia myotonica 1 típusa
DM2	dystrophia myotonica 2 típusa
DMPK	dystrophia myotonica protein kináz
DNS	dezoxiribonukleinsav
EKG	elektrokardiográfia
ELISA	enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat
EMG	elektromiográfia
FGF-21	fibroblaszt növekedési faktor 21
fMRI	funkcionális mágneses rezonancia képalkotás
FSHD	facio-scapulo-humerális izomdisztrófia
GDF-15	Growth-differentiation factor 15 (növekedési differenciálódási faktor 15)
GGT	gamma-glutamil-transzferáz
hnRNS	heterogén nukleáris RNS

HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance - HOMA - inzulin rezisztencia index
ICD	implantálható defibrillátor
IL	interleukin
ISH	in-situ hibridizáció
JMDRS	Japanese Mitochondrial Disease Rating Scale - A mitochondriális betegségek japán értékelő rendszere
MBNL1	Muscleblind Like Splicing Regulator 1 fehérje
MELAS	mitochondriális myopathia, encephalopáthia, laktát acidosis és stroke-szerű epizódok
MERRF	myoclonusos epilepszia és RRF
MIRAS	mitochondriális ataxia szindrómában
miRNS	microRNS
MNGIE	mitochondriális neurogastrointestinális encephalopáthia
MRC	Medical Research Council
MRI	mágneses rezonancia képalkotás
mRNS	„messenger”, hírvivő RNS
NADH	nikotinamid-adenin-dinucleotid hidrát
NIPPV	nem invazív pozitív nyomású lélegeztetés
NSAID	nem-szteroid gyulladáscsökkentő
NT-proBNP	N-terminális prohormon agyi natriuretikus peptid
PAS	Perjódsav + Schiff reagens
PCR	polimeráz-láncreakció
PEO	progresszív externális ophtalmoplégia
PET	pozitron-emissziós tomográfia

pGSN	plasma Gelsolin
PKC	protein-kináz C
RNS	ribonukleinsav
SDH	szukcinát-dehidrogenáz
SMA	szupplemeter motoros área
SOD	szuperoxid-dizmutáz
STR	short tandem repeat, rövid tandem ismétlődések
TSH	thyreoidea-stimuláló hormon

1. Bevezetés

Az izomdystrophiák a vázizom örökletes, progresszív degenerációját okozó betegségek, mely során az idegi struktúrák megkíméltek maradnak. A betegségcsoportot szimmetrikus izomgyengeség- és atrophia jellemzi, ennek jellegzetességei alapján legtöbbször lehetővé válik a betegségek elkülönítése is. A modern érában már nem csak a betegségek klinikai jellemzői, hanem az azok hátterében álló molekuláris genetikai defektusok és következményes patogenezis képezi a fő tudományos irányvonalat, így osztályozásuk is leggyakrabban molekuláris hátterük alapján történik. A közelmúlt kutatásai megalapozták, hogy méltán tekintünk bizakodóan a jövőbeli genetikai és molekuláris terápiák felé.

A dystrophiák leggyakoribb gyermekkori formája az X-kromoszóma-hoz kötött öröklődésű Duchenne betegség mely során a dystrophin fehérje struktúrája károsodik. A felnőttek körében azonban egy másik, myotóniával járó dystrophia, az autosomalis domináns öröklődésű dystrophia myotonica (DM) a leggyakoribb, amit a facioscapulohumeralis izomdystrophia (FSHD) követ gyakoriságban [1, 2].

Az izomdystrophiák diagnózisa a klinikum mellett az izombiopszia és molekuláris genetikai vizsgálatokra támaszkodik. Az utóbbi évtizedekben több kutatócsoport tett erőfeszítéseket, arra irányulón, hogy az izombetegségekben könnyen kimutatható biomarkereket találjanak. A fibroblast növekedési faktor-21 (FGF-21) a lipid és glükóz metabolizmus egyik regulátora. Több vizsgálatban felmerült szerepe, mint lehetséges biomarker a mitochondriális és más izombetegségek esetében. Ennek alapját az a megfigyelés képezi, mely szerint a mitochondriális érintettségben a FGF-21 szint megemelkedik a már kialakult metabolikus deficit ellensúlyozására [3]. E feltételezés mentén több izombetegségben (mitochondriális myopathia, DM, FSHD) vizsgáltuk az FGF-21 szérumszintjét, melyet jelent munkánk első részében tárgyalunk.

Munkánk második részében a funkcionális mágneses rezonancia képalkotás (fMRI) felé fordulunk, mely segítségével a DM pácienseknél jelentkező myotonia során aktiválódó agyi területeket vizsgáltuk.

1.1. A dystrophia myotonica

A dystrophia myotonica a leggyakoribb felnőttkori izom dystrophia. Első alkalommal 1909-ben Steinert írta le, mint a kongenitális myotonia egyik formája, azonban Batten és Gibb röviddel ezután felismerték a betegség egyedi klinikumát.

A betegség prevalenciája a világ különböző régióiban eltér. A legtöbb vizsgálat Európában 10-20/100.000 esetet talált [4-8], azonban ez az adat valószínűleg alábecsült, a betegek jó részét nem ismerjük fel. Erre utal egy New York államban végzett szűrőprogram is, melynek során a betegség prevalenciáját 48/100.000-re becsülték [9].

A betegséget progresszív izomgyengeség és atrophia, valamint myotonia jellemzi. A myotonia egy adott izom erő kifejtését követő átmeneti relaxációs képtelensége. A jelenség leggyakrabban a kézszorítás, időnként a beszéd vagy az állkapocs nyitás következtében alakul ki, de ez magyarázza a gyors alternáló mozgásokat kívánó futás képtelenségét is a betegek többségében.

A betegségnek két altípusa ismert. Az 1-es típus (DM1) a klasszikus Steinert dystrophiának felel meg, míg a 2-es típust (DM2) 1994-ben írták le először. Itt az izomérzékenység proximális túlsúlyú, egyéb tünetei hasonlóak, de enyhébbek, mint a DM1 típusának. Prevalenciájára vonatkozóan jelenleg nincs egyértelmű adat, azonban úgy tűnik Európában a betegség előfordulása a DM1-éhez hasonló [10]. Az enyhébb klinikum miatt a diagnózis gyakran késik, a betegség valószínűleg aluldiagnosztizált.

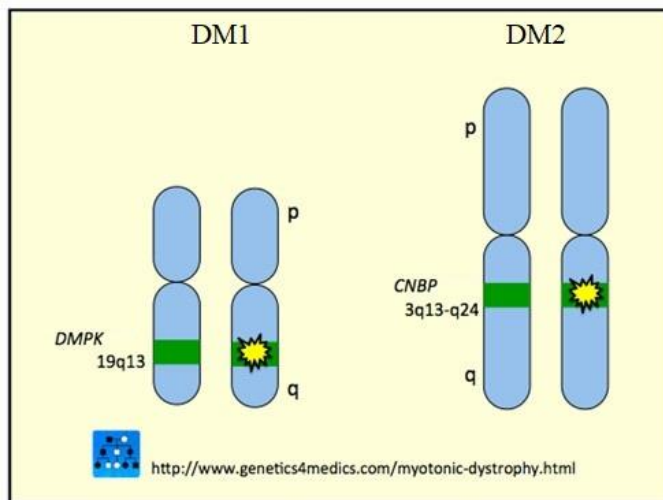
Az izomtünetek mellett a dystrophia myotonica-t multiszisztémás érintettség jellemzi (szem, agy, szív-érrendszer, belső elválasztású mirigyek stb.).

1.1.1. Genetikai háttér és patogenezis

A dystrophia myotonica nagy variabilitást mutat, ami a tünetek súlyosságát, lefolyását és a betegség kezdetét illeti. A multiszisztémás érintettség és a klinikai tünetek heterogenitásáért mindkét altípusnál egy változó hosszúságú repeat expanziója a felelős. A DM1 esetében a dystrophia myotonica protein kináz (*DMPK*) vagy *myotonin* génen a 19q13.3 lókuszon, egy instabil „DM-kritikus régióban” CTG repeat expanzió következik be (1. ábra) [11]. Egészségeseknél a repeat-ek száma 5-37 között van és kb. 50-es repeat számig (pre-mutált allél) a betegség tünetmentes. 50 repeat felett az allél penetranciája teljes, szinte minden esetben manifesztálódik a betegség. A DM1 enyhe formájában szenvedőknél 50-150, a súlyosabb

eseteknél 150-1000, congenitális formában pedig 2000-nél hosszabb CTG repeat-eket találunk. Az expanszió hosszúságával arányos a betegség súlyossága és az első tünetek megjelenésének időpontja. Szintén a repeat expanszió magyarázza a DM1-ben jellegzetes anticipáció jelenséget is. A generációk közötti instabilitásra a hordozó szülő neme is hatást gyakorol, kimutatták, hogy anyai átörökítés esetében a CTG repeatek számának növekedése sokkal kifejezettebb. Ez lehet a magyarázata annak a megfigyelésnek, miszerint a congenitális formák leggyakrabban anyai átörökítést követően fordulnak elő [12].

A dystrophia myotonica 2-es típusért egy citozin-citozin-timin-guanin (CCTG)



1. ábra . A DM1 és DM2 genetikai háttere.

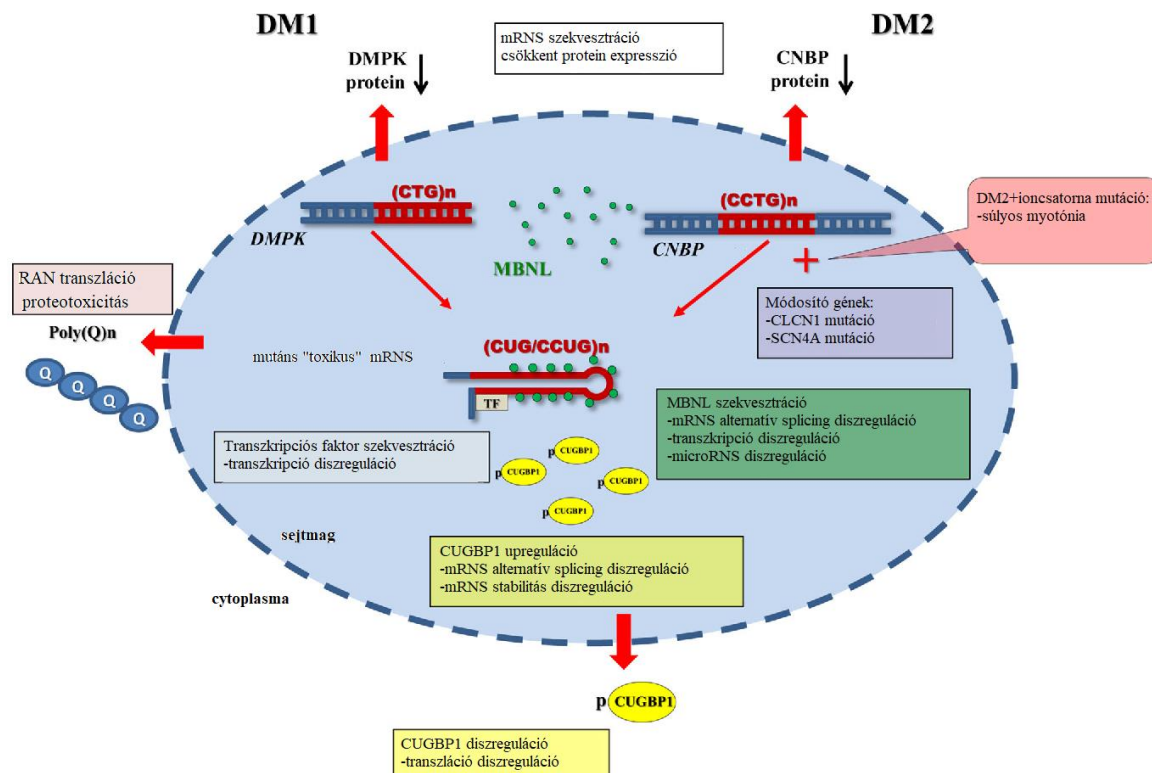
tetranukleotid expanszió felelős. (A repeatszám egészségeseknél kb. 26, betegekneként átlagosan 5000.) Ez a 3q21.3 lókuszon található *ZNF9*, más néven *CNBP* génben helyezkedik el. (1. ábra) [13]. A vizsgálatok arra utalnak, hogy a DM1-el ellentétben a DM2-ben a repeat expanszió hossza nem korrelál a betegség súlyosságával [14].

A betegség mindkét altípusánál az 1-6 repeatből álló, neutrális, nem kódoló ún. mikroszatellita, másnéven short tandem repeatben (STR) következik be az expanszió. Hasonló jelenséghez már több mint két tucat neurológiai betegség köthető (pl. Fragilis X szindróma, Kennedy szindróma, spinocerebellaris ataxiák egyes típusai, stb.). A mikroszatellita expanszió következtében a kapcsolódó géneken funkcióvesztés vagy új funkció megjelenése következhet be, emellett az abnormális fehérje aggregátumok lerakódhatnak a sejtben, károsítva annak funkcióit [15]. A különböző genetikai háttér ellenére DM1 és DM2 esetében sok tekintetben hasonló klinikai kép alakul ki, mely a patológiás RNS molekula toxicitásának tudható be [16].

DM1-ben a trinukleotid repeat transzkripciójának következtében megváltozott szerkezetű RNS-ek jönnek létre, melyek alapvető sejtfunkciókat károsítanak, beleértve az RNS processing, -lokalizáció és transláció folyamatát. A DM-ben ezt a toxikus hatást elsősorban az RNS-kötő fehérjék modulációja váltja ki. Ezen RNS kötő fehérjék diszfunkciója károsítja az RNS processinget, ami hibás fehérje izoformák létrejöttéhez és akkumulációjához vezet. A vázizom különösen érzékeny ez ilyen, RNS-t érintő defektusokra. Az érintett fehérjék a sejtben

lerakódva ribonukleáris inklúziókat hoznak létre, melyek ellenállnak a degradációnak - ezt stabil szerkezetük, vagy a hozzájuk erősen kötődő fehérjék okozhatják [17].

Az MBNL fehérjék fontos szerepet játszanak a DM patogenezisében. Mindhárom izoformájuk a sejtmagban szekvesztrálódik, mert az mRNS-ben hajtű szerkezetet kialakító expandált repeat megköti, és ezáltal működésképtelenné teszi őket. Az MBNL fehérjék (MBNL 1, 2 és 3) nagy mennyiségben vannak jelen a váz- és szívizomban, és szerepük van az alternatív splicing szabályozásában. Újabb kutatások rámutattak az MBNL fehérjék mellett



2. ábra. A DM1 és DM2 patomechanizmusa. Az alapvető patológiai mechanizmus az RNS funkciónyerés modelljén alapul. Ennek során a DMPK és CNBP mRNS-ek 3'-végi, nem kódoló régiójában lévő (CTG)*n* vagy (CCTG)*n* expansió (megváltozott szerkezetű, toxikus RNS) kétszálú, hajtűkanyar-szerű konformációt vesz fel. Ez a mRNS a sejtmagban halmozódik fel, és különböző, az RNS-ek érésében szerepet játszó fehérjéket (pl. MBNL -zöld körök-, CNBP) köt meg. Ez az alternatív splicing és transzkripció károsodásához, valamint a microRNS diszregulációjához (zöld doboz) vezet. Ezen felül a toxikus mRNS a CCUGBP1 (szintén az alternatív splicing egyik fehérjéje) hiperfoszforilációjához ezáltal működésének fokozásához vezet.

több RNS kötő fehérje diszregulációjára is, ezek a CUGBP1, hnRNP H és Staufen1 fehérjék. A CUGBP1 szintén az alternatív splicing regulátora, valamint szerepet játszik az mRNS translációjában és stabilitásában, azonban nem halmozódik fel ribonukleáris zárványokban. Bebizonyosodott azonban, hogy in vitro kötődik az RNS CUG repeatokhoz. Klasszikus felnőttkori DM1-ben kimutatták a CUGBP1 PKC-mediált hiperfoszforilációját, azonban DM2 betegek izombiopsziáiban ez nem volt kimutatható. Ez arra utal, hogy a MBNL1 szekvesztrációnak központi szerepe van a splicing deregulációjában a DM mindkét típusában, melyhez DM1-ben hozzáadódik a CUGBP1 overexpressziója is. A CUGBP1-nek az mRNS

transzlációjában és stabilitásában is szerepe lehet. Másrészt a cyclin D3-cdk4 csökkent szintje miatt sok foszforilálatlan CUGBP1 halmozódik fel a sejtben, mely inaktív komplexumokat alkot, ezzel is befolyásolva a myoblast differenciációhoz szükséges mRNS-ek transzlációját.

Ezek az adatok megerősítik azt a hipotézist, miszerint a pre-mRNS poszt-transzkripcionális folyamatainak károsodása lehet a DM páciensek változékony fenotípusának alapja (2. ábra) [10].

A splicing-ban bekövetkező rendellenesség (spliceopathia) okozhatja a DM1 vázizomsejtben kimutatott inzulin rezisztenciát is. Ennek hátterében az állhat, hogy a CUG repeatek miatt expandált RNS csökkentheti a inzulin receptor 11-es exonjának inklúzióját melynek eredményeképpen csökkent szignálkapacitású inzulinreceptor-fehérje jön létre [18]. Emellett a betegségben kimutatható az aerob sejtlegzésben résztvevő Coenzyme Q10 csökkent szintje [19] mely mitochondriális diszfunkcióra utal, ennek szerepe a DM1-ben egyelőre nem tisztázott. Szintén mitochondriális diszfunkció figyelhető meg inzulin rezisztenciában, 2. típusú diabetesben is, valamint a sejtöregedéssel is összefüggésbe hozható. Bár az eddigi vizsgálatok nem tisztázták egyértelműen, hogy a mitochondriális diszfunkció oka vagy következménye ezen metabolikus eltéréseknek [20], megfigyelhető azonban, hogy mind az inzulin rezisztencia mind a korai sejtöregedés gyakran fordulnak elő DM-ben [21] [22].

Mint ismert az izomdystrophiák esetében a krónikus izomkárosodás és regeneráció fibrózishoz és az izomgyengeség fokozódásához vezet. Ehhez az emelkedett oxidatív stressz szintén hozzájárulhat [23], így ez a folyamat is azon patogenetikai faktorok egyike lehet, mely befolyásolja a betegség súlyosságát [24, 25]. Clarissa M és mtsai DM1 betegeknél alacsonyabb szérum SOD (szuperoxid-dizmutáz) aktivitást találtak, valamint magasabb volt az interleukin (IL)-1B és alacsonyabb az IL-10 szintjük. Ennek hátterében a betegség következtében létrejött pro-inflammatórikus állapot és az anti-inflammatórikus ellensúlyozó folyamatok állhatnak [26].

A DM2 leukocita DNS-ben vizsgált CCTG repeatszám úgy tűnik, elsősorban a beteg életkorával korrelál, kevésbé a tünetek súlyosságával. A DM mindkét altípusára jellemző az élethosszig tartó szomatikus instabilitás következtében kialakuló sejtípusok közötti variabilitás és szomatikus mozaicizmus. A DM2-ben bekövetkező mutáció általában összehúzódik a következő generációban, így a gyermekben az expansió rövidebb lesz [27]. Ez magyarázhatja a kongenitális forma és az anticipáció hiányát, valamint a tünetek későbbi kezdetét [14].

A DM2 a fenotípusban is nagy a variabilitás. A myotonia nem mindig jelenik meg, és enyhe, kialakulása feltehetően az egyik izom-klorid csatorna gén alternatív splicing-jához köthető. A DM2 patomechanizmusáért a DM1-hez hasonlóan a CUG/CCUG transzkriptumok felhalmozódása felelős. A mutáns RNS hibás kétszálú struktúrát alkot mely több RNS kötő fehérje deregulációjához vezet (MBNL és CUGBP1) melyek az alternatív splicing regulátorai. Így ez a forma is a hibás splicing miatt alakul ki („spliceopáthia”). Ennek következtében a DM2-ben is jellemző a myotonia és az insulin rezisztencia, a CIC-1 és insulin receptorok hibás alternatív splicingja következtében (2. ábra) [10].

A betegség két altípusának fenotípusa közti különbséget a DMPK és CNBP gének különböző térbeli helyzete, és az eltérő szomszédos gének okozhatják. Fontos tényező lehet, ahogy előbb már részleteztük, hogy mindkét típusnál károsodik az MBNL1 funkciója, azonban a DM1-ben ehhez a CUGBP1 overexpressziója is társul, mely tovább erősíti a hibás splicing-et [28].

Összefoglalásként elmondható, hogy a spliceopáthia a DM mindkét típusának alapvető molekuláris jellemzője. Újabban egy másik elmélet is napvilágot látott, mely szerint a repeat asszociált non-ATG transláció következtében potenciálisan toxikus fehérjék is létrejönnek, melyek szintén akumulálódhatnak a sejtben [29].

1.1.2. Fenotípusok

1.1.2.1. Kongenitális dystrophia myotonica

A kongenitális dystrophia myotonica tünetei különböznek a felnőttkori formától. A kongenitális DM1 az újszülöttkori légzési elégtelenség leggyakoribb oka [2]. Gyakran alul diagnosztizálják. A tünetek többsége már az intrauterin életben kezdődik, erre utalnak a renyhe magzatmozgások és a polyhydramnion. Az újszülöttnél faciólis diplégiája van, hypotoniás, lélegeztetésre szorul, nem tud szopni, időnként dongalábú, ritkán generalizált kontraktúrája van, arca aránytalan, bordái vékonyak és magasan áll a rekeszizma. A kezdeti fázist túlélő újszülöttek motoros funkciói fokozatosan fejlődnek, megszűnik a nyelés- és ventilációs zavar. A szellemi és motoros fejlődés mérföldköveinek elérése késik, az összes kongenitális dystrophia myotonica 1-es betegnél tanulási nehézségeket észlelünk, speciális nevelési igényűek. A cerebrális atrophia és a kamratágulat gyakran már születéskor jelen van. A betegek járóképesek lesznek, viszont a széklet inkontinencia gyakran gondot okoz [12].

A DM mindkét altípusában előforduló tünetek

Myotonia
Izomgyengeség és atrophia
Korán jelentkező cataracta
Szívritmuszavar
Dilatatív cardiomyopathia
Kognitív deficit
Hypersomnia
Magasabb GGT
Inzulin rezisztencia/diabetes mellitus
Testicularis atrophia
Frontális kopaszodás
Hypogammaglobulinaemia
Izomfájdalom

1. táblázat. A DM mindkét altípusában előforduló tünetek

felnőttkori DM-hez hasonló tünetek jelentkeznek. A szívritmuszavar előfordulása serdülőkorban 15-20%-ra tehető, mely sport és fizikai aktivitás hatására fokozottan exacerbálódik, de a strukturális szívizom eltérések és cardiomyopathia előfordulása 10% alatt marad [31].

1.1.2.3.A felnőttkori dystrophia myotonica

1.1.2.3.1. Klinikai jellemzők

A dystrophia myotonica döntően izomérintettséggel járó multisisztémás betegség. A betegség két altípusa között sok hasonlóságot találunk, azonban a számos tünet alapján jól elkülönülnek egymástól. Az 1. táblázatban két altípus közös jellemzőit soroljuk fel, a különbségeket és az eltérő manifesztációkat a 2. táblázat részletezi.

Az EMG újszülött korban nem mindig igazolja egyértelműen a myotonia meglétét. Az izombiopszia döntő fontosságú lehet, egyértelműen kórjelző. Az éretlen izomrostokban sok centrális mag és számos szatellita sejt látható, a rostok perifériáján az oxidatív enzimreakció szegényes [2]. Ezt követően genetikai vizsgálattal lehet a kórképet biztosan diagnosztizálni.

1.1.2.2. Gyermekkori dystrophia myotonica

A betegség gyermekkori formájának első tünetei típusosan 10 éves kor előtt alakulnak ki. Ezek legtöbbször kognitív- és viselkedésproblémák, figyelemzavar, alacsonyabb intellektus [30]. Később a

Izomérintettség

A DM1-ben az izomgyengeség elsősorban az arcizmokban, a sternocleidomastoideusban, valamint disztális végtagizmokban (alkar és kéz izmaiban és a boka dorzálflexoraiban) jelenik meg [32]. A jellegzetes „facies myopathica” kialakulásában a mimikai izmok, a m. levator palpebrae (ptosis) és a rágóizmok gyengesége játszik szerepet. Ritkábban, illetve a betegség késői szakaszában fordul elő a proximális izomzat, légzőizmok, bulbáris izmok érintettsége. A betegséghez gyakran szubklinikus perifériás neuropátia is társul mely főleg a motoros rostokat érinti, férfiaknál és idősebb betegeknél gyakoribb [33].

A betegség lefolyása során az életkor előrehaladtával az izomgyengeség progrediál, járási instabilitás alakul ki, ennek következtében a betegek körében az elesések gyakorisága tízszer magasabb [34]. A DM2 korai manifesztációja leggyakrabban a csípő extensorok és ujj flexorok gyengesége, ennek következtében gyakran nehezített a felállás vagy a lépcsőzés [35]. A betegség előrehaladtával a térd extensorok is meggyengülnek, főleg a triceps érintettsége jellemző [14]. Az izomfájdalom mindkét típusban előfordulhat, DM1-ben főleg az alsó végtagokat érinti, és nem függ a myotóniától [36].

DM2-ben az izomfájdalom gyakran az izomgyengeség előtt jelentkezik, a betegség első tünete lehet [37]. A fájdalom sokszor köthető az izommunkához, befolyásolja a hőmérséklet, valamint jellemző az izmok nyomásérzékenysége is [38]. A fájdalom jellege miatt a betegséget korai stádiumában viszonylag gyakran fibromyalgiaként diagnosztizálják [39].

Az izomzat normál összehúzódást követő, elnyújtott, abnormális relaxációját myotoniaként definiáljuk. A myotonia jelen van az arcizmokban, a kezekben és az alkarban is. Kiváltható izomösszehúzódással (szorítási myotonia), vagy percussióval (percussio myotonia). Utóbbi során az izmokban és a nyelven a myotonia következtében kis összehúzódás (dombocska) keletkezik. A hideg vagy stressz fokozza a myotóniás tüneteket [36]. A myotonia befolyásolhatja a mindennapi tevékenységeket, háztartási eszközök használatát, ajtókilincs nyitását, a gyors alternáló mozgások végrehajtását (pl. futás képtelensége). A kézben jelentkező myotonia javulhat ismételt kontrakciók során – ez a „bemelegedési jelenség”. A myotonia jellemzőbb a DM1-re, kevésbé kifejezett, vagy hiányozhat DM2 esetén, így az utóbbira sok, myotóniát nem mutató páciens esetében is gondolnunk kell [35, 36].

Sokszervi érintettség

A szív-érrendszer tekintetében a vezetési zavarok és tachyarritmiák az átlagpopulációhoz képest hatvanszor gyakoribbak és szignifikánsan közrejátszanak a dystrophia myotonica 1-es és 2-es típusának morbiditásában és mortalitásában [40]. A kardiális érintettség rizikója már fiatal korban magas és élethosszig az marad, emiatt elengedhetetlen a kardiológiai gondozás már a betegség diagnózisától kezdve [41].

Leggyakoribb elváltozások az elsőfokú atrio-ventrikuláris blokk, mely gyakran a betegség többi tünete előtt megjelenhet, valamint a mitrális prolapsus és cardiomyopathia. A dystrophia myotonica 1-ben szenvedő betegeknél 7.3-szor magasabb volt a kardiális mortalitás, mint az átlagpopulációban, az elhalálozások okának 30%-a volt szív eredetű [42]. Annak ellenére, hogy nincs evidencia a fokozott atherosclerosis kialakulására dystrophia myotonica 1-ben, de a hirtelen halál, malignus arrhythmia, progresszív balkamra diszfunkció és az ischaemiás szívbetegség előfordulása jelentősen magasabb. Gyakoriak a tachyarrhythmia, bradyarrhythmia, megnyúlt PR szakasz (40%), széles QRS komplexusok (25%) és a mono-, vagy polymorph kamrai tachycardia, kamrafibrilláció [43].

NT-proBNP és copeptin szintje a pitvarfibrilláció és a vezetési zavar 2 független rizikófaktora, így ezeknek mérése ajánlott DM1-ben [44]. Kimutatták, hogy a súlyos EKG elváltozások szintén előre jelezték a hirtelen halált. Amennyiben lehetséges volt az elektrodiagnosztika, az elhalálozottak 50%-ban észleltek kamrai tachyarrhythmia. Átlag 5.7 éves követés során a betegek 7%-a halt meg kardiális ok miatt bekövetkező hirtelen halál miatt [45]. A vezetési zavarok és aritmiák már korai életkorban felléphetnek, még akkor is, ha a myopathia enyhe. Ezek előfordulása nem korrelál a CTG repeat expansió hosszúságával [46]. A fizikai aktivitás kiválthatja a szívritmuszavart az addig tünetmentes dystrophia myotonica-ban szenvedő fiatal betegekben, ezért javasolt terheléses EKG vizsgálat elvégzése az intenzív fizikai igénybevételt megelőzően. A szívritmuszavarokhoz viszonyítva a cardiomyopathiák előfordulása ritka és általában nem okoz gondot a betegek számára [12].

Az előbbiekhöz képest a dystrophia myotonica 2-es típusában szenvedőknél a vezetési zavarok ritkábbak, a supraventricularis arrhythmia gyakorisága hasonló, de a balkamra diszfunkció és a magas koleszterin szint sokkal gyakoribb [47]. A betegek körében előforduló hirtelen szívhalál hátterében legtöbbször dilatatív cardiomyopathiát és az ingervezető rendszer fibrózist állapították meg [48]. Ezért ajánlott a mind a szimptomás, mind az aszimptomás

betegek és első és másodrendű hozzátartozóik ilyen irányú szűrése. Ez egy EKG vizsgálat, 24-órás ambuláns EKG és echocardiogramm elvégzését feltételezi [49].

Mind a DM1, mind a DM2-re jellemző az enyhe *kognitív deficit*, mely elsősorban az executív funkciókat és térlátást érinti [50] és még a normális IQ-val rendelkező betegeknél is kimutatható. E mellett a DM1 betegek körében gyakori a személyiség-, viselkedés- és figyelemzavar is, ez utóbbi az életkor előrehaladtával súlyosbodik [51]. A DM2-ben a fenti rendellenességek előfordulása és súlyossága számottevően alacsonyabb.

A DM1 betegeknél gyakori (33-88%) a hypersomnia és a nappali aluszékonyosság is. Ennek hátterében valószínűleg centrális ok áll, és kevésbé a betegségre szintén jellemző légzésszavar okozza [37, 52, 53]. A DM2 betegek körében a nappali aluszékonyosság enyhébb és sokkal ritkábban fordul elő [54].

A cataracta egyaránt érinti a dystrophia myotonica 1-es és 2-es típusában szenvedő betegeket. Az izomtűnetek mellett az 55 éves kornál hamarabb jelentkező, a posterior subcapsularis cataracta és ennek a családi halmozódása is utalhat dystrophia myotonica-ra [1]. DM2-ben a betegek 25%-nál az izomtűneteket megelőzően jelentkezett a cataracta [55].

Clarissa M Comim és mtsai alacsonyabb BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor; agyi neurotrophicus faktor) szérumszintet találtak DM1-es betegeknél. Ez a fehérje a tanulás és memória funkciókban vesz részt, szérumszintje csökken egyes neurodegeneratív betegségekben is (pl. Huntington vagy Alzheimer-kór). Így ezen rendellenesség szintén megerősíti a központi idegrendszer primer érintettségét ezeknél a betegeknél, és összefügghet a gyakori fehérállományi léziók és agyi atrophia kialakulásával is [26].

Az endokrinológiai rendellenességek gyakoriak, legtöbbször a pajzsmirigy, pancreas, hypothalamus és a gonádok érintettek. Férfiakban a gyakrabban előforduló hereatrophia infertilitáshoz vezet. A terméketlenség fennállhat az egyébként tünetmentes betegeken is. A nők esetében a többszöri vetélések és a rendszertelen menstruáció gyakoriak [56]. A cukorbetegség nem gyakoribb a DM1-es betegek körében az átlagpopulációhoz képest, de a glükóz tolerancia teszt gyakran mutat ki inzulinrezisztenciát. Másodlagosan emiatt fokozott inzulintermelés áll fenn, amit az inzulin receptor mRNS abnormalis splicingja okozhat. A DM2-ben a diabetes előfordulása valamivel gyakoribb [36]. Egy, 52 DM2-vel diagnosztizált beteget vizsgáló tanulmányban a betegek 63.8%-ában inzulin rezisztenciát, 31,9%-nál pedig II. típusú diabetes mellitus-t találtak [57].

Tünetek és szervi érintettség	DM1	DM2
Első tünet	Születéstől	8-60 éves kor között
Anticipáció	felnőttkorig	-
Kongenitális forma	+	-
Fogyatékoság	+	60 éves kor után
Várható életkilátás	30-35 éves kor után	Átlagos
Alapvető jellemzők:	Csökkent	
Klinikai myotonia		+ (<50%-nál van jelen)
EMG myotonia	+++	+/-
Izomgyengeség	+++	60-70 éves korban kezdődik
Izomgyengeség eloszlása		
Arc- és rágóizmok		
Bulbáris izmok, diszfágia	++	-
Légzőizmok	Idősebb korban	-
Disztális végtagizomzat	mindig	-
Proximális végtagizomzat	Idősebb korban	+/-
Sternocleidomastoideus érintettsége	mindig	Főleg idősebb korban
	+++	-
Izmokat érintő tünetek	+/-	
Myalgia	+	+++
Klinikai izomatropia		-
Vádli hypertrophia	+/-	++
Izombiopszia	Arc, végtagok	
Izomrost atropia	disztálisan	2-es tip. rost
Nukleáris összecsapzódás (nuclear clump fibers)	-	Már az izomgyengeség előtt
Sarcoplasmikus massa	1-es tip. rost	-
Gyűrűrostok	Későn	+/-
Belső magok		+/- főleg a 2. tip. rostokban
	+++	
Szisztémás érintettség	++	
Cataracta	A disztális izmokban	+
Szívritmuszavar	mindig	Változó
Tremor		+
Viselkedészavar	+++	-
Hypersomnia	+++	-
Kognitív deficit	-	+/-
Diabetes mellitus	+	+/-
Férfi hypogonadismus	+	+/-
Frontális kopaszodás	++	-
	++	
	+	
	+++	

2. táblázat. DM1 és DM2 összehasonlítása -izomtűnetek és szisztémás érintettség [58]

A *légzési elégtelenség* elsősorban a kongenitális DM-re jellemző, azonban a felnőttkori formákban is előfordul. Ennek hátterében a garat és oesophagus gyengesége, a légzőizmok gyengesége és myotóniája és a légzőközpont feltételezett rendellenessége állhat [59]. A rekeszizom gyengesége és myotóniája, valamint a nyelési nehézségekből fakadó gyakori aspiráció növeli a légzési elégtelenség és az aspirációs pneumónia kialakulásának kockázatát leginkább a súlyos tüneteket mutató betegekben. Az általános érzéstelenítés gyakran komplikációkkal jár a DM1-es betegeknél. Ezek általában respiratórikus és kardiovaszkularis eredetűek [43, 60]. A DM2 betegek körében légzési elégtelenség csak ritkán fordul elő, és sosem súlyos lefolyású [61].

A DM1 betegek nagy része küzd bizonyos mértékben *gastrointestinális panaszokkal*. Gyakori a dysphagia és a következményes aspirációs pneumónia, valamint az epekövesség [62]. A DM2-ben a gastrointestinális manifesztációk enyhe diszfágiában, konstipációban, hasi fájdalomban nyilvánulhatnak meg [63, 64].

1.1.2.3.2. Diagnosztikus vizsgálatok

A betegek többségénél a diagnózis a családi anamnézis és klinikum alapján felállítható és genetikai vizsgálatokkal megerősíthető. DM1-es betegek a disztális izomgyengeség és myotonia, míg DM2 betegek izomfájdalom, fáradékonyság vagy proximális izomgyengeség miatt fordulnak leggyakrabban orvoshoz [14].

A betegség diagnózisának gold standard-ja a genetikai vizsgálat, azonban a jellemző klinikai tünetek mellett az EMG vizsgálat is fontos eszköz a myotonia kimutatására, mely negatív genetika esetén csatornabetegség, paramyotonia vagy myotonia congenita lehetőségét veti fel. Az ioncsatorna betegségekben általában nem találkozunk a DM-ben jellemző kifejezett izomatropfiával, vagy permanens izomgyengeséggel.

Genetikai vizsgálat

A specifikus genetikai tesztelés az expandált CTG repeat-ek kimutatásán alapszik (PCR, régebben Southern blot) a *DMPK* génben. 50 fölötti repeatszám patológiás, manifeszt betegséghez vezet.

A DM1 genetika negativitása, proximális izomtűnetek és myotonia társulása esetén a jellemző klinikai kép alapján a DM2 gyanúja merül fel. Ezesetben a *ZNF9 (CNBP)* génen a

CCTG repeat expansziójának kimutatása diagnosztikus értékű, mely 75 fölötti repeatszám esetén patológiás.

A betegségre jellemző szomatikus instabilitás megnehezíti a korábban megszokott Southern blot és PCR technikák használatát. Emiatt terjedt el a long-range PCR és Southern-Blot kombinációján alapuló eljárás, azonban különbség lehet a meghatározott repeat számban az alkalmazott módszer függvényében [65].

A DM2-t okozó CCUG repeat expanszió azonosítható in-situ hibridizációs (ISH) technikával is. A módszer kimutatja a patológiás mRNS zárványok jelenlétét a dystrophia myotonica 2-es típusa által érintett szövettani metszetben, és azok hiányát a dystrophia myotonica 1-es típusa által érintett izmokban [66]. Az MBNL1-fehérje zárványok is kimutathatóak ezzel a technikával azonban ez nem teszi lehetővé a DM1 és DM2 közti differenciálást, viszont ezek izombiopsziás mintavételt igényelnek, ami nem feltétlenül része a diagnosztikus folyamatnak [28].

Izombiopszia

Az izombiopszia vizsgálata hasznos lehet, amikor a páciensnél kifejezett izomgyengeséget, emelkedett izom-enzim értékeket, vázizomzat mágneses-rezonancia elváltozásokat vagy patológiás elektromyográfiás leletet találunk, viszont mellőzhető, ha a fenotípus és a tünetek alapján kevésbé invazív módszerekkel is biztos diagnózishoz juthatunk.

A fénymikroszkópos vizsgálattal enyhe rostátmérő-variabilitást, nagyszámú centrális magot, magsorokat, sarcoplazmatikus masszát és gyűrűrostokat látunk az izomban. Degeneratív jelenségek, rostnecrosis, regeneráció, kötő- és zsírszövet lerakódás, kereksejtes infiltráció csak ritkán van jelen az izomban [2].

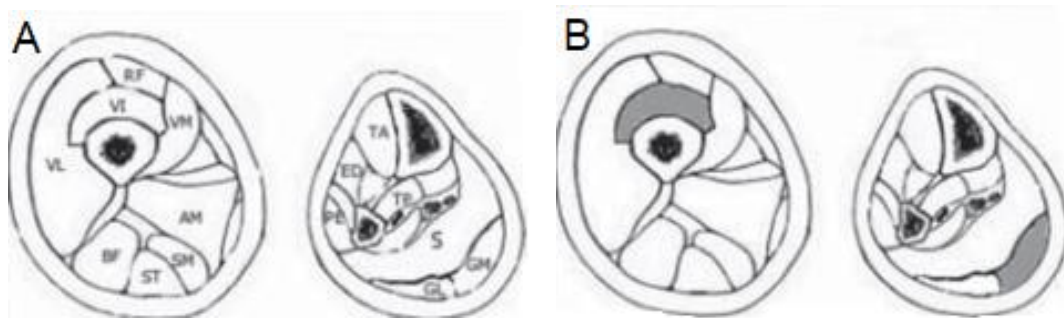
A 2-es típusú dystrophia myotonica szövettani képe több vonatkozásban eltér az 1-es típusétól. A dystrophia myotonica 2-es típusának diagnózisa megjósolható, amennyiben a nagyszámú belső mag szelektív 2-es rost atrophíával társul [28]. Ez megerősíti azt a feltételezést, mi szerint a 2-es típusú dystrophia myotonica alapján véve a 2-es típusú rostok megbetegedése. Ez a megfigyelés megalapozza azt a feltevést, mi szerint a betegség két típusát ellentétes patológiai elváltozások jellemzik, ami az 1-es és 2-es rostok érintettségét illeti [67].

A dystrophia myotonica 2-es típusának klinikai képe enyhébb és igen változatos, ezért a diagnózis is sok esetben késik. A jellegzetes szövettani kép utal a betegségre, és jelzi a biztos diagnózist jelentő genetikai vizsgálat szükségességét [47].

Képalkotó vizsgálatok

A dystrophia myotonica betegek körében elvégzett agyi MRI vizsgálatok során számos rendellenesség igazolódott a központi idegrendszer szintjén. Gyakori a frontális és temporális lebenyt érintő atrophia és a subcorticalis fehérállományi léziók előfordulása [68].

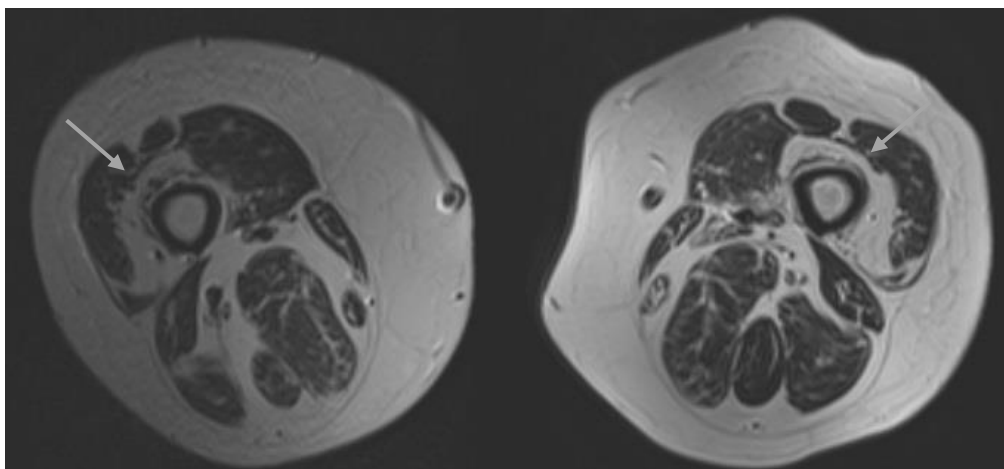
PET vizsgálatok során a DM1, és valamivel kevésbé a DM2 betegek körében is kimutatható volt a frontális és temporális lebenyek hypoperfúziója, mely összefügghet az elsősorban a DM1-ben észlelt exekutív funkciózavarral [69]. A DM2 betegeknél főleg a szürkeállományt érintő atrophia fordul elő mely az agytörzsre, thalamusra lokalizálódik, de érintett lehet a corpus callosum fehérállománya is [70]. A fehérállományi és központi idegrendszeri pályák főleg a DM1-ben érintettek. A fehérállományi léziók időbeli progressziója demyelinizáció és/vagy axonális károsodás lehetőségét vetik fel [71]. A DM2-ben észlelt MRI eltérések sokkal enyhébbek voltak. A DM1 betegeknél az agyi eltérések súlyossága korrelál a CTG repeat expanszió mértékével [72].



3. ábra. A) Normális comb és alszár izomszerkezete. B) Dystrophia myotonica-ban jellemző izomérintettség (szürkével). Rövidítések: AM = m. adductor magnus; BF = biceps femoris; RF = rectus femoris; VI = vastus intermedius; VL = vastus lateralis; VM = vastus medialis; SM = semimembranosus; ST = semitendinosus; ED = extensor digitorum longus; GL = gastrocnemius lateralis; GM = gastrocnemius medialis; PE = peronealis izmok; S = soleus; TA = tibialis anterior; TB = tibialis posterior *Pál 2011 Role of MRI*

Az MRI nemcsak a központi idegrendszer vizsgálatára, hanem a vázizomzat vizsgálatára is alkalmas. Az egyes izomcsoportokra a jellemző eloszlású atrophiat izom-MRI segítségével követhetjük. T1 súlyozású mérések elsősorban a zsíros degeneráció és atrophia megítélését teszik lehetővé, a STIR súlyozás az aktív degeneráció/oedema képződést tükrözi. Kvantitatív,

volumetriás mérések segítségével az egyes izomcsoportok eltéréseit is követhetjük. A vizsgálat alkalmas a szubklinikus izom érintettség kimutatására: míg a lábszárizmokban általában markáns degeneratív eltéréseket találunk (tibialis anterior, m. triceps surae, m. gastrocnemius medialis izmok részéről), addig a combizomzatban a degeneráció/atrophia mérsékelt, jellemző a quadriceps femoris izom centralis részének „félhold” degenerációja már a betegség korai fázisában (3. és 4. ábra) [73, 74]. Szintén ezt a jellegzetes degenerációs mintázatot találták DM1-ben egy a DM1 és DM2 betegek teljes test MRI képeit összehasonlító vizsgálatban. Eredményeik alapján azonban a DM2-ben nem volt kimutatható hasonlóan jellegzetes izomérintettség, a betegségre jellemző myalgia és enyhe paresis nem járt MRI eltérésekkel [75].



4. ábra. A *dystrophia myotonica*-ban jellegzetes „félhold degeneráció” (*quadriceps femoris*, 55 éves nőbetegünk)

Egy vizsgálatban az MRI segítségével kimutatható zsír-víz arány emelkedés és a magasabb T2 relaxációs idő a boka dorsalflexiójának gyengülésével korrelált, mely arra utal, hogy az izom MR vizsgálat a betegség progressziójának és a terápiás válasz megítélésének noninvazív eszköze lehet [76]. A vizsgálattal követhető a DM1 progressziója [77], de a módszer alkalmazása a klinikumban hazánkban egyelőre kevésbé terjedt el.

1.1.2.3.3. A betegek gondozása, therápiás lehetőségek

A betegek gondozása a genetikai tanácsadáson és a többszervi érintettség okozta szövödmények megelőzésén alapul. Kiemelten fontos a mozgásszervi rehabilitáció a mobilitás minél hosszabb ideig való megőrzésében. A betegség mindkét típusában előforduló kardiális érintettség miatt fontos a gyakori EKG monitorozás és echocardiographia.

Az izomgyengeség kezelésére ill. javítására több gyógytorna programon alapuló vizsgálat tett kísérletet. Ezek kis esetszámmal dolgoztak és jelenleg nem nyújtanak elég erős evidenciát

egy ilyen irányú protokoll kidolgozásához. Munkacsoportunk az otthoni és intézeti kezelés hatékony kombinációját dolgozta ki, eredményeink publikálása folyamatban van.

A betegség patogenezisének megismerése ígéretes előrelépést vetít előre a therápiás lehetőségek körében is. Vizsgálatok folynak olyan kis molekulák alkalmazásával, melyek az expandált CUG repeatekhez kötődnek, így megakadályozva a ribonukleáris inklúziók kialakulását és különböző fehérjék szekvesztrációját [78, 79]. Szintén ígéretes lehet nukleotid szekvenciák használata a poszttranszkripcionális gén silencing eléréséhez, ezek specifikus mRNS és hnRNS szakaszokhoz kötődnek. Bár több ilyen allél-specikus-oligonukleotid (ASO) tűnt hatékonynak in vitro, közülük csak egy esetén került sor humán vizsgálatra (Ionis-DMPKRx), de a molekula nem érte el az izomban a megfelelő koncentrációt a nem megfelelő biodisztribúció következtében [80].

A genom szerkesztés módszere is ígéretesnek tűnik in vitro. Transzgén egér myoblastjával végzett kísérlet során a CTG repeat pontos excízióját sikerült elérni [81].

A CRISPR/Cas9 rendszert használva egy másik kutatócsoport humán sejtekben tudta megfelelően eliminálni a repeat-expanziót, a molekula mérete az adeno-asszociált vírus vektor használatához volt optimalizálva [80, 82].

A myotonia a DM1 betegek jelentős részénél igen kifejezett. Több Na-csatorna gátlóval vannak a myotonia kezelésére vonatkozó adatok (pl. mexiletine, procainamide, propafenon, carbamazepine stb.), de ezek a szerek a myotonia javítása mellett az izomerőt ronthatják. A DM2-ben igen gyakori izomfájdalom kezelésére egyelőre nem áll rendelkezésre egyértelműen hatékony kezelés, A CBZ, mexiletin és NSAID kezelés hozott panaszaikban némi javulást. A kardiális szövődmények megelőzésére fontos a rendszeres követés, EKG monitorozás. Gyakran pacemaker, illetve ICD beültetésre is szükség lehet [28, 83-85].

Bízató eredményt hozott egy kisebb esetszámú randomizált, kettős vak vizsgálat a metformin alkalmazásával kapcsolatban dystrophia myotonicában. A vizsgálatban a maximálisan tolerált dózis (3g/nap) mellett szignifikáns javulást észleltek a 6-perces járásteszt során [86].

Amennyiben jelent van, fontos az alvási apnoe kezelése (nem-invazív légzéstámogatás, NIPPV jó hatású), fokozott nappali aluszékonyság esetén modafinil és selegiline terápia kísérhető meg [87-90].

Emellett fontos a cataracta, dysphagia, endocrinopatiák diagnózisa és kezelése, valamint az anaesthesia rizikójának figyelembevétele ezen betegeknél.

A betegek életkilátása a DM1 gyermekkori és kongenitális formájában egyértelműen csökkent, de a DM1 felnőttkori formájában is inkább az átlagnál alacsonyabb. DM2 esetében az életkilátás általában az átlagpopulációval megegyező (3. táblázat) [45, 48, 91, 92].

Fenotípus	Leggyakoribb tünetek	Repeat-szám	Tünetek kezdete (év)	Várható élettartam	Penetrancia Anticipáció
Pre-mutáció	Nincs	38–49	-	Átlagos	Nagyobb esély a penetranciára Bizonytalan
Késői kezdetű DM1	Cataracta, aluszékonyság, myotonia	100–600	>40	Átlagos	Teljes penetrancia Igen
Felnőttkori DM1	Myotonia, arrythmiák, aluszékonyság, gastrointestinális tünetek, izomgyengeség és -atrophia, cataracta, férfi hypogonadizmus, inzulin rezisztencia, enyhe kognitív deficit, bal kamra diszfunkció	250–750	20–40	Rövidebb	Teljes penetrancia Igen
Juvenilis DM1	A felnőttkori formához hasonló, de súlyosabb tünetek	400-800	10-20	Rövidebb	Teljes penetrancia Igen
Gyermekkori DM1	A congenitális formához hasonló, de kevésbé súlyos tünetek	500-1100	1-10	Rövidebb	Teljes penetrancia Igen
Kongenitális DM1	Visszamaradott fejlődés, hypotónia, légzési elégtelenség, kardiális rendellenességek, kognitív deficit, dysmorph arc, dysphagia	750-1400	Születéskor	Magasabb halálozás csecsemőkorban, rövidebb	Teljes penetrancia Igen
DM2	Proximális izomgyengeség, enyhe kognitív deficit, arrythmiák, izomfájdalom, inzulin rezisztencia, hipertónia	100-10,000	Felnőttkorban	Átlagos	Bizonytalan

3. táblázat. Összefoglaló táblázat: repeatszámok, penetrancia, tünetek kezdete és fenotípusok [91].

2. Célkitűzések

A dystrophia myotonica patogenezisének felfedése újabb terápiás lehetőségeket vet fel. Így egyre nagyobb szükség van a betegség súlyosságát, prognózisát és az esetleges terápiás beavatkozások hatékonyságát követő biomarkerekre. Több molekulát vizsgáltak és vizsgálnak jelenleg is, de még nem áll rendelkezésre egységesen kidolgozott protokoll ezek használatára. Számos molekula kimutatása és mérése költséges, és csak invazív módszerekkel lehetséges (pl. izomból nyert microRNS - miRNS). Korábbi vizsgálatok alapján körvonalazódik, hogy a fibroblast growth factor 21 (FGF-21) specifikus és szenzitív biomarkere lehet a mitochondriális betegségeknek. Jól ismert a szénhidrát és lipid anyagcserében betöltött szerepe, valamint, hogy a harántcsíkolt izmok is fontos szerepet játszanak a fenti anyagcsere folyamatokban.

- A fenti hipotézis tesztelésére vizsgálatunk során több neuromuscularis betegségben, köztük dystrophia myotonicában vizsgáltuk az FGF-21 szérumszinteket.
- A betegség multiszisztémás jellegéből adódóan számos klinikai mutató használata szóba jöhet. Több klinikai paramétert teszteltünk, mennyiben mutatnak összefüggést a vázizmok állapotával, illetve az anyagcsere paraméterekkel, hogy ez alapján következtessünk alkalmazhatóságukra. Ide tartozik a szérum kreatin kináz (CK) érték, a testtömeg index (BMI), valamint a HOMA index, utóbbi az inzulin rezisztencia markere.

Több klinikai és radiológiai vizsgálat is megerősítette a központi idegrendszer érintettségét dystrophia myotonicában. Ezek többnyire az agyi volumen csökkenésével és kognitív zavarokkal foglalkoztak. Mivel a myotonia a vázizmokhoz köthető funkcionális eltérés, határozott elektrofiziológiai megjelenéssel, ezidáig nem volt ismert, hogy ennek van-e bármilyen központi idegrendszeri megnyilvánulása vagy következménye. Azt feltételeztük, hogy a priméren izom eredetű myotonia során kompenzációs mechanizmusok aktiválódnak az agyban. Emellett azt sem lehet kizárni, hogy az agy legalább részben érintett, vagy részt vesz a myotonia fenntartásában.

- Munkánk második részének célja az volt, hogy funkcionális vizsgálatok (funkcionális MRI, fMRI) segítségével a myotonia során aktiválódó agyi területeket feltérképezzük.

3. FGF-21 szint vizsgálata dystrophia myotonicában és mitochondriális betegségekben

3.1. Irodalmi áttekintés

3.1.1. Az izomdystrophiák biomarkerei

A biomarkerek objektíven mérhető eltérések, melyek jelenléte felhasználható bizonyos kórképek diagnosztizálására vagy egy betegség lefolyásának követésére, illetve prognózisának meghatározására. Az izomdystrophiák heterogén csoportját progresszív izomgyengeség jellemzi. A korai diagnózis feltétele a klinikai kép felismerése és a genetikai vizsgálat, ezen lépéseket a megfelelő biomarkerek azonosítása is segítheti.

A leggyakoribb gyermekkori izomdystrophia, a Duchenne-féle izomdystrophia. A 2-5 éves kor között manifesztálódó betegség tünetei a dystrophin gén mutációja (többnyire részleges deléciója) következtében, működőképes dystrophin fehérje hiánya miatt alakulnak ki. Enyhébb formája a Becker izomdystrophia, ahol a dystrophin jelen van, de módosult, csonkított formában. A betegség követésében fontos a motoros funkciók mérése, emellett a szérumban kreatin-kináz a betegség szűrésére leggyakrabban használt diagnosztikus biomarker. A dystrophin hiánya megállapítható az izombiopszis mintából immunhisztokémiai festéssel és Western blot segítségével. A génterápiák fejlődésével a dystrophin kimutatásának nem csak diagnosztikai, de prognosztikai jelentősége is lett.

Az eddig vizsgált biomarkerek közül az LTBP4 fehérje az izom gyulladásával és fibrózisával függ össze, illetve a járóképesség elvesztésének életkorával korrelál. A micro-RNS molekulák ideális biomarkerek lehetnének, mivel specifikusan expresszálódnak bizonyos szövetekben, és a szövetkárosodás kapcsán jutnak be a véráramba [93]. A Duchenne izomdystrophiában is kimutattak néhány micro-RNS-t melyek a betegség progresszióját mutató klinikai paraméterekkel korreláltak. A magas miR-30c mérhető jobb motoros funkcióval rendelkező pácienseknél, míg az miR181 a rosszabb kimenetelt jelzi [94]. Mitochondriális myopáthiákban jelenleg az FGF-21 és a GDF-15 (Growth-differentiation factor 15) tűnik ígéretes biomarkernek. Ezek, kombinálva a pGSN (plasma Gelsolin) szint meghatározással, mely a sejt túlélés és adaptáció egyik regulátor fehérjéje, segíthetik a felnőttkori mitochondriális myopáthiák diagnózisát [95-98]. Jelenleg magas azon izomdystrophiák száma, melyeknél nem áll rendelkezésünkre biomarker (pl. Emery-Dreifuss, kongenitális izomdystrophiák).

3.1.2. Biomarkerek dystrophia myotonicaban

A dystrophia myotonicaban folyó terápiás próbálkozások jelentős része az RNS kezelést célozza meg. Így a hibás alternatív splicing során létrejött mRNS kimutatása a kezelés előtt és után, a terápiás válasz egyik fontos jövőbeli biomarkere lehet.

Egyre többen vizsgálták keringő szérum/plazma miRNS-ek biomarkerként való használhatóságát. Nehézséget jelenthet azonban, hogy - bár a miRNS szövetspecifikusan expresszálódik - de átfedések lehetnek, így pl. az izom által kiválasztott miRNS-206-at a szívizom is szekretálhatja, tehát több szövetben is termelődhet ugyanaz a molekula. Tekintettel arra, hogy a DM1-re multiszisztémás érintettség jellemző, a különböző szövetek által kiválasztott miRNS elkülönítése nehézségekbe ütközik [99]. A vizsgált miRNS-ek több altípusának (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206 [100] és miR-133a,-133b és -206 [101]) szérum-, illetve plazmakoncentrációja korrelált az izomgyengeség mértékével több vizsgálat szerint [100, 101]. Amellett, hogy a miRNS-ek specificitásának meghatározására még számos vizsgálatra van szükség, a miRNS kvantitatív mérésének lehetséges költség- és időhatékony protokollja sem áll egyelőre rendelkezésre. A DM1 esetében egy biomarker panel hasznos lehetne több szekunder komplikáció megítélésére, melyek a betegeknél kialakulhatnak. A jelenlegi adatok alapján felmerül, hogy a miRNS-ek mellett az exoszómák szintén jó biomarkerek lehetnek, a többi keringő fehérjéhez és miRNS-hez viszonyítva is [102].

A keringő RNS-ek funkciójának megértésére Karol Czubak és munkatársai tettek erőfeszítéseket. A dystrophia myotonicaban a keringő RNS-ek biogenezisében az MBNL-splicing faktorainak is nagy jelentősége lehet. DM1-ben ennek a szintje csökkent, ennek ellenére a DM1-ben a teljes keringő RNS mennyisége emelkedett volt.

A teljes genom transzkriptom analízis több tucat keringő RNS megváltozott (főleg emelkedett) szintjét mutatta DM1-ben. Emellett a keringő RNS szintje sok esetben korrelált a DM1 betegség súlyosságával.

A kardiális szövődmények tekintetében kimutatták, hogy a NT-proBNP és a copeptin a pitvarfibrilláció két független prediktora lehet DM1 betegeknél [44].

3.1.3. Az FGF-21 fehérje mint biomarker

Az FGF-21 (humán fibroblast növekedési factor 21) egy 181 aminosavból álló fehérje, mely a humán FGF szupercsaládba tartozik. A családba tartozó fehérjék változatos szerepet töltenek be az endokrin, a parakrin és az intracelluláris folyamatokban. FGF-21-et expresszálnak a májsejtek, zsírszövet, thymus és a vázizmok. A plazmába választódik ki, ahol receptorához kötődik egy a kofaktoron (b-Klotho) keresztül hormonként viselkedve [103-105]. Az FGF-21 központi szerepet játszik a glükóz és lipid metabolizmusban és az éhezéshöz való adaptációban. Gátolja a hepatikus glükóz termelést és stimulálja az adipocyták glükózfelvételét a glükóz transporter-1-en keresztül. Az FGF-21 glükózsztint csökkentő képessége független az inzulinétól. Ugyancsak jótékony hatása van a lipid metabolizmusra ugyanis csökkenti a plazma triglicerid, koleszterin és szabad zsírsav szintet [106]. A plazma-FGF-21 szint szignifikáns emelkedését figyelték meg obez rágcsálók és emberek esetében, valamint az FGF-21 adása súlycsökkenést idézett elő diabeteses nem emberi főemlősöknél [107]. Az FGF-21-nek a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor alfán keresztül szerepe van az éhezéshöz való alkalmazkodásban [108]. Éhezés során az FGF-21 a növekedési hormonhoz hasonlóan lipolízist indukál a fehér zsírszövetben míg az FGF-21 feedback-je alapján befolyásolja a növekedési hormon szekréciót. Tynnismaa és mtsai emelkedett FGF-21 szintet találtak a vázizmokban a mitochondriális betegség egyik állatmodelljében [109]. Azt is igazolták, hogy az FGF-21 szint megemelkedik az izom érintettséggel járó humán mitochondriális betegségekben [110]. Több friss vizsgálat igazolt emelkedett FGF-21 szintet mitochondriális betegségben szenvedő pácienseknél más neuromuscularis betegségekben szenvedőkhöz és egészséges kontrollokhoz viszonyítva [111, 112]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a mitochondriális diszfunkció éhezéshöz hasonló állapotot idéz elő, és a máj és a barna zsírszövethez hasonlóan a megbetegedett vázizom szintén képes az FGF-21 szekréciójára [109, 113].

3.2. Célkitűzések

- Az FGF-21 szérumszintjét határoztuk meg vizsgálatunk során több neuromuscularis betegségben, köztük mitochondriális myopáthiákban és dystrophia myotonicában, illetve egészséges kontrollok esetében.
- Célunk volt továbbá az FGF-21 szérumszint meghatározása mellett az értékek összevetése és korreláció-analízise több klinikai paraméterrel.

3.3. Anyag és módszer

3.3.1. Betegek

A vizsgálatba 30 mitochondriális betegséggel, 16 dystrophia myotonicával (DM1), 5 facioscapulohumerális izomdystrophiával (FSHD) diagnosztizált páciens és 20 egészséges kontrollt vontunk be. A vizsgálatot a helyi etikai bizottság jóváhagyta (Engedély száma: 4581/2012). A betegek beleegyező nyilatkozatot írtak alá. Az egészséges kontrollok előzményeiben nem volt érdemi megbetegedés, a BMI értékük a normális tartományban volt, nem álltak orvosi gyógykezelés vagy gyógyszeres terápia alatt. A normálistól eltérő BMI indexű (<17 vagy >30) pácienseket és kontrollokat a vizsgálatból kizártuk. A DM1-es betegek kórelőzményeiben típusosan myotonia és distalis izomgyengeség fordult elő, a diagnózist genetikai vizsgálat is megerősítette. Az FSHD diagnózisa szintén a típusos klinikai képen és genetikai tesztelésen alapult. A mitochondriális betegek között 5 MELAS-al (mitochondriális myopathia, encephalopathia, laktát acidosis és stroke-like epizódok), 15 PEO-val (progresszív externális ophthalmoplégia) – melyből egy Kearns-Sayre szindrómás beteg – és 10 mitochondriális myopáthiával diagnosztizált beteg került bevonásra.

A mitochondriális betegség diagnózisát a 2002-ben publikált kritériumok alapján állítottuk fel [114]. Minden betegnél elektromiográfiát, izombiopsziát és genetikai tesztelést végeztünk. A MELAS és PEO betegek klinikai megjelenése típusos volt, hasonlóan jellegzetes volt az izombiopsziás lelet, emellett a mitochondriális DNS pontmutációja, vagy deléciója igazolódott. A myopáthiás csoportba a betegeknek enyhe proximális izomgyengesége vagy terhelési intoleranciája, myopáthiás elektromiográfiája és mitochondriális eltérésekre utaló izombiopsziás lelete volt. A myopáthiás betegek genetikai tesztelése során 5 esetben deléció, 3 esetben a mitochondriális DNS pontmutációja igazolódott, 2 esetben negatív volt a vizsgálat (4. táblázat).

	Kontroll	Mitochondriális betegek			DM1	FSHD
		MELAS	PEO	Myopathia		
N (férfi/nő)	20 (9/11)	5 (3/2)	15 (9/6)	10 (3/7)	16 (7/9)	5 (2/3)
Kor (év)	45.9±16.1	51.2±23.8	59.6±15.3	57.7±9.6	50.9±12.6	41±12.3
Kezdet (év)	NA	41.2±21.6	39.2±23.1	47.1±14	35.1±15.9	30.4±14.6
BMI (kg/m ²)	26.0±5.3	23.7±6.5	26.3±6.0	27.1±8.1	27.1±5.4	21.7±2.6
Diab. mellitus	0/20	0/5	3/15	2/10	3/16	0/5

4. Táblázat. A vizsgálatba bevont egészséges kontrollok és betegek demográfiai adatai. Életkor: években kifejezve. N, vizsgálati alanyok száma (férfi/nő); Diab., a diabeteses alanyok száma; NA – nem alkalmazható

3.3.2. Módszer

Minden beteg részletes belgyógyászati és neurológiai kivizsgáláson esett át. Laboratóriumi vizsgálatok során ellenőriztük az elektrolit szinteket, vese- és májfunkciót, vörösvértest-süllyedést, teljes vércépet, kreatin-kináz, laktát és thyreoidea-stimuláló hormon (TSH) szinteket. A vérvétel minden alkalommal ugyanazon időpontban történt (8:00, éhgyomorral), majd a szérumot izoláltuk és -80 °C-on tároltuk az enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA) elvégzéséig. A betegek azt az utasítást kapták, hogy kerüljenek minden átlagostól eltérő étel- és italfogyasztást és fizikai aktivitást a vérvételt megelőző napon.

A dystrophia myotonica és mitochondriális betegeknél HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance) indexet számoltunk az inzulinrezisztencia kimutatására: éhomi vércukorszint (mmol/l) x éhomi inzulinszint (pmol/l) /156 (normális érték <4) [115].

MRC-SUM

Az izomgyengeség kvantifikálására az összegzett MRC (Medical Research Council) pontszámot használtuk. Ezt a nyak flexorok, extensorok és 15 végtagi izomcsoport izomerejének kétoldali értékeléséből számítottuk ki az MRC osztályozási rendszer alapján (7.1. melléklet).

JMDRS

A betegségekkel járó szisztémás érintettséget a JMDRS (Japanese Mitochondrial Disease Rating Scale) segítségével értékeltük [116]. A skála több tételt foglal magába: mindennapi tevékenységeket (beszéd, nyelés, írás, étel felszeletelése, öltözködés, személyes higiénia, elesések, váratlan történések), motoros funkciókat (legalacsonyabb MRC pontszám, koordináció, járás, közepes és élénkebb fizikai aktivitás), szenzoros eltérések (látás, hallás), endokrin, kardiális és vesefunkció, kognitív teljesítmény (7.2. melléklet). Vizsgálatunkban ehhez a szemmozgás eltéréseinek értékelését is hozzáadtuk (0-normál; 1, ptózis normális szemmozgásokkal; 2, ptózis enyhe szemmozgászavarral; 3, közepes szemmozgászavar; 4, súlyos szemmozgászavar vagy kettőslátás; 5, teljes externális ophthalmoplegia).

Izombiopszia

Az izombiopsziát minden betegnél elvégeztük, legtöbbször a delta izomból. A minták hisztológiai elemzését neuropatológus (P.E.) végezte a nemzetközi standardoknak megfelelően a Pécsi Tudományegyetem, Patológiai Intézet Neuropatológiai laboratóriumában. A Hisztológiai vizsgálat során hematoxilin-eozin, módosított Gömöri trichrome, olajvörös, PAS (Perjódsv+ Schiff reagens), ATP-áz, nicotinamid-adenin-dinucleotid dehydrogenáz (NADH), SDH (szukcinát-dehidrogenáz), COX-SDH (cytochrome-c oxidáz + SDH), savas és alkalikus foszfatáz festést és standard immunohisztokémiai módszereket alkalmaztunk a leggyakoribb izomdystrophiák kizárására (dystrophin, dysferlin, alfa, béta, gamma és delta-dystroglycan). A mitochondriális akkumulációt a Gömöri trichrome mintákban értékeltük a subsarcolemmális festődés mértéke alapján: (1) helyenként jelen van a rostokban (<10%); (2) enyhe (a rostok 10-20%-ban van jelen); (3) közepes (a rostok 20-50%-ban van jelen); (4) súlyos (a rostok >50%-ban van jelen); (5) nagyon súlyos (szinte minden rostban jelen van). A töredezett kék rostok (RBF) arányát az SDH-val festett lemezekon vizsgáltuk.

Genetikai vizsgálatok

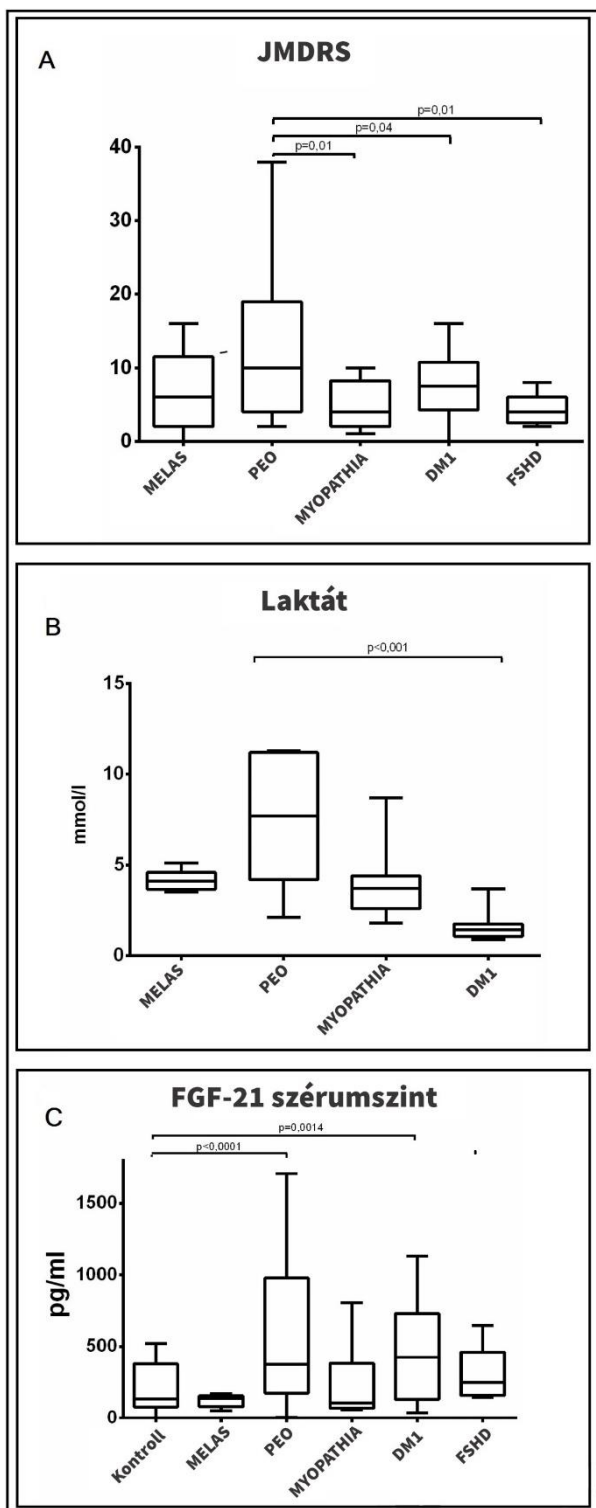
A mitochondriális vizsgálatokat az izombiopsziás szövetminta felhasználásával végeztük el (Ritka Betegségek Intézete, Semmelweis Egyetem, Budapest), valamint egyes esetekben vérből (Pécsi Orvosi Genetikai Intézet). A diagnózist a DM1 betegek egy részénél PCR (Pécsi Orvosi Genetikai Intézet) segítségével, a többi DM1 és FSHD betegnél Southern-blot segítségével p13E-11 és p5B1.4 próbák használatával végezték el (Országos Környezetegészségügyi Intézet Molekuláris Genetikai és Diagnosztikai Osztály).

ELISA

Az FGF-21 szérumszint duplikált meghatározása egy kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kit-el történt (Quantikin ELISA kit, R&D Systems Inc). Az FGF-21 szérumkoncentrációját (pg/ml) a gyártó utasításai alapján számoltuk ki. Az ELISA tesztet vakon E.L. és M.C. végezte a PTE Neurológiai Klinika Kémiai laboratóriumában.

Statisztikai értékelés

A statisztikai elemzést SPSS v19. (IBM Co., Armonk, New York) szoftverrel végeztük el. A betegek és kontrollok szérum FGF-21 szintjeinek és a többi klinikai adatnak az



5. ábra. Az vizsgálatba bevont egészséges kontrollok és betegek JMDRS, Laktát és FGF értékei. A JMDRS (A) és szérumban laktát szintek (B) a PEO csoportban voltak a legmagasabbak. A szérumban fibroblast-növekedési faktor 21 (FGF-21) szintek (C) szignifikánsan magasabbak voltak a PEO és DM1 pácienseknél, az egészséges kontrollokhoz képest. A boksz-plot ábra jelzi a középértéket (25 és 75 percentilisekkel) a száruk pedig a min-max értékeket. A szignifikancia szinteket megjelöltük.

összehasonlítása nonparametrikus tesztek segítségével történt (Mann-Whitney U teszt és varianciaanalízis). A Person korrelációs analízist használtuk az FGF-21 szintek és a klinikai adatok összevetésére. A számítások során 0.05 szignifikancia szinttel dolgoztunk.

3.4. Eredmények

Az FGF-21 szintet 71 mintából határoztuk meg, ezek közül 20 egészséges kontroll és 51, a felsorolt izombetegségekben szenvedő páciens volt. A betegek és az egészséges kontrollok demográfiai adatait a 4. táblázat foglalja össze, a kontrollok, a DM1 és FSHD és mitochondriális betegek átlagos életkora statisztikailag összemérhető volt. A kontrollok és a páciensek BMI-je 18-30 között volt. A 17 alatti és 30 feletti BMI-vel rendelkező pácienseket kizártuk, mivel azt találtuk, hogy a kontrollok szérumban FGF-21 szintje nagyban korrelált a BMI-vel ($r=0.75$, $p=0.0005$). A betegek egyik csoportjában sem találtunk a BMI és FGF-21 szintek között szignifikáns korrelációt.

Klinikai adatok

Annak ellenére, hogy a betegcsoportok között voltak klinikailag jelentős különbségek, az MRCsum érték esetükben is összemérhető volt. A JMDRS-t az izom- és szervi érintettség becsülésére használtuk a mitochondriális

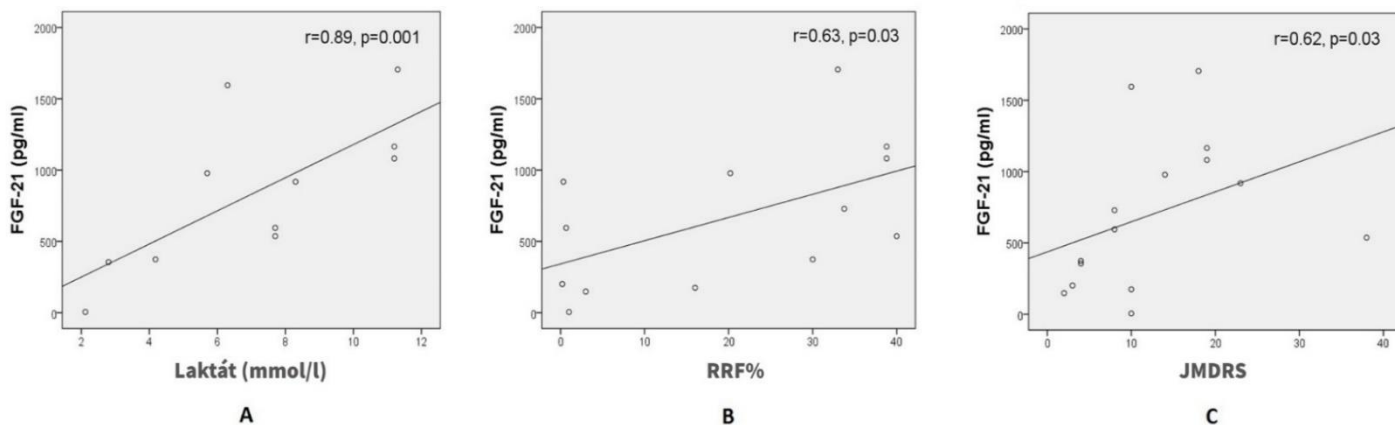
	Kontroll	Mitochondriális			DM1	FSHD
		MELAS	PEO	Myopathia		
Diffúz mit. acc.	NA	2.8±1.3	2.9±1.3	2.9±1.6	0.8±2	0
RBF (SDH)	NA	7.4±11.9*	10.8±13.9*	6.2±15.7*	0.27±0.57	0.03±0.05
COX- rostok	NA	3.2±4.5	16.6±16.5*	1.0±0.7	0.5±0.7	0.03±0.05
COX+RBF	NA	8.2±13.3*	3.3±2.5	15.7±25.4*	0	0

5. táblázat. Mitochondriális eltérések az izom szövettani mintákban. Az adatokat a százalékos arány középértéke±standard deviáció formában tüntettük fel. *szignifikáns különbség ($p<0,05$). Diffúz, diffúz mitochondriális accumulatio; NA, nem alkalmazható; MELAS, mitochondriális encephalopathia laktát acidosis és stroke-like epizódok; PEO, progresszív externális ophthalmoplegia; DM1 dystrophia myotonica 1 típus; RBF, töredezett kék rostok; SDH, szukcinát dehidrogenáz; COX, cytochrome-1 oxidáz.

betegeknél. A statisztikai elemzés azt mutatta, hogy a PEO betegek körében ez az érték szignifikánsan magasabb volt, mint a mitochondriális myopáthiás csoportban, a DM1-ben és az FSHD-ben szenvedő betegeknél, nem volt azonban szignifikáns különbség a MELAS-os betegekhez viszonyítva (5/A ábra).

Biokémiai és patológiai értékelés

A betegek CK szintje a normális tartománytól (200 U/l-ig) a közepesen emelkedettig változott, a vizsgált csoportok között nem volt e tekintetben szignifikáns különbség. A szérumban a laktát szintek a mitochondriális betegeknél magasabbak voltak a DM1-betegekéhez képest, ez különösen érvényes a PEO betegcsoportra (5/B ábra). A szérumban a FGF-21 szint hasonló értékeket mutatott az egészséges kontrollok, MELAS és mitochondriális myopáthiás betegnél, és enyhén emelkedett volt FSHD-ban. Az FGF-21 szint szignifikánsan magasabb volt PEO-ban (589.5±496.4 (átlag±SD), 5,2-1705,7 tartomány) és DM1-ben (429±328,5 (átlag±SD), 36,5-1130,9 tartomány), mint az egészséges kontrolloknál (138±173,3 (átlag±SD), 0-510 tartomány) (5/C ábra). A HOMA-IR index a DM1 betegeknél szignifikánsan magasabb volt, mint a mitochondriális csoportnál (6.13±4,86 vs. 1,8±1,2, ((átlag±SD) $p=0,012$). A vártnak megfelelően az összes mitochondriális csoportban magas volt a töredezett kék rostok (RBF) aránya az SDH mintákban. Emellett a mitochondriális betegekre, különösen PEO-ban, jellemző volt a cytochrom-c enzimaktivitás hiánya - a COX negatív rostok aránya alapján ($p<0,03$). Érdekes módon kis számú COX- RBF a DM1 és esetenként az FSHD betegek mintáiban is jelen volt. A magas COX aktivitású töredezett kék rostok (COX+ RBF) MELAS-ban és mitochondriális myopáthiában fordultak elő (5. táblázat).



6. ábra . A szérumban FGF-21 szint korrelációja a biokémiai, hisztológiai és klinikai paraméterekkel PEO betegeknél. A szérumban FGF-21 szint szorosan korrelál a serum laktát szintekkel (A), az izombiopsziás minták RBF rostok arányával (B), és a JMDRS értékkel (C).

Összefüggés-vizsgálatok

A mitochondriális csoportban az FGF-21 szint a laktát szinttel ($r=0,69$, $p=0,0008$) és az RBF-ek arányával ($r=0,44$, $p=0,03$) mutatott összefüggést. Az alsó csoport elemzés során még erősebb korreláció mutatkozott a laktát szint és az RBF-ek aránya között a PEO csoportban. Ezen túlmenően az FGF-21 szint korrelált a JMDRS pontszámokkal is (6. ábra). Nem volt különbség az FGF-21 szérumban szintekben a nemek között, és nem volt összefüggésben a betegek életkorával sem. Nem találtunk összefüggést az FGF-21 és az izomgyengeség, vagy CK értékek között sem. A HOMA-IR nem korrelált egyik klinikai vagy biokémiai paraméterrel sem a vizsgált csoportokban.

3.5. Megbeszélés

Eredményeink rámutatnak, hogy bár az FGF-21 szérumban szintje emelkedett a mitochondriális betegeknél, ez eltérő mértékű az egyes mitochondriális szindrómákban. MELAS és mitochondriális myopathia esetén csaknem normális FGF-21 szintet mértünk, míg PEO-ban az értékek szignifikánsan emelkedettek voltak. Ugyan vizsgálatunk eredményei alátámasztják azt az észrevételt miszerint PEO-ban magas a szérumban FGF-21 szint, ez nem volt jellemző az izolált myopáthiás betegeknél. Ennek okát egyelőre nem ismerjük, azonban több lehetséges magyarázat lehet:

1. az izomérintettség súlyossága eltérő lehetett a korábbi vizsgálatokhoz viszonyítva (betegeinknél enyhe myopathia és csökkent fizikai terhelhetőség állt fenn, de nem volt súlyosabb izomgyengeség)

2. a vizsgálatból kizártuk a túlsúlyos pácienseket, hogy elkerüljük azt a korábbról már ismert tendenciát, miszerint az obezitás hatással van az FGF-21 szintre – ezt adataink is alátámasztották

3. a Suomalainen és társai által kimutatott magas FGF-21 szint a mitochondriális myopáthiás betegeknek a diabetes mellitus magas előfordulását tükrözhetette a vizsgálati csoportban [110].

Megerősíthetjük az előző vizsgálatok azon megállapítását mi szerint myopáthiás betegeknek az FGF-21 szint a mitochondriális károsodás súlyosságával van összefüggésben. Davis és társai korrelációt találtak a proximális izomgyengeség és az FGF-21 szint között. Eredményeink nem mutattak szignifikáns összefüggést a FGF-21 szint és az izomgyengeség mértéke között. Kimutattuk viszont, hogy az FGF-21 szint az RBF rostok arányával korrelált mely a mitochondriális diszfunkció egyik fő hisztológiai mutatója. A Suomalainen és társai által leírt összefüggés az FGF-21 szint és a COX- rostok száma között [110] esetünkben is megmutatkozott, azonban nem volt szignifikáns mértékű.

A mitochondriális betegeknek az FGF-21 szintek normálisak vagy enyhén emelkedettek voltak Leber hereditár optikus neuropáthiában, MELAS-ban, recesszív mitochondriális ataxia szindrómában (MIRAS), és mérsékelten magasabbak mitochondriális neurogastrointestinális encephalopáthiában (MNGIE). Jelentősen emelkedett FGF-21 szintet mértünk PEO-ban, KSS-ben (Kearns-Sayre szindróma) és myoclonos epilepszia és RRF (MERRF)-ben, a vázizomrostok érintettségének megfelelően [110, 111].

Eredményeink igazolták az FGF-21 és laktát szint közti összefüggést. Mindkét érték a PEO hasznos biomarkere viszont a többi mitochondriális betegségben szérumszintje nem volt magasabb. Davis és munkatársainak eredményeihez hasonlóan megerősíthetjük, hogy az FGF-21 jóval szenzitívebb markere a mitochondriális betegégeknek mint a CK vagy laktát szint [112]. Eredményeink megerősítették azokat a korábbi eredményeket, mi szerint az izommintákban az RBF és COX- rostok jelenléte a PEO-ra, a COX+RBF rostoké pedig a MELAS-ra jellemző (5. táblázat) [117]. A COX- rostok aránya összefüggött az FGF-21 szinttel (5. ábra). A szövettani jellemzőkkel összhangban az FSHD betegeknek normális FGF-21 szintet találtunk, ugyanis ezekben a mintákban a mitochondriális elváltozásokra és diszfunkcióra utaló jelek előfordulása is elhanyagolható mértékű volt.

A vizsgálat egyik legfontosabb megállapítása a DM1 betegeknél észlelt emelkedett FGF-21 szint. Ennek egyik magyarázata a betegségben jól ismert inzulin rezisztencia lehet, mely az inzulin receptor rendellenes splicingjának következménye [118, 119]. Szintén ezt a feltevést támasztja alá, hogy az inzulin rezisztencia (emelkedett HOMA-IR) szignifikánsan gyakoribb volt DM1-ben mint a mitochontriális betegeknél. Egy másik lehetséges magyarázatot a DM1 betegeknél feltételezhetően kialakuló mitochontriális diszfunkció adhat. Az 5. táblázat rámutat, hogy a mitochontriális eltérések (RBF és COX-rostok) nem ritkák a DM1-es betegek mintáiban, így a szekunder mitochontriális diszfunkció is hozzájárulhat az FGF-21 termelődéshez és ezáltal a magasabb szérumszintekhez ezen betegek között.

A DM1 betegek körében sajnos nem tudtunk kimutatni szignifikáns összefüggést az FGF-21 szint és a mitochontriális érintettség vagy a klinikai tünetek súlyossága között. Így elképzelhető, hogy az inzulin rezisztencia nagyobb hatást gyakorol az FGF-21 szintekre, mint a mitochontriális diszfunkció. Suomalainen és társai egyik korábbi vizsgálatukban DM1 betegeket kontroll csoportként vizsgáltak, itt normális FGF-21 szérumszinteket találtak, azonban a BMI-ről vagy az izom szövettani elváltozásokról nem tettek említést [110].

Összességében vizsgálatunk a korábbi publikációkkal összhangban alátámasztja, hogy az FGF-21 szérumszintje összefügg a mitochontriális diszfunkcióval. Eredményeink arra utalnak, hogy a mitochontriális szindrómák és alcsoportok különböznek a FGF-21 szérumszint tekintetében. További tanulmányok szükségesek a fenotípus, az izomérintettség súlyossága és az FGF-21 közötti összefüggések elemzésére. Az izomszövetben kialakuló elsődleges és másodlagos mitochontriális diszfunkció FGF-21 termelődéshez vezethet. Neuromuskuláris betegségekben fontos az inzulin rezisztencia figyelembevétele az FGF-21 szint értékelésénél.

3.6. Jövőbeli célkitűzések

- Célkitűzéseink között szerepel az FGF-21 szérumszint meghatározása dystrophia myotonica betegek egy nagyobb csoportjában
- Az FGF-21 szérumszint vizsgálatát tervezzük több izombetegségben: izomdystrophiákban, további mitochontriális betegeknél
- Az FGF-21 szérumszintjének összefüggését tervezzük vizsgálni más klinikai paraméterekkel (lipid anyagcsere eltérései, proBNP, serum microRNAs koncentrációk).

4. Myotonia során jelentkező kortikális aktiváció fMRI vizsgálata dystrophia myotonicában

4.1. Irodalmi áttekintés

A dystrophia myotonica legjellemzőbb tünete az akaratlanul fenntartott izomkontrakció mely klinikailag a kézizmok, kézszorítás relaxációs nehézségeként ismerhető fel. A myotonia átmenetileg oldódik mozgás, bemelegítés hatására [120]. A myotonia és a bemelegedés jelenségének háttere egyelőre nem tisztázott. A myotonia önmagában feltehetőleg az izomban lévő klorid csatorna rendellenessége miatt alakul ki [121].

A dystrophia myotonica multiszisztémás betegség, a központi idegrendszert is érinti. Az agyi elváltozások széles skáláját mutatták ki DM1-ben, első sorban fehérállományi léziókat és atrophíát észleltek [71, 72]. Egy korábbi tanulmány az ujj-hüvelykujj oppozíciójának fMRI vizsgálata során DM1 betegeknél az egészséges kontrolloknál szignifikánsabban erősebb BOLD (blood oxygen level dependent) aktivációt mutatott több agyi területen: mindkét oldali szenzoros és motoros kéregben, az inferior parietális lebenyben, a törzsdúcokban, a thalamusban, az ipszilaterális premotoros áreaban, az insulában és a szupplemter motoros área területén. Ezeket az eltéréseket olyan kompenzatórikus mechanizmusoknak tulajdonították, mint a funkcionális hálózatok reorganizációja és redisztribúciója, mely a betegségre jellemző gyorsult öregedési folyamat következménye lehet [122]. Egy másik áttekintő közleményben a frontális, temporális és parietális lebenyben csökkent glükózfelvételt és cerebrális perfúziót találtak [123]. Tekintettel arra, hogy a DM1-ben elsősorban a neuromusculáris eltéréseket vizsgálták, a myotóniával kapcsolatos agyi érintettség háttere eddig nem volt ismert.

4.2. Célkitűzések

- Azt feltételeztük, hogy a priméren izom eredetű myotonia során kompenzációs mechanizmusok aktiválódnak az agyban.
- Nem lehet kizárni azt sem, hogy az agy legalább részben érintett/részt vesz a myotonia fenntartásában.
- Célul tűztük ki, hogy fMRI segítségével a myotonia során aktiválódó agyi területeket feltérképezzük.

- Ennek megvalósítására kialakítottunk egy „kézszorítás feladatot” melyet a klinikailag myotóniás és nem myotóniás dystrophia myotonica páciensek is elvégeztek bemelegítés előtt és után, eközben fMRI segítségével a myotonia alatt létrejövő neurális aktivációt igyekeztünk felfedni
- Választ kerestünk arra, hogy a myotóniás és nem myotóniás DM1 betegek között a kézszorítás feladat végrehajtása során jelentkezik-e szignifikáns különbség a BOLD jelben valamely agyterületen
- A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján magyarázatot kerestünk a megfigyelt eltérő aktiváció neurofiziológiai hátterére

4.3. Anyag és módszer

4.3.1. Betegek

A vizsgálatba 16 (9 nő, 7 férfi, életkoruk 31-60 év), a dystrophia myotonica 1-es típusával diagnosztizált beteget vontunk be. A diagnózis a klinikai jellegzetességek és elektromiográfia során kimutatható myotonia alapján került felállításra, valamint minden esetben genetikai vizsgálat is megerősítette azt (Southern blot, p5B1.4 minta, Országos Közegészségügyi Intézet, Molekuláris Genetikai és Diagnosztikai Osztály, Budapest).

Kizárási kritérium volt a kórelőzményben szereplő alkoholabúzus, szerfüggőség, kognitív deficit (Mini mental state vizsgálat kevesebb mint 25/30 pont) és bármilyen ok, mely miatt MRI vizsgálat nem lett volna elvégezhető. Minden páciens jobbkezes volt, ennek igazolására az „Edinburgh Handedness Inventory tesztet” [124] használtuk. A vizsgálatba bevont betegek egyes klinikai jellemzőit a 6. táblázatban foglaltuk össze.

A pácienseket a vizsgálatról - melyet a Regionális és Intézményi Etikai Bizottság engedélyezett (4512/2012) - tájékoztattuk, a részvételbe írásban beleegyeztek. Részletes

	Nem (N/F)	Életkor (Év)	Betegségtartam (Év)	Myotonia kezdete (Év)	össz-MRC
DM/Myotonia+ ⁽¹⁾ (n=8)	5/3	48,33±8,33 (31-60)	15,22± 10.37 (5-39)	33± 9,84 (18-44)	459,0± 40,34 (383-516)
DM/Myotonia- ⁽²⁾ (n=8)	4/4	47,29± 8,14 (39-58)	22,14± 5,46 (15-29)	24,86±6,12 (17-34)	454,7±34,61 (387-492)
Minden páciens (n=16)	9/7	47,88± 7,99 (31-60)	18,25± 9,04 (5-39)	29,44±9,16 (17-44)	457,1± ±36,77 (383-516)

6. Táblázat A páciensek klinikai jellemzői. (1) Kéz myotóniát mutató dystrophia myotonica páciensek (2) Kéz myotóniát nem mutató dystrophia myotonica páciensek. Az adatok leírása: átlag±standard deviáció (min-max értékek) formában történt. Össz-MRC: 24 izomnál elvégzett izomerőmérés értékeinek (1-10 skála) összege. A két csoport között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség (Mann-Whitney U teszt, $p > 0.05$).

neurológiai és elektrofiziológiai valamint belgyógyászati kivizsgálás és laborvizsgálatok (pl. TSH, CK, rutin paraméterek) történtek. A 24 izomcsoportot érintő részletes izomerő vizsgálat során mért értékeket az MRC skála alapján rögzítettük majd egy részletesebb, 10 pontos skála szerint alakítottuk át (lásd 7.3. melléklet). A mért értékeket a 6. táblázatban tüntettük fel (össz-MRC). A betegeket két csoportra osztottuk: A DM/ Myotonia+ csoportnál klinikailag is észlelhető volt a myotonia készszorítás során, míg a DM/Myotonia- csoportnál a vizsgálat során myotóniát nem észleltünk (azonban EMG vizsgálat náluk is myotóniát igazolt). Ez alapján mindkét csoportba 8-8 páciens került beválasztásra.

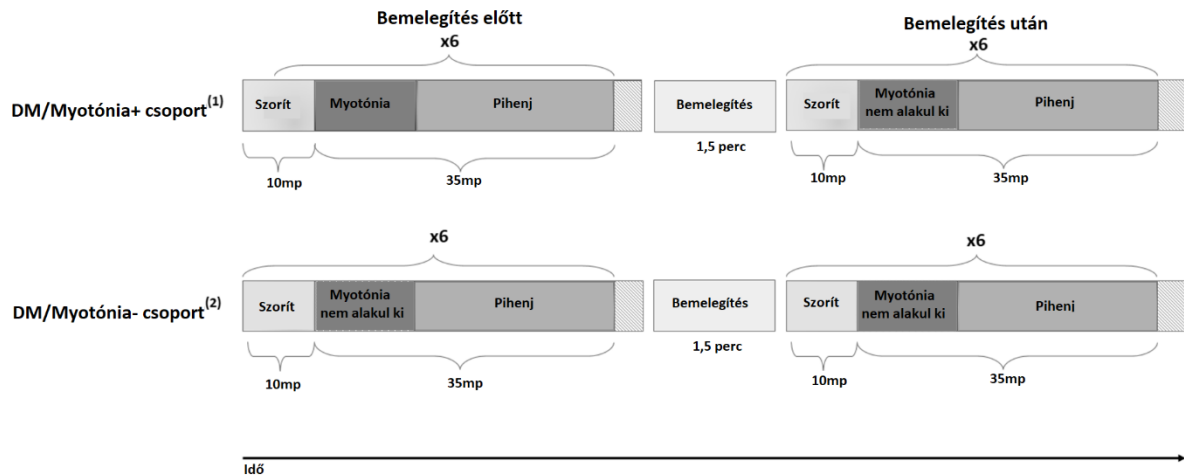
4.3.2. Képalkotás

A vizsgálat során strukturális és funkcionális képalkotást végeztünk. A strukturális képalkotás során nagy felbontású T1- és T2-es súlyozott képek készültek a szerkezeti elváltozások értékeléséhez (a részleteket lásd alább). A funkcionális képalkotás három fázist tartalmazott a következő protokoll szerint:

1. Bemelegítés előtti fázis: Először, minden beteg (DM/Myotonia+ és DM/Myotonia- csoportból) funkcionális képalkotó vizsgálaton esett át készszorítás közben (lásd alább), a DM/Myotonia+ csoportban a kéz myotóniája jelentkezett. Ezután minden beteg bemelegítést végzett (ismételt tenyérnyitás és zárás) annyi ideig, amennyi szükséges volt a myotonia jelenség lecsengésére (átlagosan 1,5 perc), ezt azok a betegek is 1,5 percig végezték, akiknél nem jelentkezett klinikai myotonia (DM/ Myotonia-csoport).

2. Bemelegítés utáni fázis: Közvetlenül ez után ismét funkcionális képalkotást végeztünk a készszorítás során, ezúttal a bemelegítés miatt myotonia nem volt várható. A 7. ábra szemlélteti a bemelegítés előtti és utáni vizsgálatok sorrendjét.

3. Minden betegnél passzív kézmozgatást végeztünk a sensomotoros pályák esetleges nem specifikus (myotóniától független) aktiválódási különbségeinek megfigyelésére.



7. ábra. A vizsgálati paradigmák időbeli elrendezése. (1) Kéz myotóniát mutató *dystrophia myotonica* páciensek (2) Kéz myotóniát nem mutató *dystrophia myotonica* páciensek. Szorít: bal kézszorítás; Bemelegítés: a bal kéz ismételt ökölbe szorítása és ellazítása a myotonia jelenség maximális lecsengéséig.

Bemelegítés előtti vizsgálat

A paradigma egymás utáni blokkjait a páciensek számára az ezekre vonatkozó egyszavas utasítással vezettük be egy kifejezetten fMRI-hez tervezett fejhallgatón keresztül (NordicNeuroLab, Bergen, Norvégia). A megfelelő hangerőt a vizsgálat előtt állítottuk be. A vizsgálat menetét a képalkotás előtt alaposan elmagyaráztuk a résztvevőknek.

A feladat során a következő egymást követő blokkok ismétlődtek összesen hat alkalommal (az első blokkot 30 másodperces nyugalmi idő vezette be):

1. Kézszorítás blokk: a betegek bal kezüket ökölbe szorították. A blokk 10 másodpercig tartott és a „szorít” felszólítás vezette be.

2. Kézszorítás utáni blokk: ("Myotonia" volt észlelhető a DM/Myotonia+ csoportban, mely a DM/Myotonia- csoportnál nem alakult ki): ezt a blokkot a "elenged" szóval vezettük be. A DM/ Myotonia+ betegeknél myotonia alakult ki (a kézfejük nem tudták azonnal ellazítani a szorítást követően). Felhívtuk a betegek figyelmét, hogy akaratlagosan ne relaxálják a kézfejük, hagyják, hogy a myotonia spontán elmúljon. A kéz teljes relaxációja a myotonia megszűnését jelentette, az addig eltelt időt minden mérés során regisztráltuk.

3. Pihenj blokk: A blokkok között 35mp pihenőidőt iktattunk be. A tulajdonképpeni pihenőidő (alapállapot) a myotonia megszűnését követte (35mp). A vizuális processing és a kapcsolódó funkciók zavaró hatásainak elkerülése érdekében a betegek szemüket csukva tartották a képalkotás során.

Bemelegítés utáni vizsgálat

A bemelegítés utáni vizsgálatot a bemelegítés előtti vizsgálatához hasonlóan végeztük, azonban a megelőző „bemelegítő” gyakorlat következtében klinikai myotonia sem a DM/Myotonia+ sem a DM/Myotonia- esetén nem volt várható illetve nem is alakult ki.

Passzív kézmozgatás

A passzív kézmozgatást 30 mp pihenőidő vezette be, ezt 5 alkalommal passzív kézmozgatás követte (a vizsgáló végezte a páciens ujjainak nyitását és zárását, míg a páciens megkértük, hogy ne ellensúlyozza a mozgást), 30 másodpercig, majd ismét 30 másodperc pihenőidő következett.

Képalkotási paraméterek

A képalkotást 3T Magnetom TIM Trio humán teljes test MRI skenneren (Siemens AG, Erlangen, Németország) végeztük, szabványos 12 csatornás fejtekerccsel.

A T1-súlyozott nagy felbontású mérést háromdimenziós (3D) MPRAGE szekvencia segítségével készítettük (TR/TI/TE=1900/900/3,41ms; kidöntési szög=9°; 160 axiális szelet; szeletvastagság=0,94 mm; nincs szeletközi rés; FOV=210x240mm²; mátrixméret=224x256; vevő sáv szélessége= 180 Hz/pixel).

A funkcionális képeket egy standard 2D spin echo EPI szekvencia segítségével nyertük, a következő paraméterekkel: TR/TE= 2000/36 ms; kidöntési szög= 83°; 23 axiális szelet; szeletvastagság= 4 mm; nincs szeletközi rés; FOV= 210x210 mm²; mátrixméret=92x92; vevő sáv szélessége= 1359 Hz/pixel; Az egymásutáni szeletek közötti áttűnés elkerülése érdekében összefésült szeletrendet alkalmaztunk. Összesen 150 elemet nyertünk 300 másodperc alatt.

Adatfeldolgozás

Az előfeldolgozást és a statisztikai elemzést a FEAT (FMRI Expert Analysis Tool) 5.98-as verziójával végeztük el [7]. Az előfeldolgozás magában foglalta a BET-et - agyi struktúrák extrakciója[125]-, az MCFLIRT mozgáskorrekciót [107] , a térbeli simítást (5 mm teljes szélesség- fél-maximummal, és a felülatéresztő időbeli szűrést 100-as frekvenciánál). Ugyanezt az időbeli szűrést alkalmaztuk a modellben is.

Az egyes adatsorok idősorozatos statisztikai elemzését a teljes agy általános lineáris modelljének (GLM) a FILM (FMRIB továbbfejlesztett lineáris modell) segítségével végeztük el, helyi önkorrrelációs korrekcióval [108].

A BOLD válasz modellezéséhez az FSL kanonikus gamma-hemodinamikai válaszfüggvényével (HRF) egy box-car függvényt convolváltunk a „szorít”, „myotonia” vagy „hiányzó myotonia” és „pihenj” állapotokkal.

A DM/Myotonia+ csoportban a „myotonia” és „pihenj” állapotok időzítését az észlelt myotonia időtartamához igazítottuk. A pácienseknél regisztrált myotonia időtartamokat nemcsak a bemelegítés előtti vizsgálatok során, hanem a bemelegítés utáni myotonia nélküli állapot vizsgálatához is felhasználtuk az aktivációk direkt összehasonlításához.

A DM/Myotonia- csoport vizsgálatához a „szorít és a „pihenj” állapotokon túl a „hiányzó myotonia” állapotot használtuk, hogy az adatok összehasonlíthatóak legyenek a DM/Myotonia+ csoportban regisztráltakkal. A „hiányzó myotonia” állapot 5mp-ig tartott, mivel ez volt a myotonia átlagos időtartama a DM/Myotonia+ csoportnál.

A statisztikai elemzéseket natív EPI térben végeztük. Az első szintű statisztikai térképeket háromlépcsős folyamattal regisztráltuk a standard térbe. Először is, az egyes alanyok alacsony felbontású fMRI adatait regisztráltuk az agy extrakción átesett nagy felbontású T1 súlyozott szerkezeti képéhez (7 szabadságfokú lineáris illesztés), majd a nagy felbontású képet a FLIRT használatával illesztettük az MNI152 standard agyképéhez (12 szabadságfokú lineáris illesztés).

Ezt követően tovább finomítottuk a strukturális képek regisztrációját a standard térbe FNIRT nemlineáris regisztrációval [126, 127]. A standard térbe való leképezéshez az így kapott lineáris és nemlineáris deformációkat matematikailag kombináltuk, és az első szintű statisztikai térképeknek feletettük meg. Interpolációt csak az utolsó lépésben használtunk, a regisztrációs számításokban nem.

A csoportszintű statisztikák elvégzéséhez az első szintű FEAT-adatokat a második szintű FEAT elemzésébe tápláltuk be.

Mixed effect (ME) magasabb modellezést alkalmaztunk, mivel ez modellezi a munkamenet/modell variabilitását, és ezért lehetővé teszi, hogy következtetéseket lehessen levonni szélesebb populációról is. A magasabb szintű aktiváció legpontosabb becsléséhez a FLAME opciót (FMRIB vegyes hatások helyi elemzése) végeztük mindkét szakaszával

(FLAME 1+2). Ez az opció magában foglalja a küszöbközeli voxelek MCMC (Markov Chain Monte Carlo mintavétel) alapú analízisét mely kis mintaméretnél javasolt ($n < 10$).

A következő csoportszintű összehasonlításokat végeztük el:

A: Bemelegítés előtti állapot és bemelegítés utáni állapot (ugyanazon az alanyon történt vizsgálat, tehát bemelegítés előtti szorítás versus bemelegítés utáni szorítás, bemelegítés előtti myotonia versus bemelegítés után myotonia nélküli állapot). Az extrakció alapú kontraszt-térképeket páros t-teszt alapján számoltuk ki. Az ismétlés és fáradtság BOLD válaszra gyakorolt esetleges hatásainak felfedésére a bemelegítés előtti és utáni állapotokat a DM/Myotonia- csoportnál is összehasonlítottuk.

B: A DM/Myotonia+ csoport bemelegítés előtti állapota és a DM/Myotonia- bemelegítés előtti állapotának összehasonlítása (különböző alanyok összehasonlítása tehát a DM/Myotonia+ csoport kézszorítása versus DM/Myotonia- csoport kézszorítása, valamint a DM/Myotonia+ csoport myotóniája versus DM/Myotonia- csoport hiányzó myotonia állapota). Az extrakció alapú kontraszt-térképeket párosítatlan t-teszt alapján számoltuk ki.

A passzív kézmozgítás feladatot a Myotonia és kontroll csoportok esetén hasonlítottuk össze extrakció alapú kontraszt térképen párosítatlan t-teszt segítségével.

4.4. Eredmények

Strukturális képalkotás

Strukturális képalkotással a pácienseknél enyhe, nem-specifikus eltéréseket találtunk, ilyen az atrophia, kamratágulat, egyeseknél fehérállományi léziók és tágabb Virchow-Robin ürök. Olyan mértékű elváltozás, mely a funkcionális képalkotást akadályozná, nem volt.

Funkcionális képalkotás

A DM/Myotonia+ csoport minden betegénél legalább 3mp-es (átlag 5 mp, max. 12mp) myotóniát észleltünk a bemelegítést megelőző kézszorításokat követően. A bemelegítést követő kézszorítások vizsgálatakor nem regisztráltunk 1 másodpercnél hosszabb myotóniát. A DM/Myotonia- csoportban egyik kézszorításkor sem jelentkezett myotonia.

DM/Myotonia+ csoport

Szignifikánsan magasabb ($p < 0.05$, $Z > 2.3$) BOLD jel volt elvezethető a bemelegítést megelőzően myotonia során, mint a bemelegítést követő myotonia nélküli állapotban a szupplementer motoros area (SMA) és a dorsalis anterior cingularis cortex (dACC) területéről (7. táblázat, 8. ábra). A szorítás során nem volt szignifikáns különbség a bemelegítés előtti vagy utáni fázisban.

DM/Myotonia- csoport

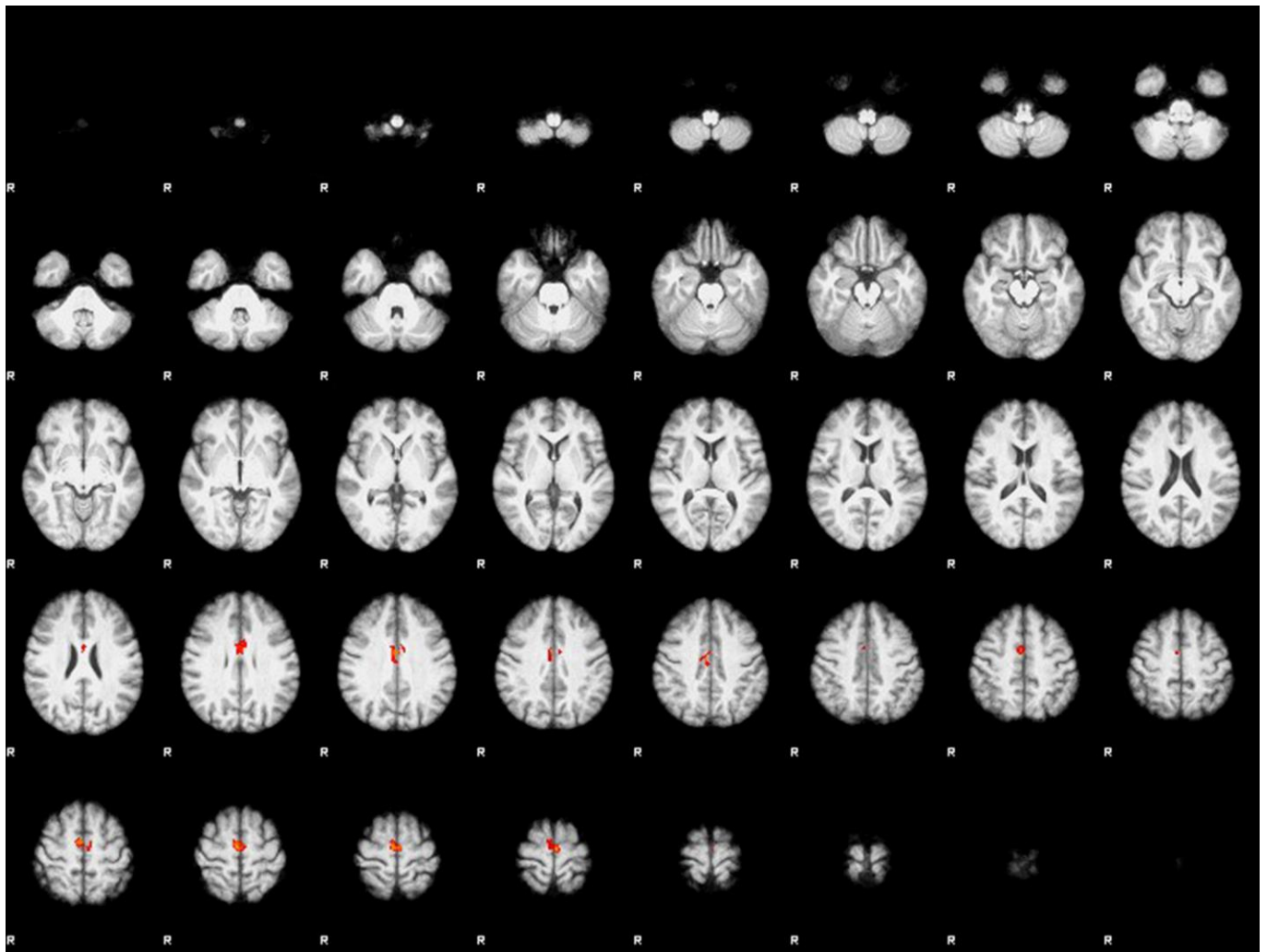
A bemelegítés előtti és utáni fázisok között nem volt szignifikáns különbség a BOLD jelben. Szignifikánsan magasabb BOLD jelet találtunk a Myotonia+ csoportban a myotonia során, mint a DM/Myotonia- csoportban myotonia hiányában a szupplementer motoros área (SMA) és a dorsalis anterior cingularis cortex (dACC) (9. ábra, 8. táblázat). A kézsorítás során regisztrált BOLD jelben a két csoport között nem volt szignifikáns különbség.

Passzív kézmozgatás

Nem regisztráltunk szignifikáns különbséget a passzív kézmozgatás fázisban a BOLD jelben a DM/Myotonia+ és DM/Myotonia- csoportok között.

Cluster	Voxel #	P	Max. Z	Z max. koordináták (MNI152) ¹			Atlasz vetület ²
				X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	
1	314	0.00681	4.29	6	-10	62	49 % SMA ³
2	224	0.0452	5.09	2	-2	30	65% ACC ⁴

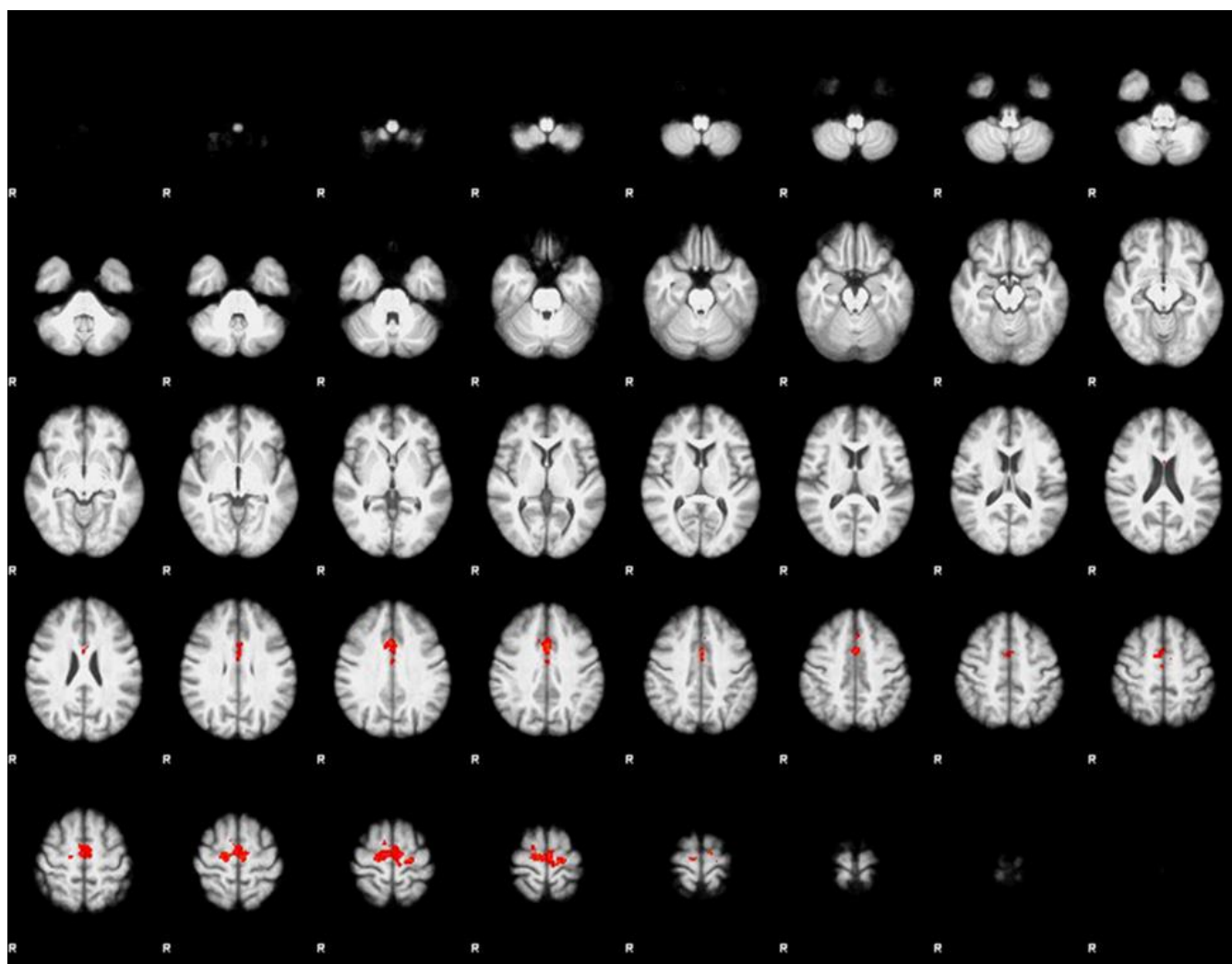
7. táblázat. A szignifikánsan magasabb BOLD jelű voxelek jellemzői a bemelegítés előtti myotonia során (1. Cluster) valamint bemelegítés után, myotonia hiányában (2. Cluster).¹Koordináták milliméterekben az MNI152 standard térben; ²Jelölés a Harvard-Oxford kortikális szerkezeti atlasz szerint. ³SMA=szuplementer motoros area. ⁴ACC=Elülső cinguláris cortex.



8. ábra. Bemelegítést megelőző myotonia majd a bemelegítés utáni myotonia nélküli állapotok összehasonlítása a M/Myotonia+ csoportban. A piros-sárga clusterok (átvetítve az MNI 152 standard térre) szignifikánsan ($p < 0,05$, $Z > 2,3$) magasabb BOLD jelet mutatnak myotonia során, mint a myotonia hiányában. A clusterok a szuplementer motoros áréában (SMA) és a hátsó elülső cinguláris kéregben (dACC) találhatóak, részletes leírásukat a 7. táblázat tartalmazza.

Cluster	Voxel #	P	Max. Z	Z max koordináták (MNI152) ¹			Atlasz vetület ²
				X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	
1	682	0.00014	3,79	0	12	34	81 % ACC ⁴
2	516	0.003	2,91	-4	-12	62	50% SMA ³

8.táblázat. A szignifikánsan magasabb BOLD jelű voxelek jellemzői a Myotonia+ csoportnál myotonia során (1. Cluster) valamint a Myotonia- csoportnál myotonia hiányában (2. Cluster).¹Koordináták milliméterekben az MNI152 standard térben;²Jelölés a Harvard-Oxford kortikális szerkezeti atlasz szerint. ³SMA=szupplementer motoros área. ⁴ACC=Elülső cinguláris cortex ;



9. ábra . A DM/Myotónia+ csoport bemelegítést megelőző myotonia során és a DM/Myotónia- csoport bemelegítés megelőző, myotonia nélküli állapotának összehasonlítása A piros-sárga clusterok (átvetítve az MNI 152 standard térre) szignifikánsan ($p < 0,05$, $Z > 2,3$) magasabb BOLD jelet mutatnak a DM/Myotónia+ csoportnál myotonia során mint a DM/Myotónia- csoportnál myotonia hiányában. A clusterok a szupplementer motoros áréában (SMA) és a hátsó elülső cinguláris kéregben (dACC) találhatóak, részletes leírásukat a 8 táblázat táblázat tartalmazza.

4.5. Megbeszélés

Tanulmányunkban első ízben vizsgáltuk a myotonia jelenség során létrejövő agyi aktivitást. fMRI képalkotás történt a myotonia és myotonia nélküli állapot alatt ugyanazon betegnél és a klinikailag myotoniás és nem myotoniás betegcsoportnál. Először a bemelegedés jelenség alapján, majd a két, myotonia pozitív ill. negatív betegcsoporton keresztül tudtuk elkülönítve vizsgálni a myotonia alatt ill. ennek hiányában bekövetkező BOLD aktivációt. Ezen összehasonlítások következetesen szignifikánsan magasabb BOLD jelet mutattak a szupplementer motoros areaban (SMA) és a dorsalis anterior cinguláris cortexben (dACC), mely megfelel az anterior-középső cinguláris gyrusnak (aMCC) a négy-régió neurobiológiai modell szerint [128].

Várakozásainknak megfelelően a primer motoros áréák nem mutattak aktivációt a myotonia során (a betegeknek azt az utasítást adtuk, hogy ne erőltessék a relaxációt, így az extensoros izomhatás miatt sem vártunk aktivitást). Ez alátámasztja azon hipotézisünket, mi szerint az agyi funkciók nem vesznek részt a myotonia kialakulásában, de ez az izom eredetű jelenség másodlagos, valószínűleg kompenzatórikus kérgi aktivációhoz vezet.

Az elnyújtott abnormális relaxáció lehetővé tette azon területek fMRI feltérképezését melyek valószínűleg részt vesznek a normál izomrelaxációban is. A mediális frontális kéreg aktivációjának oka a motoros kontroll mechanizmusokhoz, mozgásindítás/mozgáselőkészítéshez kapcsolódhat „aktív termináció” -ként vagy egyes „hibajelzéshez”, hibás kivitelezéshez kötött mechanizmusok része is lehet.

Az akaratlagos izomlazítás mechanizmusa egészséges egyéneknél jelenleg nem teljesen ismert. Több kutató felvetette, hogy az akaratlagos izomlazítás nem egyszerűen az összehúzódást eredményező idegi aktivitás felfüggesztésének következménye, hanem egy aktív gátló pálya közvetítésével történik [129-131]. Kimutatható volt, hogy ez a gátló mechanizmus megelőzi az izomrelaxációt, hasonlóan ahhoz, ahogy a motoros tervezés és előkészítés is megelőzi az aktív mozgást.

Ez a gátlás – mely a kontrakció, illetve a motoros válasz befejezéséhez, felfüggesztéséhez vezet – némiképp eltérő lehet egy teljes mozdulatsor gátlásától, mely a motoros szelekció részét képezi, azonban mindkét típusú gátlást összefüggésbe hozták az SMA-val [129-132].

Feltételezhető, hogy vizsgálatunkban a myotonia során az SMA-ban észlelt magasabb BOLD jel egy hasonló gátló funkciót jelez; vagyis az agy akaratlanul is be akarja fejezni a

rendellenesen elhúzódó relaxációt, annak ellenére, hogy a betegek szándékosan nem erőltették a myotonia megszűnését. Eredményünk összhangban van a motoros terminációt gátló pálya meglétének elméletével.

A másik myotonia során aktiválódott mező az anterior cinguláris kéreg volt (dACC) mely szintén a mediális frontális cortex motoros kontroll áréájában található. Ez az terület felelős a kognitív funkciók mozgáshoz kapcsolásáért. A myotonia szempontjából a legfontosabb motoros kontroll funkció mely ehhez a területhez köthető, a mozgás ellenőrzés és a hibajelentéshez/hibás kivitelezéshez kapcsolódó területek lehetnek [133-135]. Kimutatták, hogy a tudatosult hibás kivitelezés az anterior cingularis cortex erőteljes aktivációját idézi elő [133]. Annak ellenére, hogy az ezekben a vizsgálatokban alkalmazott feladatok (pl. „stroop hatás” és „error awerness” – hiba tudatosság) más jellegűek voltak, lehetséges, hogy a betegeinknél tapasztalt erőteljes dACC aktiváció ahhoz a „hibajelzés” mechanizmushoz és negatív hatáshoz, esetleg fájdalomhoz kapcsolódhat, melyet az intenció ellenére nem bekövetkező kéz-relaxáció tapasztalata idéz elő [136], bár egyik beteg sem erősítette meg, hogy fájdalmat érezne a vizsgálat során.

Érdekes módon a „resting-state-network” (lásd nyugalmi állapotú fMRI) aktivációval összefüggésben nem volt szignifikáns különbség a BOLD jelben, azaz nem mértünk alacsonyabb BOLD jelet a myotonia fázis során, mint amikor a DM/myotonia- csoport és a DM/myotonia+ csoport myotonia nélküli fázisát hasonlítottuk össze. Ennek az lehet az oka, hogy a „resting state-network” aktiváció lassabban jön létre, mint amennyi a myotonia időtartama, vagy térben nem jött létre eléggé konstans aktiváció, hogy szignifikáns különbséget mérhessünk.

Összességében a dACC-ben és SMA-ban létrejövő szimultán aktiváció arra utal, hogy a gátolt izomrelaxáció másodlagos választ vált ki a motoros kontroll áréákban. A passzív kézmozgás során nem volt szignifikáns különbség a BOLD jelben a betegcsoportok között, mely alapján a dACC és SMA aktiváció a myotóniával van összefüggésben és nem a DM okozta esetleges motoros vagy szenzoros eltérések/rendellenességek okozzák.

A mediális frontális régiók érintettek lehetnek más, a motoros rendellenességeket okozó betegségekben pl. Parkinson kór [137, 138], apraxiák [139, 140] és disztóniák [141].

Vizsgálatunk tudományos értékét csökkentheti az alacsony esetszám, azonban figyelembe véve a DM ritka előfordulását, a beválasztási kritériumokat és MRI kompatibilitást, a minta mérete elfogadhatónak tartható.

A kéz szorítóerejét nem vizsgáltuk az fMRI során, ami meglehetősen lehet az eredmények elemzésében. Azonban a szorítás fázis során nem találtunk szignifikáns különbséget a BOLD jelben sem ugyanazon beteg, sem az egyes betegek közötti összehasonlítás során – mely arra utal, hogy a csoportok és egyes vizsgálati ülések között a kézszorítás teljesítményében nem volt érdemi különbség (emellett a kifáradás sem magyarázza a kézszorítást követően észlelt különbséget) [142].

Eredményeink tükrében valószínűsíthető, hogy a myotonia összefügg a magasabb rendű motoros kontroll áréak aktivációjával. Ez a kérgi válasz a motoros terminációban résztvevő gátló pályák aktivációjának a következménye lehet. Eredményeink fontos információkkal járulhatnak hozzá a motoros áréak kutatásához, és az egyes centrális és perifériás betegségekben létrejövő kortikális válaszok megértésében (pl. Parkinson-kór, disztóniák, apraxiák).

4.6. Jövőbeli célkitűzések

A korábbi vizsgálatok alapján az MR képalkotás fontos részét képezheti az izombetegségek diagnózisának. Új biomarkerként lehetővé teszi a betegség progressziójának követését és a prognózis megítélését. A jövőben vizsgálatokat tervezünk más izombetegek követésére izom-MR vizsgálatokkal. A myotonia mechanizmusának vizsgálatára tovább bővítenénk a DMI betegek körét, valamint fMRI vizsgálatokat végeznénk kongenitális myotoniás betegeknél is.

5. Az új eredmények összefoglalása

Doktori felkészülésem során elvégzett klinikai kutatásaim legfontosabb eredményei összefoglalva:

- Több izombetegségben határoztuk meg az FGF-21 szérumszintet. Ez legtöbbször emelkedett a mitochondriális betegeknél, elsősorban PEO-ban, viszont MELAS-ban és izolált myopáthiás betegeknél csaknem normál FGF-21 szintet mértünk. Ennek oka lehet az enyhébb izomérzékenység, a túlsúlyos páciensek kizárása, vagy az FGF-21 szint diabetes mellitus előfordulásával való összefüggése.
- Eredményeink megerősítik, hogy myopáthiás betegeknél az FGF-21 szint a mitochondriális károsodás súlyosságával van összefüggésben, azonban nem volt szignifikáns összefüggés a FGF-21 szint és az izomgyengeség mértéke között.
- Eredményeink igazolták az FGF-21 és laktát szint közti összefüggést.
- Az izomszövetben kialakuló elsődleges és másodlagos mitochondriális diszfunkció FGF-21 termeléshez vezethet.
- Vizsgálatunk legfontosabb eredménye, hogy a DM1 betegeknél emelkedett FGF-21 szintet mértünk. Ennek egyik magyarázata a betegségben jól ismert inzulin rezisztencia lehet, egy másik lehetséges magyarázatot a DM1 betegeknél valószínűsíthető mitochondriális diszfunkció adhat.
- Neuromusculáris betegségekben fontos az inzulin rezisztencia figyelembevétele az FGF-21 szint értékelésénél.
- fMRI vizsgálatunk során kimutattuk, hogy a primer motoros áréák nem vesznek részt a myotonia kialakulásában, de ez az izom eredetű jelenség másodlagos, valószínűleg kompenzatórikus kérgi aktivációhoz vezet.
- Az elnyújtott relaxáció lehetővé tette azon területek fMRI feltérképezését melyek valószínűleg részt vesznek a normál izomrelaxációban is. Ezek a mediális frontális kéreg, az anterior cinguláris kéreg, valamint a szupplementer motoros área. Az első kettő a motoros kontroll mechanizmusokért felelősek, de a „hibajelzéshez” kötött mechanizmusok részei is lehetnek. A szupplementer motoros área a motoros válasz felfüggesztéséhez vezető gátlást fejtheti ki.

- A dorsalis-anterior cinguláris kéregben és a szupplementer motoros áreában létrejövő szimultán aktiváció arra utal, hogy az inhibált izomrelaxáció másodlagos választ vált ki a motoros kontrollért felelős területeken.
- Eredményeink fontos információkkal járulhatnak hozzá a motoros áreák kutatásához és az egyes centrális és perifériás betegségekben létrejövő kortikális válaszok megértéséhez.

6. Mellékletek

MRC Osztályozási rendszer és átalakítása 10 pontos skálává

MRC pontszám	Átalakított pontszám	Izomerő
5	10	Normális izomerő
4+	9	Alig detektálható izomerő csökkenés
4	8	Határozottan észlelhető, de enyhe izomgyengeség
4-	7	Gravitáció és plusz erő ellenében is képes mozgásra, kisfokú izomgyengeség
3+	6	Gravitáció ellenében is képes némi mozgásra
3	5	Gravitáció ellenében minimális mozgás
3-	4	A gravitációs erő ellenében nem képes mozgásra. Vízszintes síkban akkor képes mozgásra, ha a végtagot a gravitációval szemben megtartjuk.
2	3	Vízszintes síkban, ha a végtagot a gravitációval szemben megtartjuk, minimális mozgásra képes
1	2	Látható izom-összehúzódás, ami nem képes az ízület megmozdítására, még tehermentesített helyzetben sem
0	1	Egyáltalán nincs mozgás, sem látható vagy tapintható izomösszehúzódás (plégia).

Japanese Mitochondrial Disease Rating Scale – A mitochondriális betegségek japán értékelő rendszere

1. Mindennapi tevékenységek

A. Beszéd

0: Normál

1: Kissé érintett, de jól érthető

2: Mérsékelten érintett, néha ismétlés szükséges a megértéshez

3: Súlyosan érintett, gyakran ismétlés szükséges a megértéshez

4: Legtöbbször érthetetlen

B. Nyelés

0: Normál

1: Ritka félrenyelés

2: Időnként félrenyelés

3: Pépes táplálék szükséges

4: Nasogastrikus szonda vagy gastrostomia szükséges

C. Kézírás

0: Normál

1: Kissé lassabb, vagy apróbetűs

2: Apróbetűs, de olvasható

3: Súlyosabban érintett, nem minden szó olvasható

4: Többnyire olvashatatlan

D. Étel felszeletelése, eszközhasználat

0: Normál

1: Kissé lassú és ügyetlen, de nincs szükség segítségre

2: Az étel nagy részét fel tudja szeletelni, de egy kevés segítség szükséges

3: Az étel felszeletelésében segítség szükséges, de önállóan étkezik

4: Etetésre szorul

E. Öltözködés

0: Normál

1: Kissé lassú és ügyetlen, de nincs szükség segítségre

2: Időnként segítség szükséges a gombokkal, ingujjal

3: Jelentős segítséget igényel, de néhány dolgot egyedül is el tud végezni

4: Teljes segítséget igényel

F. Személyes higiénia

0: Normál

1: Kissé lassú és ügyetlen, de nincs szükség segítségre

2: Nagyon lassú vagy segítséget igényel zuhanyzáshoz vagy fürdéshez

3: Segítséget igényel a mosakodáshoz, fogmosáshoz, WC használathoz

4: Teljes segítséget igényel

G. Elesések

0: Nem fordul elő

1: Ritka elesés

2: Kevesebb, mint napi egy

3: Átlagosan napi egyszer

4: Több, mint egyszer naponta

H. Paroxysmalis események (migraine, görcsrohamok)

0: Nincs

1: < 1 havonta

2: > 1 havonta < 1 hetente

3: > hetente < 1 naponta

4: > 1 naponta/status

2. Motoros funkciók

A. Proximális izomerő (módosított MRC)

0: Normál

1: Enyhe izomgyengeség (grade 4 MRC)

2: Közepes izomgyengeség, gravitációt legyőzi (MRC3)

3: Súlyos izomgyengeség, gravitációt nem tudja legyőzni (MRC2)

4: Súlyos izomgyengeség, a végtagot nem tudja megmozdítani (MRC1)

5: Nincs akaratlagos izomtevékenység (MRC0)

B. Felső végtag koordináció (módosított ICARS: International Cooperative Ataxia Rating Scale)

0: Normál

1: Enyhe ügyetlenség: nincs jelentős rokkantság

2: Mérsékelt ügyetlenség: rossz kézírás, de a hétköznapi tevékenységeket elvégzi

3: Súlyos ügyetlenség, nem tud írni

4: Súlyos ügyetlenség, nem tud enni

C. Járás

0: Nem korlátozott

1: Kissé korlátozott (1–2 km)

2: Mérsékelt korlátozott (nehezen tudja tartani a tempót az egészségesekkel)

3: Súlyosan korlátozott (100–400 m után pihennie kell)

4: Legfeljebb 10m-t tud megtenni

D. Közepes intenzitású motoros tevékenységek

0: Nem korlátozott

1: Enyhén korlátozott

2: Mérsékelt korlátozott

3: Súlyosan korlátozott

4: Nem képes elvégezni

E. Intenzív motoros tevékenységek (futás, lépcsőzés, egyéb sportok)

0: Nem korlátozott

1: Enyhén korlátozott

2: Mérsékelt korlátozott

3: Súlyosan korlátozott

4: Nem képes elvégezni

3. Érzékszervek

A. Látás

0: Normál

1: Nem tud autót vezetni vagy ezzel egyenértékű (pl. nem látja a közlekedési táblákat vagy a boltban a jelzéseket)

2: Nem képes az átlagos nyomtatott könyveket elolvasni

3: Nem képes a nagybetűs standard könyveket elolvasni

4: Nem tud TV-t nézni

5: Nincs használható látás

B. Hallás

- 0: <10 dB-el csökkent
- 1: 10–20 dB-el csökkent
- 2: 20–40 dB-el csökkent
- 3: Súlyos, >40 dB-el csökkent, de javítható hallókészülékkel
- 4: Súlyos, >40 dB-el csökkent, nem javítható hallókészülékkel

4. Endokrin funkciók

- 0: Normál
 - 1: Egy belső elválasztású mirigy érintett
 - 2: Két belső elválasztású mirigy érintett
 - 3: Három belső elválasztású mirigy érintett
- Diabetes esetén +1, ha inzulin kezelés szükséges

5. Kardiális érintettség

- 0: Normál EKG és echocardiographia
- 1: Ingervezetési rendszer érintett, enyhén csökkent balkamra funkció (EF > 60%) vagy tünetmentes hypertrophia
- 2: Echocardiographia: cardiomyopathia és korlátozott terhelhetőség (EF < 60%) vagy pacemaker, mérsékelt cardiomyopathia (EF < 40–60%)
- 3: Súlyos cardiomyopathia

6. Vesefunkció

- 0: Normál
- 1: Creatinine clearance <50–90%
- 2: Creatinine clearance 30–50%
- 3: Creatinine clearance 10–30%
- 4: Creatinine clearance <10 ml/min, vagy transzfúzió

7. Kognitív érintettség

A. Intellektus

- 0: Normál
- 1: Enyhén csökkent (pl. feledékenység)
- 2: Mérsékelt memóriazavar (dezorientáció, mérsékelt nehézség a komplex feladatok megoldásában)
- 3: Súlyos memóriazavar (dezorientáció: – tér és időbeli, rossz problémamegoldás)
- 4: Súlyos memóriazavar (csak autopszichésen orientált, nem képes döntéseket hozni és problémákat megoldani)

B. Motiváció és „drive”

- 0: Normál
- 1: Csökkent energiaszint mely a tevékenységeket nem befolyásolja
- 2: Csökkent energiaszint, mely a hobbi- és érdeklődési kört szűkíti
- 3: Csökkent energiaszint, mely a hétköznapi rutint is befolyásolja
- 4: Képtelen bármilyen feladatot, tevékenységet elvégezni

JMDRS utolsó módosítás: European NeuroMuscular Conference (ENMC), publikálva: Neuromuscular Disorders. 2003;13(9):757–764 [143] [144]

Kiegészítés:

8. Szemmozgások

- 0: Normál
- 1: ptosis, szemmozgások rendben
- 2: ptosis, kissé beszűkült szemmozgások
- 3.: közepesen beszűkült szemmozgások
- 4: súlyosan beszűkült szemmozgások vagy kettőslátás
- 5: teljes externális ophthalmoplégia

Dystrophia Myotonica betegek részletes izomerő vizsgálata

	Izomcsoport
1	Váll eleváció
2	Váll flexorai
3	Váll abductio
4	Váll adductio
5	Könyök flexió
6	Alkar szupináció
7	Alkar pronáció
8	Csukló flexió
9	Csukló extensió
10	Metacarpalis flexió
11	Ujj flexió
12	Csípő flexió
13	Csípő kifelé rotáció
14	Csípő befelé rotáció
15	Térd extensió
16	Boka dorzálflexió és everzió
17	Boka inverzió
18	Nyak flexorai
19	Váll kifelé rotáció
20	Váll befelé rotáció
21	Csípő abductió
22	Csípő adductió
23	Váll extensorai
24	Könyök extensió
25	Csípő extensió
26	Térd flexió
27	Plantárflexió

7. Irodalomjegyzék

1. Harper, P., *Myotonic dystrophy, 3rd edition*. 2001, London: Saunders.
2. Molnár M. J., Karpati.G., *Az izombetegségek alapjai és modern szemlélete*. 2001.
3. Scholle, L.M., Lehmann, D., Deschauer, M., Kraya, T. and Zierz, S., *FGF-21 as a Potential Biomarker for Mitochondrial Diseases*. *Curr Med Chem*, 2018. **25**(18): p. 2070-2081.10.2174/0929867325666180111094336
4. Wheeler, T.M., Krym, M.C. and Thornton, C.A., *Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1*. *Neuromuscul Disord*, 2007. **17**(3): p. 242-7.10.1016/j.nmd.2006.12.015
5. Norwood, F.L., Harling, C., Chinnery, P.F., Eagle, M., Bushby, K. and Straub, V., *Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population*. *Brain*, 2009. **132**(Pt 11): p. 3175-86.10.1093/brain/awp236
6. Hughes, M.I., Hicks, E.M., Nevin, N.C. and Patterson, V.H., *The prevalence of inherited neuromuscular disease in Northern Ireland*. *Neuromuscul Disord*, 1996. **6**(1): p. 69-73.10.1016/0960-8966(94)00017-4
7. Magee, A. and Nevin, N.C., *The epidemiology of myotonic dystrophy in Northern Ireland*. *Community Genet*, 1999. **2**(4): p. 179-83.10.1159/000016209
8. Siciliano, G., Manca, M., Gennarelli, M., Angelini, C., Rocchi, A., Iudice, A., Miorin, M. and Mostacciuolo, M., *Epidemiology of myotonic dystrophy in Italy: re-appraisal after genetic diagnosis*. *Clin Genet*, 2001. **59**(5): p. 344-9.10.1034/j.1399-0004.2001.590508.x
9. Johnson, N.E., Butterfield, R.J., Mayne, K., Newcomb, T., Imburgia, C., Dunn, D., Duval, B., Feldkamp, M.L. and Weiss, R.B., *Population-Based Prevalence of Myotonic Dystrophy Type 1 Using Genetic Analysis of Statewide Blood Screening Program*. *Neurology*, 2021. **96**(7): p. e1045-e1053.10.1212/WNL.00000000000011425
10. Meola, G. and Cardani, R., *Myotonic Dystrophy Type 2: An Update on Clinical Aspects, Genetic and Pathomolecular Mechanism*. *J Neuromuscul Dis*, 2015. **2**(s2): p. S59-S71.10.3233/JND-150088
11. Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T., Aslanidis, C., de Jong, P., Jansen, G., Anvret, M., Riley, B. and et al., *Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy*. *Nature*, 1992. **355**(6360): p. 547-8.10.1038/355547a0
12. Turner, C. and Hilton-Jones, D., *The myotonic dystrophies: diagnosis and management*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010. **81**(4): p. 358-67.10.1136/jnnp.2008.158261
13. Liquori, C.L., Ricker, K., Moseley, M.L., Jacobsen, J.F., Kress, W., Naylor, S.L., Day, J.W. and Ranum, L.P., *Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9*. *Science*, 2001. **293**(5531): p. 864-7.10.1126/science.1062125
14. Day, J.W., Ricker, K., Jacobsen, J.F., Rasmussen, L.J., Dick, K.A., Kress, W., Schneider, C., Koch, M.C., Beilman, G.J., Harrison, A.R., Dalton, J.C. and Ranum, L.P., *Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum*. *Neurology*, 2003. **60**(4): p. 657-64.10.1212/01.wnl.0000054481.84978.f9
15. Rohilla, K.J. and Gagnon, K.T., *RNA biology of disease-associated microsatellite repeat expansions*. *Acta Neuropathol Commun*, 2017. **5**(1): p. 63.10.1186/s40478-017-0468-y
16. Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M. and Thornton, C.A., *Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat*. *Science*, 2000. **289**(5485): p. 1769-73.10.1126/science.289.5485.1769
17. Thomas, J.D., Oliveira, R., Sznajder, L.J. and Swanson, M.S., *Myotonic Dystrophy and Developmental Regulation of RNA Processing*. *Comprehensive Physiology*, 2018. **8**(2): p. 509-553.10.1002/cphy.c170002

18. Wheeler, T.M. and Thornton, C.A., *Myotonic dystrophy: RNA-mediated muscle disease*. *Curr Opin Neurol*, 2007. **20**(5): p. 572-6.10.1097/WCO.0b013e3282ef6064
19. Tedeschi, D., Lombardi, V., Mancuso, M., Martelli, F., Sighieri, C., Rocchi, A., Tovani, S., Siciliano, G. and Murri, L., *Potential involvement of ubiquinone in myotonic dystrophy pathophysiology: new diagnostic approaches for new rationale therapeutics*. *Neurol Sci*, 2000. **21**(5 Suppl): p. S979-80.10.1007/s100720070014
20. Johannsen, D.L. and Ravussin, E., *The role of mitochondria in health and disease*. *Curr Opin Pharmacol*, 2009. **9**(6): p. 780-6.10.1016/j.coph.2009.09.002
21. Takada, H., Oyama, Y., Kon, S. and Goto, T., *[Glucose intolerance in myotonic dystrophy type 1]*. *Rinsho Shinkeigaku*, 2012. **52**(11): p. 1259-60.10.5692/clinicalneuro.52.1259
22. Garcia-Puga, M., Saenz-Antonanzas, A., Fernandez-Torron, R., Munain, A.L. and Matheu, A., *Myotonic Dystrophy type 1 cells display impaired metabolism and mitochondrial dysfunction that are reversed by metformin*. *Aging (Albany NY)*, 2020. **12**(7): p. 6260-6275.10.18632/aging.103022
23. Lawler, J.M., *Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy*. *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 9): p. 2161-70.10.1113/jphysiol.2011.207456
24. Kim, J.H., Kwak, H.B., Thompson, L.V. and Lawler, J.M., *Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2013. **34**(1): p. 1-13.10.1007/s10974-012-9330-9
25. Renjini, R., Gayathri, N., Nalini, A. and Srinivas Bharath, M.M., *Oxidative damage in muscular dystrophy correlates with the severity of the pathology: role of glutathione metabolism*. *Neurochem Res*, 2012. **37**(4): p. 885-98.10.1007/s11064-011-0683-z
26. Comim, C.M., Mathia, G.B., Hoepers, A., Tuon, L., Kapczinski, F., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J. and Rosa, M.I., *Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and functionality in Progressive Muscular Dystrophies*. *An Acad Bras Cienc*, 2015. **87**(3): p. 1809-18.10.1590/0001-3765201520140508
27. Wong, L.J., Ashizawa, T., Monckton, D.G., Caskey, C.T. and Richards, C.S., *Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent*. *Am J Hum Genet*, 1995. **56**(1): p. 114-22
28. Meola, G., *Myotonic dystrophy type 2: the 2020 update*. *Acta Myol*, 2020. **39**(4): p. 222-234.10.36185/2532-1900-026
29. Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A., Nan, Z., Forster, C., Low, W.C., Schoser, B., Somia, N.V., Clark, H.B., Schmechel, S., Bitterman, P.B., Gourdon, G., Swanson, M.S., Moseley, M. and Ranum, L.P., *Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(1): p. 260-5.10.1073/pnas.1013343108
30. Douniol, M., Jacqueline, A., Cohen, D., Bodeau, N., Rachidi, L., Angeard, N., Cuisset, J.M., Vallee, L., Eymard, B., Plaza, M., Heron, D. and Guile, J.M., *Psychiatric and cognitive phenotype of childhood myotonic dystrophy type 1*. *Dev Med Child Neurol*, 2012. **54**(10): p. 905-11.10.1111/j.1469-8749.2012.04379.x
31. Lagrue, E., Dogan, C., De Antonio, M., Audic, F., Bach, N., Barnerias, C., Bellance, R., Cances, C., Chabrol, B., Cuisset, J.M., Desguerre, I., Durigneux, J., Espil, C., Fradin, M., Heron, D., Isapof, A., Jacquin-Piques, A., Journel, H., Laroche-Raynaud, C., Laugel, V., Magot, A., Manel, V., Mayer, M., Pereon, Y., Perrier-Boeswillald, J., Peudener, S., Quijano-Roy, S., Ragot-Mandry, S., Richelme, C., Rivier, F., Sabouraud, P., Sarret, C., Testard, H., Vanhulle, C., Walther-Louvier, U., Gherardi, R., Hamroun, D. and Bassez, G., *A large multicenter study of pediatric myotonic dystrophy type 1 for evidence-based management*. *Neurology*, 2019. **92**(8): p. e852-e865.10.1212/WNL.0000000000006948

32. Bouchard, J.P., Cossette, L., Bassez, G. and Puymirat, J., *Natural history of skeletal muscle involvement in myotonic dystrophy type 1: a retrospective study in 204 cases*. J Neurol, 2015. **262**(2): p. 285-93.10.1007/s00415-014-7570-x
33. Olson, N.D., Jou, M.F., Quast, J.E. and Nuttall, F.Q., *Peripheral neuropathy in myotonic dystrophy. Relation to glucose intolerance*. Arch Neurol, 1978. **35**(11): p. 741-5.10.1001/archneur.1978.00500350045009
34. Wiles, C.M., Busse, M.E., Sampson, C.M., Rogers, M.T., Fenton-May, J. and van Deursen, R., *Falls and stumbles in myotonic dystrophy*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2006. **77**(3): p. 393-6.10.1136/jnnp.2005.066258
35. Meola, G. and Moxley, R.T., 3rd, *Myotonic dystrophy type 2 and related myotonic disorders*. J Neurol, 2004. **251**(10): p. 1173-82.10.1007/s00415-004-0590-1
36. Machuca-Tzili, L., Brook, D. and Hilton-Jones, D., *Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review*. Muscle Nerve, 2005. **32**(1): p. 1-18.10.1002/mus.20301
37. Heatwole, C., Johnson, N., Bode, R., Dekdebrun, J., Dilek, N., Hilbert, J.E., Luebke, E., Martens, W., McDermott, M.P., Quinn, C., Rothrock, N., Thornton, C., Vickrey, B.G., Victorson, D. and Moxley, R.T., 3rd, *Patient-Reported Impact of Symptoms in Myotonic Dystrophy Type 2 (PRISM-2)*. Neurology, 2015. **85**(24): p. 2136-46.10.1212/WNL.0000000000002225
38. George, A., Schneider-Gold, C., Zier, S., Reiners, K. and Sommer, C., *Musculoskeletal pain in patients with myotonic dystrophy type 2*. Arch Neurol, 2004. **61**(12): p. 1938-42.10.1001/archneur.61.12.1938
39. Auvinen, S., Suominen, T., Hannonen, P., Bachinski, L.L., Krahe, R. and Udd, B., *Myotonic dystrophy type 2 found in two of sixty-three persons diagnosed as having fibromyalgia*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(11): p. 3627-31.10.1002/art.24037
40. Johnson, N.E., Abbott, D. and Cannon-Albright, L.A., *Relative risks for comorbidities associated with myotonic dystrophy: A population-based analysis*. Muscle Nerve, 2015. **52**(4): p. 659-61.10.1002/mus.24766
41. Lund, M., Diaz, L.J., Ranthe, M.F., Petri, H., Duno, M., Juncker, I., Eiberg, H., Vissing, J., Bundgaard, H., Wohlfahrt, J. and Melbye, M., *Cardiac involvement in myotonic dystrophy: a nationwide cohort study*. Eur Heart J, 2014. **35**(32): p. 2158-64.10.1093/eurheartj/ehu157
42. Breton, R. and Mathieu, J., *Usefulness of clinical and electrocardiographic data for predicting adverse cardiac events in patients with myotonic dystrophy*. Can J Cardiol, 2009. **25**(2): p. e23-7.10.1016/s0828-282x(09)70479-9
43. Moxley, R.T., 3rd, Meola, G., Udd, B. and Ricker, K., *Report of the 84th ENMC workshop: PROMM (proximal myotonic myopathy) and other myotonic dystrophy-like syndromes: 2nd workshop. 13-15th October, 2000, Loosdrecht, The Netherlands*. Neuromuscul Disord, 2002. **12**(3): p. 306-17.10.1016/s0960-8966(01)00284-x
44. Russo, V., Rago, A., Atripaldi, L., Leonardi, S., Papa, A.A., Politano, L., Golino, P., Potpara, T.S. and Nigro, G., *SERUM cardiac-specific biomarkers and atrial fibrillation in myotonic dystrophy type I*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2019. **30**(12): p. 2914-2919.10.1111/jce.14211
45. Groh, W.J., Groh, M.R., Saha, C., Kincaid, J.C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R.F., Bhakta, D., Nair, G.V., Marashdeh, M.M., Zipes, D.P. and Pascuzzi, R.M., *Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type I*. N Engl J Med, 2008. **358**(25): p. 2688-97.10.1056/NEJMoa062800
46. Bassez, G., Lazarus, A., Desguerre, I., Varin, J., Laforet, P., Becane, H.M., Meune, C., Arne-Bes, M.C., Ounnoughene, Z., Radvanyi, H., Eymard, B. and Duboc, D., *Severe cardiac arrhythmias in young patients with myotonic dystrophy type I*. Neurology, 2004. **63**(10): p. 1939-41.10.1212/01.wnl.0000144343.91136.cf

47. Udd, B., Meola, G., Krahe, R., Wansink, D.G., Bassez, G., Kress, W., Schoser, B. and Moxley, R., *Myotonic dystrophy type 2 (DM2) and related disorders report of the 180th ENMC workshop including guidelines on diagnostics and management 3-5 December 2010, Naarden, The Netherlands*. Neuromuscul Disord, 2011. **21**(6): p. 443-50.10.1016/j.nmd.2011.03.013
48. Schoser, B.G., Ricker, K., Schneider-Gold, C., Hengstenberg, C., Durre, J., Bultmann, B., Kress, W., Day, J.W. and Ranum, L.P., *Sudden cardiac death in myotonic dystrophy type 2*. Neurology, 2004. **63**(12): p. 2402-4.10.1212/01.wnl.0000147335.10783.e4
49. Wahbi, K., Meune, C., Becane, H.M., Laforet, P., Bassez, G., Lazarus, A., Radvanyi-Hoffman, H., Eymard, B. and Duboc, D., *Left ventricular dysfunction and cardiac arrhythmias are frequent in type 2 myotonic dystrophy: a case control study*. Neuromuscul Disord, 2009. **19**(7): p. 468-72.10.1016/j.nmd.2009.04.012
50. Modoni, A., Silvestri, G., Pomponi, M.G., Mangiola, F., Tonali, P.A. and Marra, C., *Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1*. Arch Neurol, 2004. **61**(12): p. 1943-7.10.1001/archneur.61.12.1943
51. Sansone, V., Gandossini, S., Cotelli, M., Calabria, M., Zanetti, O. and Meola, G., *Cognitive impairment in adult myotonic dystrophies: a longitudinal study*. Neurol Sci, 2007. **28**(1): p. 9-15.10.1007/s10072-007-0742-z
52. Laberge, L., Begin, P., Montplaisir, J. and Mathieu, J., *Sleep complaints in patients with myotonic dystrophy*. J Sleep Res, 2004. **13**(1): p. 95-100.10.1111/j.1365-2869.2004.00385.x
53. Ono, S., Takahashi, K., Jinnai, K., Kanda, F., Fukuoka, Y., Kurisaki, H., Mitake, S., Inagaki, T., Yamano, T. and Nagao, K., *Loss of serotonin-containing neurons in the raphe of patients with myotonic dystrophy: a quantitative immunohistochemical study and relation to hypersomnia*. Neurology, 1998. **50**(2): p. 535-8.10.1212/wnl.50.2.535
54. Tieleman, A.A., Knoop, H., van de Logt, A.E., Bleijenberg, G., van Engelen, B.G. and Overeem, S., *Poor sleep quality and fatigue but no excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy type 2*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. **81**(9): p. 963-7.10.1136/jnnp.2009.192591
55. Papadopoulos, C., Kekou, K., Xirou, S., Kitsiou-Tzeli, S., Kararizou, E. and Papadimas, G.K., *Early onset posterior subscapular cataract in a series of myotonic dystrophy type 2 patients*. Eye (Lond), 2018. **32**(3): p. 622-625.10.1038/eye.2017.280
56. Orngreen, M.C., Arlien-Soborg, P., Duno, M., Hertz, J.M. and Vissing, J., *Endocrine function in 97 patients with myotonic dystrophy type 1*. J Neurol, 2012. **259**(5): p. 912-20.10.1007/s00415-011-6277-5
57. Vujnic, M., Peric, S., Calic, Z., Benovic, N., Nisic, T., Pesovic, J., Savic-Pavicevic, D. and Rakoccevic-Stojanovic, V., *Metabolic impairments in patients with myotonic dystrophy type 2*. Acta Myol, 2018. **37**(4): p. 252-256
58. Vihola, A., Bachinski, L.L., Sirito, M., Olufemi, S.E., Hajibashi, S., Baggerly, K.A., Raheem, O., Haapasalo, H., Suominen, T., Holmlund-Hampf, J., Paetau, A., Cardani, R., Meola, G., Kalimo, H., Edstrom, L., Krahe, R. and Udd, B., *Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(4): p. 465-79.10.1007/s00401-010-0637-6
59. Bogaard, J.M., van der Meche, F.G., Hendriks, I. and Ververs, C., *Pulmonary function and resting breathing pattern in myotonic dystrophy*. Lung, 1992. **170**(3): p. 143-53.10.1007/BF00174317
60. Klompe, L., Lance, M., van der Woerd, D., Scohy, T. and Bogers, A.J., *Anaesthesiological and ventilatory precautions during cardiac surgery in Steinert's disease*. J Card Surg, 2007. **22**(1): p. 74-5.10.1111/j.1540-8191.2007.00349.x
61. Udd, B. and Krahe, R., *The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges*. Lancet Neurol, 2012. **11**(10): p. 891-905.10.1016/S1474-4422(12)70204-1

62. Bellini, M., Biagi, S., Stasi, C., Costa, F., Mumolo, M.G., Ricchiuti, A. and Marchi, S., *Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(12): p. 1821-8.10.3748/wjg.v12.i12.1821
63. Tieleman, A.A., van Vliet, J., Jansen, J.B., van der Kooi, A.J., Borm, G.F. and van Engelen, B.G., *Gastrointestinal involvement is frequent in Myotonic Dystrophy type 2*. Neuromuscul Disord, 2008. **18**(8): p. 646-9.10.1016/j.nmd.2008.05.010
64. Tieleman, A.A., Knuijt, S., van Vliet, J., de Swart, B.J., Ensink, R. and van Engelen, B.G., *Dysphagia is present but mild in myotonic dystrophy type 2*. Neuromuscul Disord, 2009. **19**(3): p. 196-8.10.1016/j.nmd.2008.12.002
65. Ballester-Lopez, A., Linares-Pardo, I., Koehorst, E., Nunez-Manchon, J., Pintos-Morell, G., Coll-Canti, J., Almendrote, M., Lucente, G., Arbex, A., Magana, J.J., Murillo-Melo, N.M., Lucia, A., Monckton, D.G., Cumming, S.A., Ramos-Fransi, A., Martinez-Pineiro, A. and Nogales-Gadea, G., *The Need for Establishing a Universal CTG Sizing Method in Myotonic Dystrophy Type 1*. Genes (Basel), 2020. **11**(7).10.3390/genes11070757
66. Cardani, R., Mancinelli, E., Sansone, V., Rotondo, G. and Meola, G., *Biomolecular identification of (CCTG)_n mutation in myotonic dystrophy type 2 (DM2) by FISH on muscle biopsy*. Eur J Histochem, 2004. **48**(4): p. 437-42.10.4081/918
67. Bassez, G., Chapoy, E., Bastuji-Garin, S., Radvanyi-Hoffman, H., Authier, F.J., Pellissier, J.F., Eymard, B. and Gherardi, R.K., *Type 2 myotonic dystrophy can be predicted by the combination of type 2 muscle fiber central nucleation and scattered atrophy*. J Neuropathol Exp Neurol, 2008. **67**(4): p. 319-25.10.1097/NEN.0b013e31816b4acc
68. Donahue, L.A., Mangla, R. and Westesson, P.L., *Neuroimaging in myotonic dystrophy type 1*. Neurology, 2009. **73**(22): p. 1931.10.1212/WNL.0b013e3181c3fdb0
69. Meola, G. and Sansone, V., *Cerebral involvement in myotonic dystrophies*. Muscle Nerve, 2007. **36**(3): p. 294-306.10.1002/mus.20800
70. Minnerop, M., Luders, E., Specht, K., Ruhlmann, J., Schneider-Gold, C., Schroder, R., Thompson, P.M., Toga, A.W., Klockgether, T. and Kornblum, C., *Grey and white matter loss along cerebral midline structures in myotonic dystrophy type 2*. J Neurol, 2008. **255**(12): p. 1904-9.10.1007/s00415-008-0997-1
71. Minnerop, M., Weber, B., Schoene-Bake, J.C., Roeske, S., Mirbach, S., Anspach, C., Schneider-Gold, C., Betz, R.C., Helmstaedter, C., Tittgemeyer, M., Klockgether, T. and Kornblum, C., *The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease*. Brain, 2011. **134**(Pt 12): p. 3530-46.10.1093/brain/awr299
72. Romeo, V., Pegoraro, E., Ferrati, C., Squarzanti, F., Soraru, G., Palmieri, A., Zucchetta, P., Antunovic, L., Bonifazi, E., Novelli, G., Trevisan, C.P., Ermani, M., Manara, R. and Angelini, C., *Brain involvement in myotonic dystrophies: neuroimaging and neuropsychological comparative study in DM1 and DM2*. J Neurol, 2010. **257**(8): p. 1246-55.10.1007/s00415-010-5498-3
73. Peric, S., Maksimovic, R., Banko, B., Durdic, M., Bjelica, B., Bozovic, I., Balcik, Y., Pesovic, J., Savic-Pavicevic, D. and Rakocevic-Stojanovic, V., *Magnetic resonance imaging of leg muscles in patients with myotonic dystrophies*. J Neurol, 2017. **264**(9): p. 1899-1908.10.1007/s00415-017-8574-0
74. Pal, E. and Derczy, K., *[Role of MRI in the diagnosis of neuromuscular disorders]*. Orv Hetil, 2011. **152**(34): p. 1362-7.10.1556/OH.2011.29193
75. Kornblum, C., Lutterbey, G., Bogdanow, M., Kesper, K., Schild, H., Schroder, R. and Wattjes, M.P., *Distinct neuromuscular phenotypes in myotonic dystrophy types 1 and 2 : a whole body highfield MRI study*. J Neurol, 2006. **253**(6): p. 753-61.10.1007/s00415-006-0111-5
76. Hiba, B., Richard, N., Hebert, L.J., Cote, C., Nejjari, M., Vial, C., Bouhour, F., Puymirat, J. and Janier, M., *Quantitative assessment of skeletal muscle degeneration in patients with*

- myotonic dystrophy type 1 using MRI*. J Magn Reson Imaging, 2012. **35**(3): p. 678-85.10.1002/jmri.22849
77. Heskamp, L., Okkersen, K., van Nimwegen, M., Ploegmakers, M.J., Bassez, G., Deux, J.F., van Engelen, B.G., Heerschap, A. and Consortium, O., *Quantitative Muscle MRI Depicts Increased Muscle Mass after a Behavioral Change in Myotonic Dystrophy Type 1*. Radiology, 2020. **297**(1): p. 132-142.10.1148/radiol.2020192518
 78. Rzuczek, S.G., Colgan, L.A., Nakai, Y., Cameron, M.D., Furling, D., Yasuda, R. and Disney, M.D., *Precise small-molecule recognition of a toxic CUG RNA repeat expansion*. Nat Chem Biol, 2017. **13**(2): p. 188-193.10.1038/nchembio.2251
 79. Luu, L.M., Nguyen, L., Peng, S., Lee, J., Lee, H.Y., Wong, C.H., Hergenrother, P.J., Chan, H.Y. and Zimmerman, S.C., *A Potent Inhibitor of Protein Sequestration by Expanded Triplet (CUG) Repeats that Shows Phenotypic Improvements in a Drosophila Model of Myotonic Dystrophy*. ChemMedChem, 2016. **11**(13): p. 1428-35.10.1002/cmdc.201600081
 80. LoRusso, S., Weiner, B. and Arnold, W.D., *Myotonic Dystrophies: Targeting Therapies for Multisystem Disease*. Neurotherapeutics, 2018. **15**(4): p. 872-884.10.1007/s13311-018-00679-z
 81. van Agtmaal, E.L., Andre, L.M., Willemse, M., Cumming, S.A., van Kessel, I.D.G., van den Broek, W., Gourdon, G., Furling, D., Mouly, V., Monckton, D.G., Wansink, D.G. and Wieringa, B., *CRISPR/Cas9-Induced (CTGCAG)_n Repeat Instability in the Myotonic Dystrophy Type 1 Locus: Implications for Therapeutic Genome Editing*. Mol Ther, 2017. **25**(1): p. 24-43.10.1016/j.ymthe.2016.10.014
 82. Provenzano, C., Cappella, M., Valaperta, R., Cardani, R., Meola, G., Martelli, F., Cardinali, B. and Falcone, G., *CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of CTG Expansions Recovers Normal Phenotype in Myogenic Cells Derived from Myotonic Dystrophy 1 Patients*. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. **9**: p. 337-348.10.1016/j.omtn.2017.10.006
 83. Schoser, B., *Myotonic Dystrophy Type 2*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
 84. Heatwole, C., Luebbe, E., Rosero, S., Eichinger, K., Martens, W., Hilbert, J., Dekdebrun, J., Dilek, N., Zizzi, C., Johnson, N., Puwanant, A., Tawil, R., Schifitto, G., Beck, C.A., Richeson, J.F., Zareba, W., Thornton, C., McDermott, M.P. and Moxley, R., 3rd, *Mexiletine in Myotonic Dystrophy Type 1: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial*. Neurology, 2021. **96**(2): p. e228-e240.10.1212/WNL.00000000000011002
 85. Khalighi, K., Kodali, A., Thapamagar, S.B. and Walker, S.R., *Cardiac involvement in myotonic dystrophy*. J Community Hosp Intern Med Perspect, 2015. **5**(1): p. 25319.10.3402/jchimp.v5.25319
 86. Bassez, G., Audureau, E., Hogrel, J.Y., Arrouasse, R., Baghdoyan, S., Bhugaloo, H., Gourlay-Chu, M.L., Le Corvoisier, P. and Peschanski, M., *Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial*. Brain, 2018. **141**(10): p. 2855-2865.10.1093/brain/awy231
 87. Damian, M.S., Gerlach, A., Schmidt, F., Lehmann, E. and Reichmann, H., *Modafinil for excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy*. Neurology, 2001. **56**(6): p. 794-6.10.1212/wnl.56.6.794
 88. Hilton-Jones, D., Bowler, M., Lochmueller, H., Longman, C., Petty, R., Roberts, M., Rogers, M., Turner, C. and Wilcox, D., *Modafinil for excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy type 1--the patients' perspective*. Neuromuscul Disord, 2012. **22**(7): p. 597-603.10.1016/j.nmd.2012.02.005
 89. Antonini, G., Morino, S., Fiorelli, M., Fiorini, M. and Giubilei, F., *Selegiline in the treatment of hypersomnolence in myotonic dystrophy: a pilot study*. J Neurol Sci, 1997. **147**(2): p. 167-9.10.1016/s0022-510x(96)05328-2

90. West, S.D., Lochmuller, H., Hughes, J., Atalaia, A., Marini-Bettolo, C., Baudouin, S.V. and Anderson, K.N., *Sleepiness and Sleep-related Breathing Disorders in Myotonic Dystrophy and Responses to Treatment: A Prospective Cohort Study*. J Neuromuscul Dis, 2016. **3**(4): p. 529-537.10.3233/JND-160191
91. Yum, K., Wang, E.T. and Kalsotra, A., *Myotonic dystrophy: disease repeat range, penetrance, age of onset, and relationship between repeat size and phenotypes*. Curr Opin Genet Dev, 2017. **44**: p. 30-37.10.1016/j.gde.2017.01.007
92. Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prevost, C. and Begin, P., *A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy*. Neurology, 1999. **52**(8): p. 1658-62.10.1212/wnl.52.8.1658
93. Scholer, N., Langer, C., Dohner, H., Buske, C. and Kuchenbauer, F., *Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature*. Exp Hematol, 2010. **38**(12): p. 1126-30.10.1016/j.exphem.2010.10.004
94. Datta, N. and Ghosh, P.S., *Update on Muscular Dystrophies with Focus on Novel Treatments and Biomarkers*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2020. **20**(6): p. 14.10.1007/s11910-020-01034-6
95. Penas, A., Fernandez-De la Torre, M., Laine-Menendez, S., Lora, D., Illescas, M., Garcia-Bartolome, A., Morales-Conejo, M., Arenas, J., Martin, M.A., Moran, M., Dominguez-Gonzalez, C. and Ugalde, C., *Plasma Gelsolin Reinforces the Diagnostic Value of FGF-21 and GDF-15 for Mitochondrial Disorders*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(12).10.3390/ijms22126396
96. Davis, R.L., Liang, C. and Sue, C.M., *A comparison of current serum biomarkers as diagnostic indicators of mitochondrial diseases*. Neurology, 2016. **86**(21): p. 2010-5.10.1212/WNL.0000000000002705
97. Maresca, A., Del Dotto, V., Romagnoli, M., La Morgia, C., Di Vito, L., Capristo, M., Valentino, M.L., Carelli, V. and Group, E.-M.S., *Expanding and validating the biomarkers for mitochondrial diseases*. J Mol Med (Berl), 2020. **98**(10): p. 1467-1478.10.1007/s00109-020-01967-y
98. Varhaug, K.N., Hikmat, O., Nakkestad, H.L., Vedeler, C.A. and Bindoff, L.A., *Serum biomarkers in primary mitochondrial disorders*. Brain Commun, 2021. **3**(1): p. fcaa222.10.1093/braincomms/fcaa222
99. Koehorst, E., Ballester-Lopez, A., Arechavala-Gomez, V., Martinez-Pineiro, A. and Nogales-Gadea, G., *The Biomarker Potential of miRNAs in Myotonic Dystrophy Type I*. J Clin Med, 2020. **9**(12).10.3390/jcm9123939
100. Koutsoulidou, A., Kyriakides, T.C., Papadimas, G.K., Christou, Y., Kararizou, E., Papanicolaou, E.Z. and Phylactou, L.A., *Elevated Muscle-Specific miRNAs in Serum of Myotonic Dystrophy Patients Relate to Muscle Disease Progress*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0125341.10.1371/journal.pone.0125341
101. Perfetti, A., Greco, S., Cardani, R., Fossati, B., Cuomo, G., Valaperta, R., Ambrogi, F., Cortese, A., Botta, A., Mignarri, A., Santoro, M., Gaetano, C., Costa, E., Dotti, M.T., Silvestri, G., Massa, R., Meola, G. and Martelli, F., *Validation of plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type I*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38174.10.1038/srep38174
102. Koutsoulidou, A. and Phylactou, L.A., *Circulating Biomarkers in Muscular Dystrophies: Disease and Therapy Monitoring*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020. **18**: p. 230-239.10.1016/j.omtm.2020.05.017
103. Cuevas-Ramos, D., Aguilar-Salinas, C.A. and Gomez-Perez, F.J., *Metabolic actions of fibroblast growth factor 21*. Curr Opin Pediatr, 2012. **24**(4): p. 523-9.10.1097/MOP.0b013e3283557d22
104. Beenken, A. and Mohammadi, M., *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(3): p. 235-53.10.1038/nrd2792

105. Angelin, B., Larsson, T.E. and Rudling, M., *Circulating fibroblast growth factors as metabolic regulators--a critical appraisal*. Cell Metab, 2012. **16**(6): p. 693-705.10.1016/j.cmet.2012.11.001
106. Iglesias, P., Selgas, R., Romero, S. and Diez, J.J., *Biological role, clinical significance, and therapeutic possibilities of the recently discovered metabolic hormone fibroblastic growth factor 21*. Eur J Endocrinol, 2012. **167**(3): p. 301-9.10.1530/EJE-12-0357
107. Reinehr, T., Woelfle, J., Wunsch, R. and Roth, C.L., *Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) and its relation to obesity, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver in children: a longitudinal analysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(6): p. 2143-50.10.1210/jc.2012-1221
108. Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S. and Maratos-Flier, E., *Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 426-37.10.1016/j.cmet.2007.05.002
109. Tynismaa, H., Carroll, C.J., Raimundo, N., Ahola-Erkkila, S., Wenz, T., Ruhanen, H., Guse, K., Hemminki, A., Peltola-Mjosund, K.E., Tulkki, V., Oresic, M., Moraes, C.T., Pietilainen, K., Hovatta, I. and Suomalainen, A., *Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(20): p. 3948-58.10.1093/hmg/ddq310
110. Suomalainen, A., Elo, J.M., Pietilainen, K.H., Hakonen, A.H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S.K., Tyni, T., Kiuru-Enari, S., Pihko, H., Darin, N., Ounap, K., Kluijtmans, L.A., Paetau, A., Buzkova, J., Bindoff, L.A., Annunen-Rasila, J., Uusimaa, J., Rissanen, A., Yki-Jarvinen, H., Hirano, M., Tulinius, M., Smeitink, J. and Tynismaa, H., *FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study*. Lancet Neurol, 2011. **10**(9): p. 806-18.10.1016/S1474-4422(11)70155-7
111. Su, S.L., Wang, W.F., Wu, S.L., Wu, H.M., Chang, J.C., Huang, C.S., Cheng, W.L., Soong, B.W., Lee, Y.C., Li, J.Y., Kuo, S.J., Chen, M., Huang, C.N. and Liu, C.S., *FGF21 in ataxia patients with spinocerebellar atrophy and mitochondrial disease*. Clin Chim Acta, 2012. **414**: p. 225-7.10.1016/j.cca.2012.09.019
112. Davis, R.L., Liang, C., Edema-Hildebrand, F., Riley, C., Needham, M. and Sue, C.M., *Fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker of mitochondrial disease*. Neurology, 2013. **81**(21): p. 1819-26.10.1212/01.wnl.0000436068.43384.ef
113. Kim, K.H., Jeong, Y.T., Oh, H., Kim, S.H., Cho, J.M., Kim, Y.N., Kim, S.S., Kim, D.H., Hur, K.Y., Kim, H.K., Ko, T., Han, J., Kim, H.L., Kim, J., Back, S.H., Komatsu, M., Chen, H., Chan, D.C., Konishi, M., Itoh, N., Choi, C.S. and Lee, M.S., *Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine*. Nat Med, 2013. **19**(1): p. 83-92.10.1038/nm.3014
114. Bernier, F.P., Boneh, A., Dennett, X., Chow, C.W., Cleary, M.A. and Thorburn, D.R., *Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children*. Neurology, 2002. **59**(9): p. 1406-11.10.1212/01.wnl.0000033795.17156.00
115. Muniyappa, R., Lee, S., Chen, H. and Quon, M.J., *Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(1): p. E15-26.10.1152/ajpendo.00645.2007
116. Yatsuga, S., Povalko, N., Nishioka, J., Katayama, K., Kakimoto, N., Matsuishi, T., Kakuma, T., Koga, Y. and Taro Matsuoka for, M.S.G.i.J., *MELAS: a nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(5): p. 619-24.10.1016/j.bbagen.2011.03.015
117. Savkur, R.S., Philips, A.V. and Cooper, T.A., *Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy*. Nat Genet, 2001. **29**(1): p. 40-7.10.1038/ng704

118. Cheng, X., Zhu, B., Jiang, F. and Fan, H., *Serum FGF-21 levels in type 2 diabetic patients*. *Endocr Res*, 2011. **36**(4): p. 142-8.10.3109/07435800.2011.558550
119. Woo, Y.C., Xu, A., Wang, Y. and Lam, K.S., *Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013. **78**(4): p. 489-96.10.1111/cen.12095
120. Logigian, E.L., Blood, C.L., Dilek, N., Martens, W.B., Moxley, R.T.t., Wiegner, A.W., Thornton, C.A. and Moxley, R.T., 3rd, *Quantitative analysis of the "warm-up" phenomenon in myotonic dystrophy type 1*. *Muscle Nerve*, 2005. **32**(1): p. 35-42.10.1002/mus.20339
121. Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A. and Cooper, T.A., *Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing*. *Mol Cell*, 2002. **10**(1): p. 45-53.10.1016/s1097-2765(02)00572-5
122. Caramia, F., Mainero, C., Gragnani, F., Tinelli, E., Fiorelli, M., Ceschin, V., Pantano, P., Bucci, E., Barra, V., Bozzao, L. and Antonini, G., *Functional MRI changes in the central motor system in myotonic dystrophy type 1*. *Magn Reson Imaging*, 2010. **28**(2): p. 226-34.10.1016/j.mri.2009.07.006
123. Okkersen, K., Monckton, D.G., Le, N., Tuladhar, A.M., Raaphorst, J. and van Engelen, B.G.M., *Brain imaging in myotonic dystrophy type 1: A systematic review*. *Neurology*, 2017. **89**(9): p. 960-969.10.1212/WNL.0000000000004300
124. Oldfield, R.C., *The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory*. *Neuropsychologia*, 1971. **9**(1): p. 97-113.10.1016/0028-3932(71)90067-4
125. Smith, S.M., *Fast robust automated brain extraction*. *Hum Brain Mapp*, 2002. **17**(3): p. 143-55.10.1002/hbm.10062
126. Andersson Jrl, J.M., Smith S. *Non-linear optimisation. FMRIB technical report TR07JA1*. 2007; Available from: <http://www.fmrib.ox.ac.uk/analysis/techrep/>.
127. Andersson Jrl, J.M., Smith S, *Non-linear registration, aka Spatial normalisation. FMRIB technical report TR07JA2*. 2007
128. Palomero-Gallagher, N., Vogt, B.A., Schleicher, A., Mayberg, H.S. and Zilles, K., *Receptor architecture of human cingulate cortex: evaluation of the four-region neurobiological model*. *Hum Brain Mapp*, 2009. **30**(8): p. 2336-55.10.1002/hbm.20667
129. Terada, K., Ikeda, A., Yazawa, S., Nagamine, T. and Shibasaki, H., *Movement-related cortical potentials associated with voluntary relaxation of foot muscles*. *Clin Neurophysiol*, 1999. **110**(3): p. 397-403.10.1016/s1388-2457(98)00017-0
130. Toma, K., Honda, M., Hanakawa, T., Okada, T., Fukuyama, H., Ikeda, A., Nishizawa, S., Konishi, J. and Shibasaki, H., *Activities of the primary and supplementary motor areas increase in preparation and execution of voluntary muscle relaxation: an event-related fMRI study*. *J Neurosci*, 1999. **19**(9): p. 3527-34
131. Toxopeus, C.M., de Vries, P.M., de Jong, B.M., Johnson, K.A., George, M.S., Bohning, D.E., Walker, J. and Leenders, K.L., *Cerebral activation patterns related to initiation and inhibition of hand movement*. *Neuroreport*, 2007. **18**(15): p. 1557-60.10.1097/WNR.0b013e3282efa0a2
132. Nachev, P., Kennard, C. and Husain, M., *Functional role of the supplementary and pre-supplementary motor areas*. *Nat Rev Neurosci*, 2008. **9**(11): p. 856-69.10.1038/nrn2478
133. Orr, C. and Hester, R., *Error-related anterior cingulate cortex activity and the prediction of conscious error awareness*. *Front Hum Neurosci*, 2012. **6**: p. 177.10.3389/fnhum.2012.00177
134. Luu, P., Flaisch, T. and Tucker, D.M., *Medial frontal cortex in action monitoring*. *J Neurosci*, 2000. **20**(1): p. 464-9
135. Gehring, W.J. and Knight, R.T., *Prefrontal-cingulate interactions in action monitoring*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**(5): p. 516-20.10.1038/74899

136. Shackman, A.J., Salomons, T.V., Slagter, H.A., Fox, A.S., Winter, J.J. and Davidson, R.J., *The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(3): p. 154-67.10.1038/nrn2994
137. Playford, E.D., Jenkins, I.H., Passingham, R.E., Nutt, J., Frackowiak, R.S. and Brooks, D.J., *Impaired mesial frontal and putamen activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study*. Ann Neurol, 1992. **32**(2): p. 151-61.10.1002/ana.410320206
138. Jahanshahi, M., Jenkins, I.H., Brown, R.G., Marsden, C.D., Passingham, R.E. and Brooks, D.J., *Self-initiated versus externally triggered movements. I. An investigation using measurement of regional cerebral blood flow with PET and movement-related potentials in normal and Parkinson's disease subjects*. Brain, 1995. **118** (Pt 4): p. 913-33.10.1093/brain/118.4.913
139. Della Sala, S., Francescani, A. and Spinnler, H., *Gait apraxia after bilateral supplementary motor area lesion*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002. **72**(1): p. 77-85.10.1136/jnnp.72.1.77
140. Suzuki, Y., Kiyosawa, M., Mochizuki, M., Ishiwata, K. and Ishii, K., *The pre-supplementary and primary motor areas generate rhythm for voluntary eye opening and closing movements*. Tohoku J Exp Med, 2010. **222**(2): p. 97-104.10.1620/tjem.222.97
141. Oga, T., Honda, M., Toma, K., Murase, N., Okada, T., Hanakawa, T., Sawamoto, N., Nagamine, T., Konishi, J., Fukuyama, H., Kaji, R. and Shibasaki, H., *Abnormal cortical mechanisms of voluntary muscle relaxation in patients with writer's cramp: an fMRI study*. Brain, 2002. **125**(Pt 4): p. 895-903.10.1093/brain/awf083
142. Cramer Sc, W.R., Schaechter Jd et. al. , *Motor cortex activation is related to force of squeezing*. Hum Brain Mapp **2002**;**16**: p. 197–205
143. Koga, Y., Povalko, N., Inoue, E., Nakamura, H., Ishii, A., Suzuki, Y., Yoneda, M., Kanda, F., Kubota, M., Okada, H. and Fujii, K., *Therapeutic regimen of L-arginine for MELAS: 9-year, prospective, multicenter, clinical research*. J Neurol, 2018. **265**(12): p. 2861-2874.10.1007/s00415-018-9057-7
144. Nature., S.N.S.A.P.o.S. 2021 [cited 2021 09.05.]; Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00415-018-9057-7/tables/1>.

8. Publikációs jegyzék

Az értekezés témájához kapcsolódó tudományos folyóiratcikkek:

Lovadi, E ; Csereklyei, M ; Merkli, H ; Fülöp, K ; Sebők, A ; Karcagi, V ; Komoly, S ; Pál, E
Elevated FGF 21 in myotonic dystrophy type 1 and mitochondrial diseases MUSCLE & NERVE
55-: 4 pp. 564-569. , 6 p. (2017)

Folyóirat szakterülete: Neurology (clinical), helyzete: Q2, IF (év 2017): 2,496.

Tóth, A; Lovadi, E*; Komoly, S; Schwarcz, A; Orsi, G; Perlaki, G; Bogner, P; Sebők, A;
Kovács, N; Pál, E** et al. Cortical involvement during myotonia in myotonic dystrophy: an fMRI
study. Acta Neurologica Scandinavica 132: 1 pp. 65-72., 8 p. (2015)

**megosztott első szerzők; **megosztott utolsó szerzők;*

Folyóirat szakterülete: Neurology, helyzete: Q2., IF (év 2015): 2,559.

Kumulatív imapact factor (az értekezés témájához kapcsolódóan): 5,055

Kumulatív impact factor: 5,404

Az értekezés témájához kapcsolódó könyvfejezet:

Pal E, Lovadi E, Gati I, Merkli H, Komoly S. Muscle biopsy: Diagnostic value in suspected
myopathies. In: Washington, HS; Castillo, Jimenez CE (szerk.) Myopathies: : New Research
Hauppauge (NY), Amerikai Egyesült Államok : Nova Science Publishers (2012) pp. 57-74., 18 p.

Az értekezés témájához kapcsolódó tudományos előadások:

Lovadi E, Pál E, Sebők Á, Bajkó Z Hisztometriás mérések módszertana Dystrophia
Myotonicaban. Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem TDK Konferencia,
Marosvásárhely, 2011. március 27-30.

Nusser N, Sebők Á, Lovadi E Dystrophia myotonica-s betegek rehabilitációja a harkányi kórházban. Orvosi Rehabilitáció és Fizikális Medicina Magyarországi Társasága XXXIII. Vándorgyűlése, Szolnok, 2014. szeptember 4-6.

Az értekezés témájához kapcsolódó tudományos posztetek:

Lovadi E, Nusser N, Sebők Á, Pál E, Komplex gondozás és rehabilitáció Dystrophia Myotonicában. Magyar Ideg- és Elmeorvosok Társaságának XXXV Vándorgyűlése, Debrecen, 2012. november 22-24., 3. díj.

Lovadi E, Sebők Á, Nusser N, Komoly S, Pál E Összetett rehabilitáció dystrophia myotonicában. Magyar Neurológusok Társaságának XXXVI konferenciája, Eger, 2016. október 20-22.

Lovadi E, Nagy Sz, Sebők Á, Komoly S, Pál E Izomatropia kvantitatív MRI vizsgálata dystrophia myotonica (DM1) betegekben. Magyar Neurológusok Társaságának XXXVI konferenciája, Eger, 2016. október 20-22.

E. Pál, E. Lovadi, M. Csereklyei, Á. Sebők, S. Komoly FGF21: A biomarker of neuromuscular diseases. — WCN 2013, No: 2471, Topic: 7 — Neuromuscular disorders, Bécs, Ausztria, 2013. szeptember 21-26.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos folyóiratcikkek:

Lovadi E, Csécei P, Lovig Cs, Karádi Zs, Szapáry L Lipidek és az agyérbetegség – Új lehetőségek az LDL-koleszterin-szint csökkentésére. ORVOSI HETILAP 157 : 52 pp. 2059-2065. , 7 p. (2016)

Folyóirat szakterülete: klinikai és kísérletes orvostudomány, helyzete: Q3, IF (év2016):0,349

Az értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos előadások:

Lovadi E, Sárkány Á, Csécsei P, Verzár Zs, Szapáry L, Significance of hypertension in cerebrovascular diseases. ISHOP3 Third International Symposium on Hypertension Translational Medicine in Hypertension, Esszék, Horvátország, 2014. november 27-30.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos poszterek:

Lovadi E, Gyimesi Cs, Janszky J, Sebők Á, Illés Zs A „Nagy Imitátor”: Non-convulzív status epilepticus kapcsán felismert neurosyphilis. Magyar Ideg- és Elmeorvosok Társaságának XXXV Vándorgyűlése, Debrecen, 2012. november 22-24.,

Lovadi E, Csécsei P, Lovig Cs, Karádi Zs, Szapáry L Thalamus- Mesencephalon Ischaemia ritka klinikai megnyilvánulása. Magyar Neurológusok Társaságának XXXVI konferenciája, Eger, 2016. október 20-22.

Lovadi E, Csécsei P, Karádi Zs, Kasza G, Szapáry L A carotis endarterectomia korai postoperatív ellátása Stroke örzönkben. A Magyar Stroke Társaság XIII. Konferenciája és a Magyar Neuroszonológiai Társaság X. konferenciája, Győr, 2017. október 5-7.

Lovadi E, Csécsei P, Karádi Zs, Szólics A, Lenzsér G, Szapáry L Myocardialis infarctussal szövődött ébredési ischaemiás stroke revascularizációs kezelése. A Magyar Stroke Társaság XIII. Konferenciája és a Magyar Neuroszonológiai Társaság X. konferenciája, Győr, 2017. október 5-7.

Rozgonyi R, Lovadi E, Csécsei P, Faludi B Alvásvizsgálatok jelentősége thalamus és agytörzsi stroke-ban. A Magyar Stroke Társaság XIII. Konferenciája és a Magyar Neuroszonológiai Társaság X. konferenciája, Győr, 2017. október 5-7.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni azoknak, akik az utóbbi, több mint tíz évben segítettek tudományos és klinikai munkámat, tanácsaikkal, sokszor biztatásukkal.

Komoly Sámuel Professzor úrral még Marosvásárhelyen volt alkalmam találkozni, Ő azonnal nyitott és segítőkész volt, hogy nyári tanulmányutamat 2010-ben a Pécsi Neurológiai Klinikán tölthessem. Az akkor lefektetett alapok és új ismeretségek vezettek el a jelen dolgozat megírásához is. Első bizonytalan lépteimet Dr. Pál Endre és Dr. Sebők Ágnes segítették útmutatásukkal, hozzáértésükkel és megelőlegezett bizalmukkal, mely nem apadt el az évek során. Komoly Sámuel és Janszky József Professzor urak, valamint a Pécsi Neurológiai Klinika dolgozói mindvégig támogatták klinikai és tudományos előremeneteletem. Ezúton szeretném kifejezni hálámat és nagyrabecsülésemet irányukban is.

Családom támogatása, hite és bizalma, férjem Tibor segítsége nélkül e dolgozat, és az alapjául szolgáló tudományos munka szintén nem valósulhatott volna meg.

Végül, de nem utolsó sorban köszönet betegeinknek, akik sokszor több száz kilométeres utat tettek meg, hogy vizsgálatainkban részt vegyenek, és akik mindvégig feltétlen bizalmukkal ruházták fel kutatócsoportunkat. Szavaikból, hozzáállásukból mindannyian sokat tanultunk.

„A történelemben a véletlenek különös ajtókat tudnak kinyitni a jövőbe. És ha kinyílik egy ilyen ajtó, akkor be kell lépni rajta.”

Voltaire

ELEVATED FGF 21 IN MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1 AND MITOCHONDRIAL DISEASES

EMESE LOVADI MD,¹ MÁRTA CSEREKLYEI MD,¹ HAJNALKA MERKLI MD,¹ KRISZTINA FÜLÖP Bsc,² ÁGNES SEBŐK MD, PhD,¹ VERONIKA KARCAGI PhD,³ SÁMUEL KOMOLY MD, DSC,¹ and ENDRE PÁL MD, PhD¹

¹Department of Neurology, University of Pécs, Pécs, Rét u. 2, Hungary

²Neuropathology Unit, Department of Pathology, University of Pécs, Hungary

³Department of Molecular Genetics, National Institute of Environmental Health, Budapest, Hungary

Accepted 2 August 2016

ABSTRACT: *Introduction:* Human fibroblast growth factor 21 (FGF21) is a regulator of lipid and glucose metabolism. It is expressed in skeletal muscle and may be a sensitive and specific marker for mitochondrial diseases and other neuromuscular disorders. *Methods:* Serum FGF21 levels were determined in 71 human samples. Thirty patients with mitochondrial disease, 16 patients with myotonic dystrophy type 1 (DM1), 5 patients with facioscapulohumeral dystrophy, and 20 healthy controls were enrolled. *Results:* Serum FGF21 levels were significantly elevated in patients with progressive external ophthalmoplegia and DM1 compared with patients with facioscapulohumeral dystrophy, other types of mitochondrial diseases, and controls. In the mitochondrial disorder group, serum FGF21 levels were related to the number of ragged blue fibers. Significant insulin resistance was found in DM1 that might be responsible for FGF21 elevation. *Conclusions:* FGF21 elevation may be associated with certain types of mitochondrial disease, and it is influenced by insulin resistance.

Muscle Nerve 55: 564–569, 2017

Human fibroblast growth factor 21 (FGF21) is a 181 amino acid protein which belongs to the human FGF superfamily. Proteins in this family have diverse functions such as endocrine, paracrine, and intracellular functions. FGF21 is expressed in the liver, pancreas, white adipose tissue, thymus, and skeletal muscles. It is secreted in the plasma and binds to its receptor by means of a cofactor, β -Klotho, therefore, acting as a hormone.^{1–3}

FGF21 plays a central role in regulation of glucose and lipid metabolism as well as in adaptation to fasting. It suppresses hepatic glucose production and stimulates glucose uptake in adipocytes by means of the glucose transporter-1. The ability of FGF21 to decrease blood glucose levels is

independent of insulin. Similarly, FGF21 has beneficial effects on lipid metabolism, as it decreases plasma triglycerides, cholesterol, and free fatty acid levels.⁴

A significant elevation of plasma FGF21 levels was observed in obese rodents and humans, and FGF21 administration resulted in weight loss in diabetic nonhuman primates.⁵ FGF21 has a role in the adaptation to fasting, initiated by the peroxisome proliferator-activated receptor α .⁶ During fasting, FGF21 and growth hormone similarly induce lipolysis in white adipose tissue, while FGF21 provides feedback to control growth hormone secretion. Tynismaa et al. found increased expression of FGF21 in skeletal muscles in an animal model of mitochondrial disease.⁷ They also demonstrated elevated levels of circulating FGF21 in human mitochondrial diseases with skeletal muscle involvement.⁸ Other recent studies showed elevated blood FGF21 levels in patients with mitochondrial diseases compared with those with other neuromuscular diseases and healthy controls.^{9,10} These studies suggest that mitochondrial dysfunction may result in a starvation-like condition, and that in addition to the liver and brown adipose tissue, diseased skeletal muscle also seems to be able to secrete FGF21.^{7,11}

These studies suggest that FGF21 might be a specific and sensitive biomarker of mitochondrial disease. To test this hypothesis, we determined the serum levels of FGF21 in various neuromuscular diseases.

PATIENTS AND METHODS

Subjects. Thirty patients with mitochondrial disease, 16 patients with myotonic dystrophy type 1 (DM1), 5 patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD), and 20 healthy subjects were enrolled in this study. The study was approved by the Regional Ethical Committee (4581/2012). Written informed consent was obtained from each subject. Healthy subjects had no significant medical history, normal body mass index (BMI), were not receiving any medical treatment at the time, and did not take medications regularly. Patients and control subjects with abnormal BMI (<17 or >30) were excluded. DM1

Abbreviations: BMI, body mass index; CK, creatine kinase; COX, cytochrome-c oxidase; DM1, myotonic dystrophy type 1; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FGF21, fibroblast growth factor 21; FSHD, facioscapulohumeral muscular dystrophy; JMDRS, Japanese Mitochondrial Disease Rating Scale; HOMA-IR, homeostatic model assessment-insulin resistance; KSS, Kearns-Sayre syndrome; MELAS, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome; MERRF, myoclonic epilepsy with ragged red fibers; MIRAS, mitochondrial recessive ataxia syndrome; MNGIE, mitochondrial neuro-gastrointestinal encephalopathy; MRC, Medical Research Council; MRC-SUM, summarized MRC score; NMD, neuromuscular diseases; PEO, progressive external ophthalmoplegia; RBF, ragged blue fiber(s); RRF, ragged red fiber(s); SDH, succinate-dehydrogenase

Key words: biomarkers in NMD; FGF21; insulin resistance; mitochondrial diseases; myotonic dystrophy

Correspondence to: E. Pál; e-mail: pal.endre@pte.hu

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.
Published online 4 August 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/mus.25364

Table 1. Demographic data of healthy subjects and patients.*

	Control	Mitochondrial				DM1	FSHD
		MELAS	PEO	Myopathy			
N	20 (9/11)	5 (3/2)	15 (9/6)	10 (3/7)	16 (7/9)	5 (2/3)	
Age	45.9 ± 16.1	51.2 ± 23.8	59.6 ± 15.3	57.7 ± 9.6	50.9 ± 12.6	41 ± 12.3	
Onset	NA	41.2 ± 21.6	39.2 ± 23.1	47.1 ± 14	35.1 ± 15.9	30.4 ± 14.6	
BMI	26.0 ± 5.3	23.7 ± 6.5	26.3 ± 6.0	27.1 ± 8.1	27.1 ± 5.4	21.7 ± 2.6	
Diab.	0/20	0	3	2	3	0	

*Age and onset of symptoms expressed in years.

N, number of subjects (men/women); Diab., number of subjects with diabetes mellitus; NA, not applicable.

patients had a typical clinical history of myotonia and distal weakness, and the diagnosis was confirmed by genetic testing. The diagnosis of FSHD was established based on typical clinical manifestations and genetic tests. The mitochondrial group included patients with MELAS ($n = 5$) (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), progressive external ophthalmoplegia (PEO, $n = 15$, 1 of whom had Kearns-Sayre syndrome), and mitochondrial myopathy ($n = 10$). The diagnosis of mitochondrial disease was determined according to the criteria published in 2002.¹² Each patient underwent electromyography, muscle biopsy, and genetic testing. MELAS and PEO patients had a typical clinical presentation, typical muscle biopsy findings, and a point mutation or deletion(s) of mitochondrial DNA, respectively. The myopathic group included patients with mild proximal weakness or exercise intolerance with myopathic electromyography and mitochondrial alterations revealed by muscle biopsy. Genetic testing of patients with myopathy revealed a deletion in 5, a point mutation of mitochondrial DNA in 3, and was negative in 2.

Methods. All patients underwent detailed general and neurological examinations. Blood tests were performed for electrolytes, renal and hepatic function, sedimentation rate, complete blood count, creatine kinase (CK), lactate, and thyroid stimulating hormone levels. Blood was drawn every day at the same time (8:00 AM, after overnight fasting), and the serum was isolated and stored at -80°C until the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test was performed. The patients were asked to avoid any unusual dietary intake or physical activity the day before blood was drawn.

The HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance) index was calculated in mitochondrial and DM1 patients to investigate the presence of insulin resistance. $\text{HOMA-IR} = \text{fasting blood glucose (mmol/L)} \times \text{fasting serum insulin (pmol/L)} / 156$ (normal value: < 4).¹³

MRC-SUM. A summarized Medical Research Council (MRC) score (MRC-SUM) was used to quantify muscle weakness. The total score was calculated by adding the individual scores of neck flexors and extensors, plus 15 additional limb muscles bilaterally, assessed according to the MRC grading system.

JMDRS. A modified form of the Japanese Mitochondrial Disease Rating Scale (JMDRS) was used to assess systemic involvement of the disease.¹⁴ This scale comprises several items: daily activities (speaking, swallowing, writing, slicing food, dressing, hygiene, falling, and paroxysmal events), motor functions (worst MRC grade, coordination, walking, and moderate and vigorous physical activities), sensory alterations (vision, hearing), endocrine, cardiac and renal function, and cognitive performance. For this study, a rating of ocular movement was also added to the scale (0, none; 1, ptosis with normal eye movement; 2, ptosis with mild limitation of eye movement; 3, moderate limitation of eye movement; 4, severe limitation of eye movement or double vision; 5, complete external ophthalmoplegia).

Muscle Biopsy. Muscle biopsy was performed in each patient, usually from the deltoid muscle. Histological evaluation of samples was performed by a neuropathologist (E.P.) according to international standards in the Neuropathology Laboratory of the Pathology Department, University of Pécs. Histological examination included hematoxylin and eosin, modified Gomori trichrome, oil red O, periodic acid Schiff, ATPase, nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase, SDH (succinate-dehydrogenase), COX-SDH (cytochrome-c oxidase plus SDH), acid and alkaline phosphatase, and a standard immunohistochemical battery to exclude other frequent types of muscular dystrophy (dystrophin, dysferlin, alpha, beta, gamma, and delta-sarcoglycan, desmin, and alpha-dystroglycan). Mitochondrial accumulation was assessed by the frequency of increased subsarcolemmal Gomori trichrome staining as follows: (1) present in occasional ($< 10\%$)

fibers; (2) mild (present in 10–20% of fibers); (3) moderate (present in 20–50% of fibers); (4) severe (present in >50% of fibers); (5) present in almost all fibers. The percentage of ragged blue fibers (RBF) was assessed on the SDH slides.

Genetic Tests. Mitochondrial DNA testing (multiple PCR, long-range PCR, sequencing) was carried out using DNA from muscle samples (Dept. of Rare Diseases, Semmelweis University, Budapest) and in certain cases from blood (Dept. of Genetics, University of Pécs, Hungary). The diagnosis of FSHD and DM1 was established by Southern blot analysis using a p13E-11 or p5B1.4 probe, respectively (Dept. of Molecular Genetics, National Institute of Environmental Health, Budapest, Hungary).

ELISA. The serum level of FGF21 was determined in duplicate using a commercial Quantikine ELISA kit (R&D Systems Inc). Serum concentration of FGF21 (pg/ml) was calculated according to the manufacturer's recommendations. The ELISA test was performed by E.L. and M.C. in a blinded manner.

Statistical Analysis. Statistical tests were performed using SPSS software, v19 (IBM Co., Armonk, New York). The comparison of serum FGF21 levels and other quantitative clinical data in patients versus healthy subjects was carried out by nonparametric tests (Mann-Whitney *U*-test and analysis of variance). Pearson correlation analysis was applied to reveal associations between FGF21 levels and clinical data. The level of statistical significance was set at 0.05.

RESULTS

Patient Characteristics. FGF21 levels were determined in 71 samples (20 healthy subjects and 51 patients). The demographic data of patients and healthy controls are summarized in Table 1. The mean age of healthy controls and patients with mitochondrial disease, DM1, and FSHD was statistically comparable.

The BMI of control subjects and patients was within the range of 18–30. Subjects with a BMI of <17 or >30 were excluded, because the serum concentration of FGF21 was found to be closely related to BMI in healthy controls ($r = 0.75$; $P = 0.0005$). No significant correlation was found between BMI and FGF21 in all patient subgroups.

Clinical Data. Although there were differences in the clinical picture and muscle involvement between the different disease groups, the MRC-SUM was comparable.

JMDRS was used to assess the severity of skeletal muscle and other organ involvement in mitochondrial diseases. JMDRS was found to be

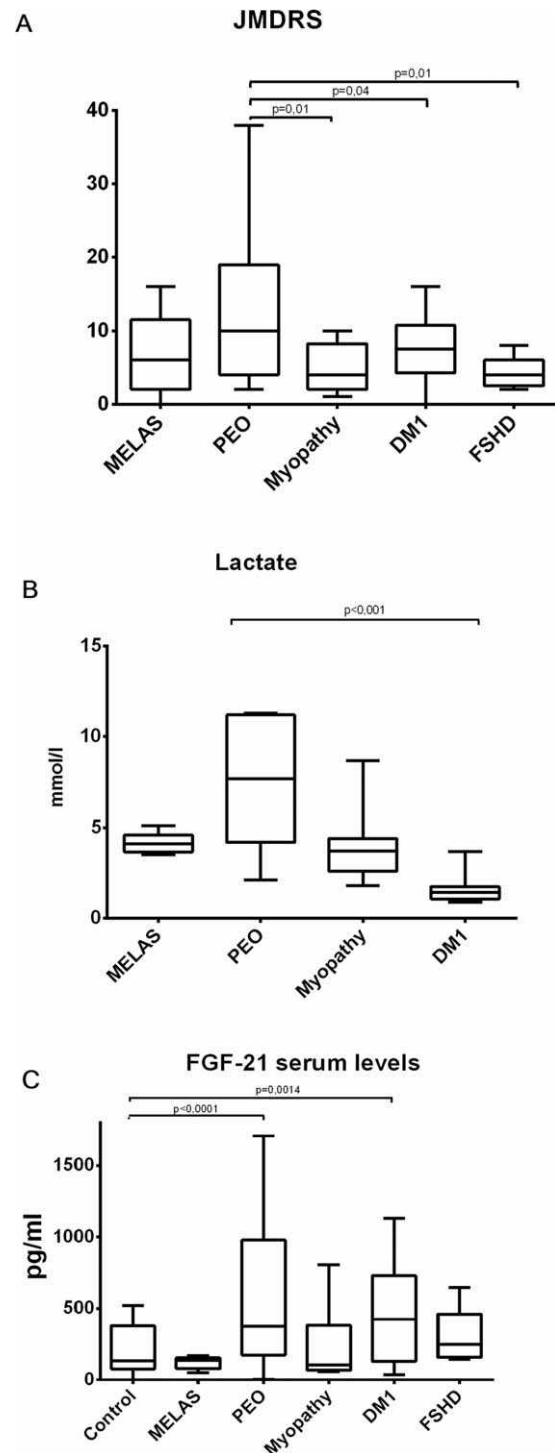


FIGURE 1. Clinical data of healthy controls and neuromuscular patients. JMDRS score (A) and serum lactate levels (B) were the highest in the PEO group. Serum fibroblast growth factor 21 (FGF21) levels (C) were significantly higher in patients with PEO or DM1 (myotonic dystrophy type 1) compared with healthy controls. Boxplots indicate mean (25 and 75 percentile) and min–max values. Levels of significance are highlighted.

significantly higher in PEO than in mitochondrial myopathy, DM1, and FSHD, but not compared with MELAS (Fig. 1A).

Table 2. Mitochondrial alterations in muscle histology.*

	Control	Mitochondrial				
		MELAS	PEO	Myopathy	DM1	FSHD
Diffuse	NA	2.8 ± 1.3	2.9 ± 1.3	2.9 ± 1.6	0.8 ± 2	0
RBF (SDH)	NA	7.4 ± 11.9*	10.8 ± 13.9*	6.2 ± 15.7*	0.27 ± 0.57	0.03 ± 0.05
COX ⁻ fibers	NA	3.2 ± 4.5	16.6 ± 16.5*	1.0 ± 0.7	0.5 ± 0.7	0.03 ± 0.05
COX ⁺ RBF	NA	8.2 ± 13.3*	3.3 ± 2.5	15.7 ± 25.4*	0	0

*Data are shown as mean ± SD of percentages. *significant differences ($p < 0.05$).

Diffuse, diffuse mitochondrial accumulation; NA, not applicable; MELAS, mitochondrial encephalopathy lactic acidosis and stroke; PEO, progressive external ophthalmoplegia; DM1, myotonic dystrophy, type 1; RBF, ragged blue fibers; SDH, succinate dehydrogenase; COX, cytochrome-1 oxidase.

Biochemical and pathological assessment. CK levels varied from normal (up to 200 U/L) to moderately elevated. No significant difference was found between the analyzed groups. Serum lactate levels were higher in mitochondrial patients compared with patients with DM1 especially in the PEO group (Fig. 1B). Serum FGF21 levels were comparable in healthy controls and in patients with MELAS or mitochondrial myopathy and slightly elevated in FSHD patients. Circulating FGF21 levels were significantly higher in PEO (589.5 ± 496.4 [mean ± SD]; range, 5.2–1705.7) and in DM1 patients (424.9 ± 328.5 [mean ± SD]; range, 36.5–1130.9), than in healthy controls (Fig. 1C).

The HOMA-IR index was significantly higher in patients with DM1 than in the mitochondrial group ([mean ± SD] 6.13 ± 4.86 and 1.80 ± 1.2 , respectively, $P = 0.012$).

The mean percentage of RBF in SDH samples was high in each group of mitochondrial patients, as expected. The absence of cytochrome-c enzyme activity (percentage of COX⁻ fibers) was characteristic of mitochondrial diseases and it was most prominent in PEO biopsies ($P < 0.03$). Interestingly, low percentages of COX⁻ RBFs were present in DM1 samples and occasionally in FSHD biopsies as well. RBFs with increased COX activity (COX⁺ RBF) were characteristic of MELAS and mitochondrial myopathy (Table 2).

Correlations. In the mitochondrial group, FGF21 levels were closely related to lactate levels ($r = 0.69$; $P = 0.0008$) and the percentage of RBF, a histological marker ($r = 0.44$; $P = 0.03$). Subgroup analysis revealed a much stronger correlation between FGF21 and lactate levels and the percentage of RBF in the PEO group. Furthermore, FGF21 levels were found to be related to JMDRS as well (Fig. 2).

FGF21 levels did not differ between genders and were not related to age.

No correlation was found between FGF21 concentrations and muscle weakness (MRC-SUM) or CK levels. HOMA-IR was not related to any clinical or biochemical parameter in any group.

DISCUSSION

These results show that, although FGF21 is elevated in mitochondrial diseases, its level varies significantly between mitochondrial syndromes. FGF21 levels were found to be almost normal in MELAS and in mitochondrial myopathy, but they were significantly elevated in PEO. Although our results confirm the recent finding of high serum FGF21 levels in PEO, we failed to demonstrate the same alteration in patients with isolated myopathy. The reason is not clear, but there are several potential explanations: (1) the severity of muscle involvement might have differed from that reported in previous studies (our patients had

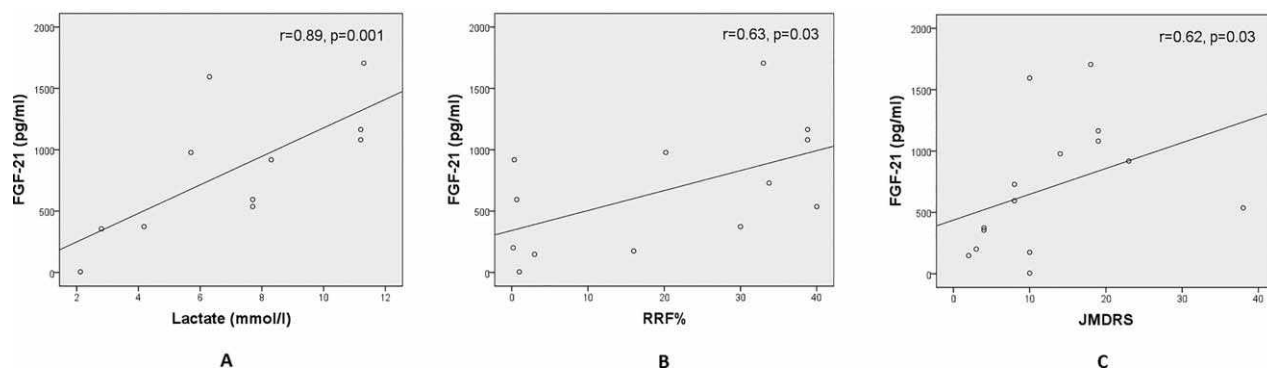


FIGURE 2. Correlation of circulating FGF21 levels with biochemical, histological, and clinical parameters in patients with PEO. Serum FGF21 levels showed close correlation with serum lactate levels (A), the percentage of RBF in muscle biopsy samples (B), and JMDRS (C).

mild myopathy or exercise intolerance without severe weakness), (2) we excluded overweight patients to avoid the previously demonstrated¹⁵ secondary effect of obesity on circulating FGF21 levels, which we confirmed as well. (3) The Suomalainen et al. finding of high FGF21 levels in patients with mitochondrial myopathy might reflect the high prevalence of diabetes mellitus in this group.⁸

Our results confirm the findings of previous studies in which serum FGF21 levels were related to the involvement and severity of mitochondrial damage in patients with myopathy. Davis et al. found a correlation between proximal muscle weakness and FGF21 levels.¹⁰ Our results did not reveal a significant correlation between FGF21 levels and degree of muscle weakness. FGF21 levels were found to be related to the amount of RBFs, a histological hallmark of mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. Suomalainen et al. demonstrated a relationship between FGF21 levels and the amount of COX⁻ fibers⁸ which was similar but not significant in our study.

As for mitochondrial disorders, FGF21 levels seem to be mostly normal or slightly elevated in patients with Leber hereditary optic neuropathy, MELAS, mitochondrial recessive ataxia syndrome (MIRAS), and in moderate mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy (MNGIE) but significantly elevated in those with PEO, KSS (Kearns-Sayre syndrome), and myoclonic epilepsy with ragged red fiber (MERRF), corresponding to the severity of skeletal muscle involvement.^{8,9}

We confirmed the close correlation between FGF21 concentrations and levels of lactate. Both were shown to be a helpful biomarker only in PEO and not in other types of mitochondrial diseases. According to Davis et al. FGF21 is a more sensitive biomarker of mitochondrial diseases than CK or lactate.¹⁰ Our results confirmed the previous findings that the presence of RBFs and COX⁻ fibers in muscle samples are characteristic of PEO, and COX⁺ RBFs for MELAS (Table 2).¹⁶ The amount of COX⁻ fibers was related to FGF21 (Fig. 2). We found normal FGF21 levels in patients with FSHD in accordance with the findings in the histological samples, where mitochondrial changes/dysfunction were marginal.

FGF21 elevation in DM1 was the most important finding of this study. The explanation for this finding might be the well-known presence of insulin resistance due to the altered splicing of the insulin receptor.¹⁷ FGF21 levels were previously found to be elevated in conditions associated with insulin resistance.^{15,18} This hypothesis is supported by the finding that insulin resistance (HOMA-IR) was significantly higher in DM1 than in mitochondrial patients. The second possible explanation

might be the presence of mitochondrial dysfunction in DM1. As Table 2 shows, mitochondrial alterations (RBFs and COX⁻ fibers) are not rare in biopsy samples obtained from DM1 patients, therefore, this (secondary) mitochondrial dysfunction may partially contribute to FGF21 production and elevated FGF21 serum levels in DM1.

Unfortunately, we were not able to demonstrate a correlation between serum FGF21 levels and mitochondrial alterations or clinical severity in DM1 patients. Thus, insulin resistance seems to play a more important role in contributing to FGF21 elevation than mitochondrial dysfunction in DM1 patients. In a previous study by Suomalainen et al., DM1 patients were also included as controls; normal serum FGF21 levels were found, but there was no mention of BMI and muscle histology in this population.⁸

In summary, our study, similar to recent publications, supports the hypothesis that the serum level of FGF21 is related to mitochondrial dysfunction. Our results suggest possible differences between subgroups/mitochondrial syndromes with regard to FGF21 serum levels. Further studies are necessary to analyze the relationship between FGF21 levels, phenotype, and the severity of muscle involvement. Both primary and secondary mitochondrial dysfunction in skeletal muscles might lead to FGF21 production. Insulin resistance should be taken into consideration during the assessment of FGF21 levels in neuromuscular disorders.

Authors report no financial disclosure and no conflict of interests. The authors express their gratitude to all patients included in this study. Additionally, we thank to Atiláné Pál for drawing and handling the blood samples, to Mária Judit Molnár and Anikó Gál (Dept. of Rare diseases, Semmelweis University, Budapest) and to Béla Melegh (Dept. of Genetics, University of Pécs, Hungary) for performing genetic tests.

REFERENCES

1. Cuevas-Ramos D, Aguilar-Salinas CA, Gomez-Perez FJ. Metabolic actions of fibroblast growth factor 21. *Curr Opin Pediatr* 2012;24:523–529.
2. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:235–253.
3. Angelin B, Larsson TE, Rudling M. Circulating fibroblast growth factors as metabolic regulators—a critical appraisal. *Cell Metab* 2012;16:693–705.
4. Iglesias P, Selgas R, Romero S, Diez JJ. Biological role, clinical significance, and therapeutic possibilities of the recently discovered metabolic hormone fibroblastic growth factor 21. *Eur J Endocrinol* 2012;167:301–309.
5. Reinehr T, Woelfle J, Wunsch R, Roth CL. Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) and its relation to obesity, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver in children: a longitudinal analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2143–2150.
6. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR alpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 2007;5:426–437.
7. Tyynismaa H, Carroll CJ, Raimundo N, Ahola-Erkkila S, Wenz T, Ruhanen H, et al. Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Hum Mol Genet* 2010;19:3948–3958.
8. Suomalainen A, Elo JM, Pietiläinen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol* 2011;10:806–818.

9. Su SL, Wang WF, Wu SL, Wu HM, Chang JC, Huang CS, et al. FGF21 in ataxia patients with spinocerebellar atrophy and mitochondrial disease. *Clin Chim Acta* 2012;414:225–227.
10. Davis RL, Liang C, Hildebrand FE, Riley C, Needham M, Sue CM. Fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker of mitochondrial disease. *Neurology* 2013;81:1819–1826.
11. Kim KH, Jeong YT, Oh H, Kim SH, Cho JM, Kim YN, et al. Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat Med* 2013;19:83–92.
12. Bernier FP, Bonch A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002;59:1406–1411.
13. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E15–E26.
14. Yatsuga S, Povalko N, Nishioka J, Katayama K, Kakimoto N, Matsuishi T, et al. MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:619–624.
15. Cheng X, Zhu B, Jiang F, Fan H. Serum FGF-21 levels in type 2 diabetic patients. *Endocr Res* 2011;36:142–148.
16. Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 2001;29:40–47.
17. Vogel H. Mitochondrial myopathies and the role of the pathologist in the molecular era. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:2017–227.
18. Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam KSL. Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin Endocrinol* 2013;78:486–496.

Cortical involvement during myotonia in myotonic dystrophy: an fMRI study

Toth A, Lovadi E, Komoly S, Schwarcz A, Orsi G, Perlaki G, Bogner P, Sebok A, Kovacs N, Pal E, Janszky J. Cortical involvement during myotonia in myotonic dystrophy: an fMRI study.

Acta Neurol Scand 2015; 132: 65–72.

© 2015 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

Objective – Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a common adulthood muscular dystrophy, characterized by muscle wasting, myotonia, and multisystemic manifestations. The phenomenon of involuntary muscle contraction during myotonia offers a unique possibility of investigating brain motor functions. This study explores cortical involvement during grip myotonia in DM1. **Materials and methods** – Sixteen DM1 patients were enrolled in the study. Eight patients had apparent grip myotonia, while eight patients did not (control subjects). All patients underwent functional MRI grip task examination twice: prior a warm-up procedure (myotonia was elicited in patients with apparent grip myotonia) and after a warm-up procedure (myotonia was attenuated in patients with apparent grip myotonia). No myotonia was elicited during either examination in patients without apparent grip myotonia. Cerebral blood oxygen level-dependent (BOLD) signals were compared both between groups with and without apparent myotonia, and between pre- and post-warm-up sessions. **Results** – Significantly higher BOLD signal was found during myotonia phase in patients with apparent grip myotonia compared to corresponding non-myotonia phase of patients without apparent grip myotonia in the supplementary motor area and in the dorsal anterior cingulate cortex. Significant differences in BOLD signal levels of very similar pattern were detected between prewarm-up session myotonia phase and post-warm-up session myotonia absent phase in the group of patients with apparent grip myotonia. **Conclusion** – We showed that myotonia is related to cortical function in high-order motor control areas. This cortical involvement is most likely to represent action of inhibitory circuits intending motor termination.

**A. Toth^{1,*}, E. Lovadi^{1,*},
S. Komoly¹, A. Schwarcz^{2,3},
G. Orsi^{3,4}, G. Perlaki^{3,4}, P.
Bogner^{2,4}, A. Sebok¹, N. Kovacs^{1,3},
E. Pal^{1,**}, J. Janszky^{1,3,**}**

¹Department of Neurology, University of Pécs, Pécs, Hungary; ²Department of Neurosurgery, University of Pécs, Pécs, Hungary; ³MTA-PTE Clinical Neuroscience MR Research Group, Pécs, Hungary; ⁴Diagnostic Center of Pécs, Pécs, Hungary

Key words: motor control; myotonia; myotonic dystrophy; fMRI

A. Tóth, Department of Neurology, University of Pécs, H-7623 Pécs, Rét u. 2., Hungary
Tel.: +36 72 535 900
Fax: +36 72 535 911
e-mail: prsarn@gmail.com

*These authors contributed equally in first authorship.

**These authors contributed equally in last authorship.

Accepted for publication November 11, 2014

Introduction

Myotonic dystrophy type 1 (DM1, Steinert's disease, 1909) is the most common form of muscular dystrophy with a prevalence of 1:8000 individuals worldwide (1).

The disease is characterized by involuntarily sustained muscle contraction that can be often recognized clinically as inability in releasing hand grip (grip myotonia) and can be detected in all patients by electromyography. Myotonia can be gradually attenuated by exercise that is called 'warm-up' phenomenon (2).

The precise mechanisms underlying both myotonia and the warm-up phenomenon are unclear.

The symptom of myotonia itself seems to originate from muscle chloride ion channel abnormality (3). However, DM1 is a multisystemic disease affecting numerous elements of central nervous system. A wide range of structural brain abnormalities are known to be present in DM1, including most importantly white matter disease and atrophy (4, 5). Functional alteration was also found in DM1 by a functional MRI study; the results implied accelerated aging of the brain (6).

Considering the multiplex disturbance of the neuromuscular axis featuring DM1, brain involvement during myotonia is yet unknown. We hypothesized that during myotonia of a primarily muscular origin, compensational mechanisms are

activated in the brain. However, it can not be excluded that the brain is at least in part involved in maintaining myotonia.

The aim of this study was to explore brain areas activated during myotonia by functional MRI. We established a ‘grip task’ that was performed prior and after a warm-up procedure, both by DM1 patients with apparent and non-apparent myotonia to specifically assess neural mechanisms underlying myotonia.

Materials and methods

Subjects

Sixteen patients (nine female and seven male, age 31–60 years) with the diagnosis of DM1 were enrolled in the study. Diagnosis was based on clinical features and electromyographic evidence of myotonia. All cases were genetically confirmed (Southern blot with p5B1.4 probe, Department of Molecular Genetics, National Institute of Environmental Health, Budapest, Hungary). Exclusion criteria were history of alcohol abuse, substance dependence, severe cognitive decline (mini-mental state examination <25 of 30 points) and MRI incompatibility. All patients were right-handed according to Edinburgh Handedness Inventory (EHI) (7). Clinical data of the patients are shown in Table 1. All subjects gave a written informed consent under a protocol approved by the local ethical committee (4512/2012). Each patient underwent detailed internal and neurological exams, blood test including routine parameters, thyroid stimulating hormone, creatine kinase and electromyography (EMG). Muscle strength was recorded using five-step Medical Research Council (MRC) Scale for Muscle Strength and was converted into a 10-point scale for statistical analysis (MRC sum). Twenty-four muscles (upper/lower limb, proximal, and distal) were examined in a blinded fashion (EL).

Subjects were divided into two subgroups: ‘DM/myotonia+’ group that involved patients

with clinically apparent grip myotonia; and ‘DM/myotonia–’ group as control group that involved DM1 patients as well, however, with subclinical myotonia (myotonia present on EMG, but can be not recognized on physical examination). Both groups consisted of eight patients. The reason for choosing such control group (instead of a control group including healthy subjects) was to avoid non-myotonia-specific fMRI differences that might be present when comparing DM1 patients to healthy subjects (6). Furthermore, to exclude possible disturbing factors arising from DM1 severity difference, clinical parameters were compared between the two groups using Mann–Whitney *U* test, see Table 1.

Imaging

Both structural imaging and functional imaging were performed. Structural imaging included high-resolution T1- and T2-weighted imaging to assess structural abnormalities (for details see below). Functional imaging included three examinations using the following protocol:

1. Prewarm-up examination: First, all patients (of both DM/myotonia+ and DM/myotonia– groups) underwent functional imaging using ‘grip task’ (see below), where grip myotonia was triggered in the DM/myotonia+ group.

Then, all patients performed ‘warm-up’ exercise (repeated opening and closing of hand) as long as needed for maximal possible attenuation of myotonia (1.5 min on average) and 1.5 min for DM/myotonia– patients, staying in scanner.

2. Post-warm-up examination: Immediately after this, functional imaging using grip task was repeated; however, this time, myotonia was not expected to occur due to warm-up.

Figure 1 illustrates arrangement of pre- and post-warm-up examinations.

3. All patients underwent passive hand movement task to monitor possible non-specific

Table 1 Clinical characteristics of patients

	Gender (F/M)	Age (year)	Dis. duration (year)	Onset of myotonia (year)	MRC sum
DM/Myotonia+ ¹ (<i>n</i> = 8)	5/3	48.33 ± 8.33 (31–60)	15.22 ± 10.37 (5–39)	33 ± 9.84 (18–44)	459.0 ± 40.34 (383–516)
DM/Myotonia– ² (<i>n</i> = 8)	4/4	47.29 ± 8.14 (39–58)	22.14 ± 5.46 (15–29)	24.86 ± 6.12 (17–34)	454.7 ± 34.61 (387–492)
All patients (<i>n</i> = 16)	9/7	47.88 ± 7.99 (31–60)	18.25 ± 9.04 (5–39)	29.44 ± 9.16 (17–44)	457.1 ± ±36.77 (383–516)

Data are shown as mean ± SD (min–max). MRC sum: Summary of MRC scores of 24 muscles assessed in a 10-point scale. There were no statistically significant differences between groups (Mann–Whitney *U* test, *P* > 0.05).

¹Myotonic dystrophy patients with apparent grip myotonia

²Myotonic dystrophy patients without apparent grip myotonia.

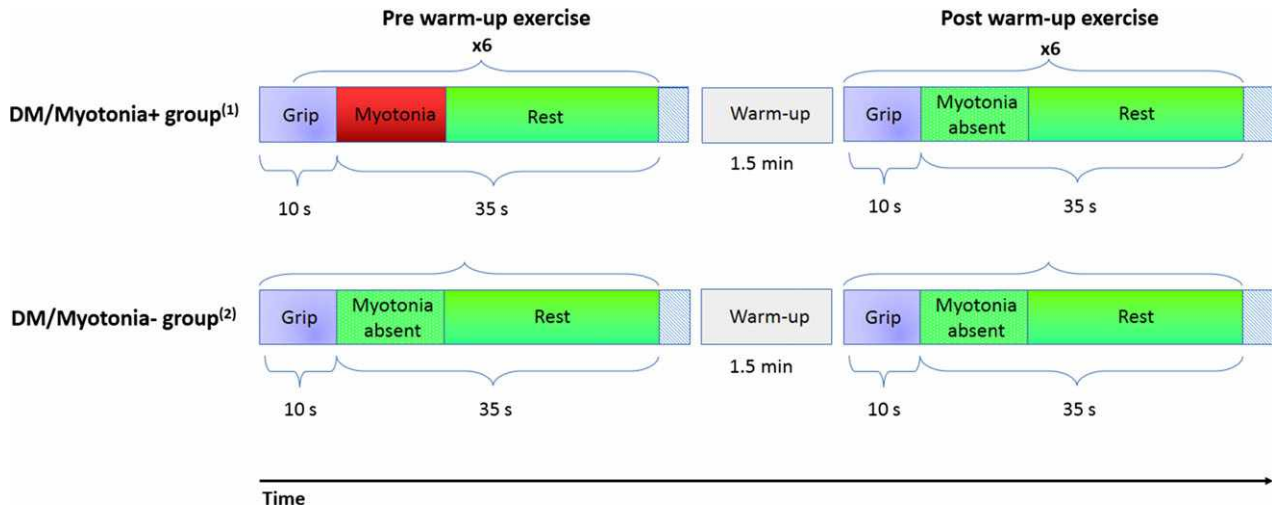


Figure 1. Arrangement of pre- and post-warm-up examinations. (1) Myotonic dystrophy patients with apparent grip myotonia; (2) myotonic dystrophy patients without apparent grip myotonia. Grip: left-hand grip; warm-up: repeated opening and closing of left hand as long as needed for maximal possible attenuation.

(myotonia independent) activation differences in the sensorymotor network.

Prewarm-up examination – Blocks were introduced by relevant single words using a headphone designed especially for fMRI (NordicNeuroLab, Bergen, Norway). The proper sound volume was adjusted before the examination. The task was thoroughly explained to the participants before scanning.

Task design was made up of six repetitions of the following consecutive blocks (a 30-s rest period introduced the first block):

1. Grip block: Patients performed grip in left hand. This block was introduced by the word ‘grip’ and lasted for 10 s.
2. Post-grip block (‘myotonia’ condition in DM/myotonia+ group, ‘myotonia absent’ condition in DM/myotonia– group): This block was introduced by the word ‘release’; however, DM/myotonia+ patients were not expected to be able to immediately release their grips; instead of that, myotonia phenomenon was expected to occur. Patients were told not to force relaxation, but let myotonia spontaneously pass. Duration of the triggered myotonia was considered as time until complete hand relaxation and was recorded at each block by examiner’s (dr. Lovadi) direct visual inspection.
3. Rest (baseline) block: Time left between grip blocks lasted 35 s; that is, rest block lasted 35 s minus post-grip block duration.

To avoid disturbing effects of visual processing and linked functions, patients were told to keep eyes closed during the entire acquisition.

Post-warm-up examination – The post-warm-up examination was executed in the same way as the prewarm-up –examination; however, due to the preceding ‘warm-up’ exercise, no myotonia was expected to occur (‘myotonia absent’ conditions in both DM/myotonia+ and DM/myotonia– groups).

Passive hand movement task – Passive hand movement task started with a 30 s rest period then included five repeated blocks of passive hand movement (investigator performed opening and closing movement on the patient’s left-hand fingers while patient was told not to counteract) and resting state, both lasting 30 s.

Image acquisition parameters

Image acquisition was performed on a 3T Magnetom TIM Trio human whole-body MRI scanner (Siemens AG, Erlangen, Germany) with a standard 12-channel head coil.

T1-weighted high-resolution images were obtained using a three-dimensional (3D) MPRAGE sequence (TR/TI/TE = 1900/900/3.41 ms; Flip Angle = 9°; 160 axial slices; slice thickness = 0.94 mm; no interslice gap; FOV = 210 × 240 mm²; matrix size = 224 × 256; receiver bandwidth = 180 Hz/pixel).

T2-weighted images were acquired using a turbo spin echo sequence (TR/TE = 6000/93 ms; Flip Angle = 120°; 30 sagittal slices; slice thickness = 4 mm; 0.8 mm interslice gap; FOV = 193 × 220 mm²; matrix size = 280 × 320; receiver bandwidth = 220 Hz/pixel).

Functional images were acquired using a standard 2D spin echo EPI sequence, with the following parameters: TR/TE = 2000/36 ms; flip angle = 83°; 23 axial slices; slice thickness = 4 mm; no interslice gap; FOV = 210 × 210 mm²; matrix size = 92 × 92; receiver bandwidth = 1359 Hz/pixel. Interleaved slice order was applied to avoid crosstalk between contiguous slices. A total of 150 volumes were acquired in 300 s.

Subjects were positioned supine in the scanner. Foam cushioning was used to immobilize the head within the coil to minimize motion degradation.

Data analysis

Preprocessing and statistical analysis were performed using FMRI Expert Analysis Tool (FEAT) Version 5.98, part of FMRIB's Software Library (FSL, www.fmrib.ox.ac.uk/fsl). Preprocessing included BET brain extraction (8), MCFLIRT motion correction (9), spatial smoothing with 5 mm full width at half maximum, and high-pass temporal filtering with 100s cutoff. The temporal filtering applied to the data was used for the model as well. Whole-brain general linear model (GLM) time series statistical analyses of individual data sets were carried out using FMRIB's Improved Linear Model (FILM) with local autocorrelation correction (10). To model the blood oxygen level-dependent (BOLD) response, a boxcar function with 'grip', 'myotonia' or 'myotonia absent,' and 'rest' conditions was convolved with the FSL's canonical gamma hemodynamic response function (HRF).

In DM/myotonia+ group, timings of myotonia and rest conditions were adjusted for each patient depending on the duration of observed myotonia. These timings were not only used for the pre-warm-up examination 'myotonia' condition, but for the post-warm-up 'myotonia absent' condition as well for each patient separately, to be afterward able to directly compare activations during these conditions.

For the examinations of DM/myotonia- group patients, 'grip', 'myotonia absent,' and 'rest' conditions were used, to be able to compare the myotonia condition of the DM/myotonia+ group with the myotonia absent condition of the DM/myotonia- group. Myotonia absent condition timing was set to 5 s as the average time of myotonia conditions was 5 s.

Statistical analyses were carried out in native EPI space. First-level statistic maps were registered into standard space using a three-step

process. First, low-resolution fMRI data from each subject were registered to that subject's (brain-extracted) high-resolution T1-weighted structural image (seven degrees-of-freedom linear fit); then, the high-resolution image was registered to the MNI152 standard brain image (12 degrees-of-freedom linear fit) using FLIRT (9). Subsequently, the registration from structural image to the standard space was further refined using FNIRT nonlinear registration (11, 12). The resulting linear and nonlinear deformations were combined mathematically and applied to the first-level statistic maps to take them into standard space. Interpolation was only used for the final step, not in the registration calculations.

To carry out groupwise statistics, the first-level FEAT data were fed into second-level analysis in FEAT. Mixed effects (ME) higher modeling was applied as ME does model the session/subject variability, and it therefore allows inference to be made about the wider population from which the sessions/subjects were drawn. For the most accurate estimation of higher-level activation, the option FMRIB's Local Analysis of Mixed Effects (FLAME) with both stages (FLAME 1 + 2) was carried out. This option includes a full Markov Chain Monte Carlo sampling (MCMC)-based analysis of near-threshold voxels that is advantageous at small sample sizes ($n < 10$).

The following groupwise comparisons were carried out:

A: Prewarm-up examination conditions vs post-warm-up examination conditions (intrasubject analysis, i.e., prewarm-up grip vs post-warm-up grip condition; prewarm-up myotonia vs post-warm-up myotonia absent condition). Extraction-based contrast maps were calculated using paired *t*-test design. The comparisons of pre- and post-warm-up examination conditions were performed in the DM/myotonia- group as well to reveal if repetition or fatigue in itself had an effect on BOLD response.

B: Prewarm-up examination conditions of DM/myotonia+ group vs prewarm-up conditions of DM/myotonia- group (intersubject analysis, i.e., DM/myotonia+ group grip vs DM/myotonia- group grip condition; DM/myotonia+ group myotonia vs DM/myotonia- group myotonia absent condition). Extraction-based contrast maps were calculated using unpaired *t*-test design.

Passive hand movement tasks were compared between myotonia and control groups using extraction-based contrast maps with unpaired *t*-test design.

Results

Structural imaging

Patients showed mild, non-specific alterations on structural images, such as general atrophy, ventricular enlargement, occasionally white matter lesions, hyperostosis, and dilated Virchow–Robin spaces. However, no gross deformation-disabling image registrations was found.

Functional imaging

All patients in DM/myotonia+ group presented myotonia lasting for at least 3 s (average 5 s, max. 12 s) during prewarm-up examination after each grip. During the post-warm-up examination, no myotonia was observed lasting for more than 1 s. Myotonia was not seen in the DM/myotonia– group during either grip task.

A: Prewarm-up examination vs post-warm-up examination (intrasubject analysis) – DM/

Myotonia+ group – Significantly ($P < 0.05$, $Z > 2.3$) higher BOLD signal was found during the prewarm-up examination in myotonia condition than during the post-warm-up myotonia absent condition, in the supplementary motor area (SMA) and in the dorsal anterior cingulate cortex (dACC) (see contrast image on Fig. 2, cluster details in Table 2.). No significant difference was found in grip condition BOLD signals.

DM/Myotonia– group – No significant difference in BOLD signal was found between pre- and post-warm-up conditions.

B: Prewarm-up conditions of DM/myotonia+ group vs prewarm-up conditions of DM/myotonia– group (intersubject analysis) – Significantly ($P < 0.05$, $Z > 2.3$) higher BOLD signal was found in the DM/myotonia+ group in myotonia condition than in the DM/myotonia– group myotonia absent condition, in the SMA and in the dorsal anterior cingulate cortex (dACC) (see contrast

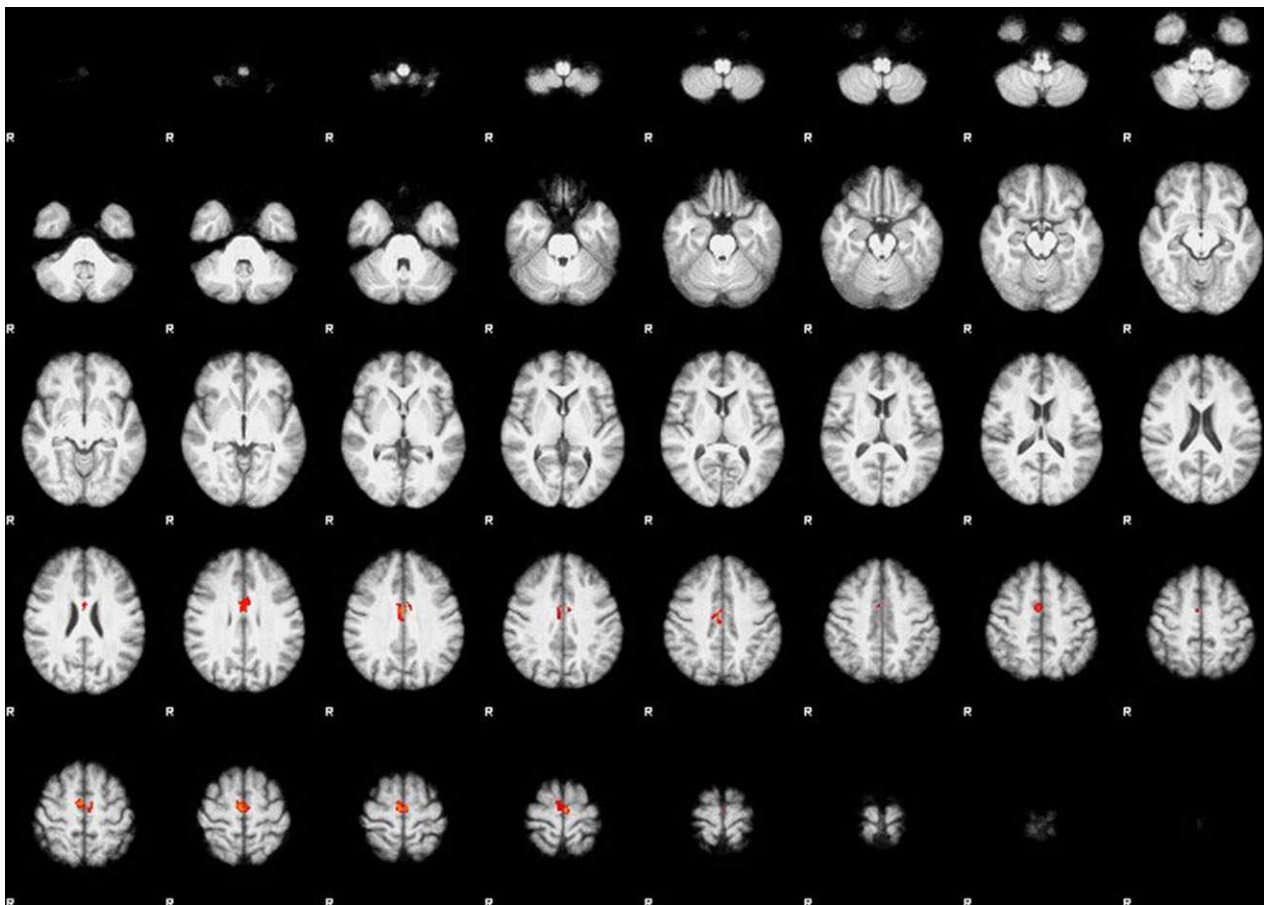


Figure 2. Comparison of prewarm-up myotonia condition and post-warm-up myotonia absent condition in the DM/myotonia+ group. Red-yellow clusters (overlaid on MNI 152 standard brain) represent voxels of significantly ($P < 0.05$, $Z > 2.3$) higher blood oxygen level-dependent signal at myotonia condition compared to myotonia absent condition. Clusters are located in the supplementary motor area (SMA) and the dorsal anterior cingulate cortex (dACC). Cluster details are listed in Table 2.

Table 2 Cluster details of voxels of significantly higher blood oxygen level-dependent signal in prewarm-up myotonia condition than in post-warm-up myotonia absent condition

Cluster	Voxel #	<i>P</i>	Max. <i>Z</i>	Z max coordinates (MNI152) ¹			Atlas label ²
				X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	
1	314	0.00681	4.29	6	-10	62	49% SMA
2	224	0.0452	5.09	2	-2	30	65% ACC

SMA, supplementary motor area; ACC, Anterior cingulate cortex.

¹Coordinates in mm, MNI152 standard space.

²Atlas label according to the Harvard-Oxford Cortical Structural Atlas.

image on Fig. 3, cluster details in Table 3.). No significant difference was found between grip condition BOLD signals.

Passive hand movement task – No significant difference in BOLD signal during passive hand movement task was found between DM/myotonia+ and DM/myotonia– groups.

Discussion

To our knowledge, this is the first study exploring brain involvement during grip myotonia using fMRI. It was possible to compare myotonic and non-myotonic state in both intra- and intersubject manner, first based on the warm-up phenomenon, latter due to the patient groups with and without apparent grip myotonia. These comparisons consistently yielded increased BOLD signal at the SMA and the dorsal anterior cingulate cortex (dACC) or anterior midcingulate gyrus (amCC) due to the four-region neurobiological model (13, 14)), indicating activation of these areas to be highly related to myotonia.

As expected, primary motor areas showed no activation during myotonia (patients were told not to force relaxation; thus, no activation was expected due to extensor muscle action either). This supports our hypothesis that brain functions are not taking part in the development of

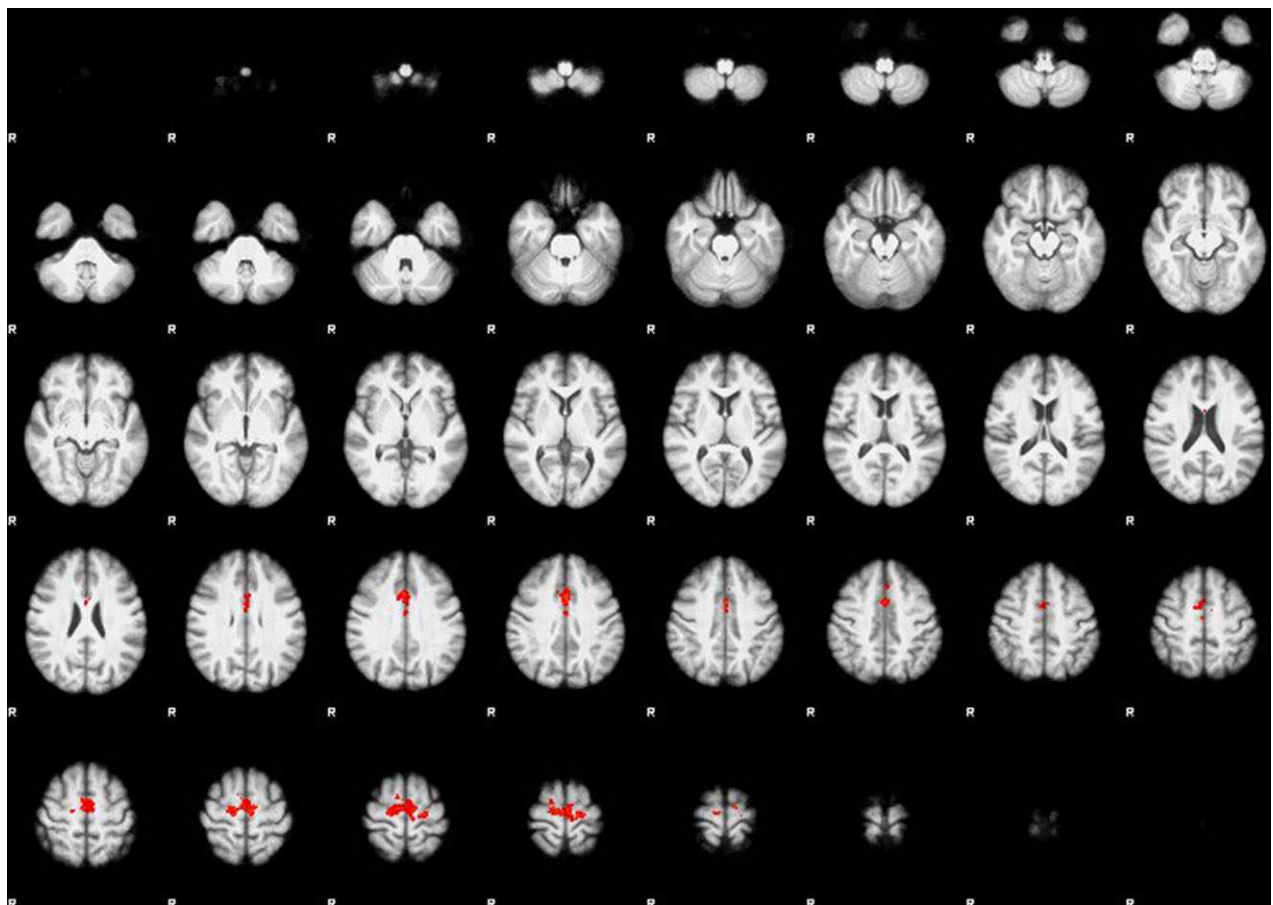


Figure 3. Comparison of DM/myotonia+ group prewarm-up myotonia condition and DM/myotonia– group prewarm-up myotonia absent condition. Red-yellow clusters (overlaid on MNI 152 standard brain) represent the significantly ($P < 0.05$, $Z > 2.3$) higher blood oxygen level-dependent signal rate voxels in the DM/myotonia+ group myotonia condition compared to DM/myotonia– group myotonia absent condition. Clusters are located in the supplementary motor area (SMA) and the dorsal anterior cingulate cortex (dACC). Cluster details are listed in Table 3.

Table 3 Cluster details of voxels of significantly higher blood oxygen level-dependent signal in DM/myotonia+ group myotonia condition than in DM/myotonia– group myotonia absent condition

Cluster	Voxel #	P	Max. Z	Z max coordinates (MNI152) ¹			Atlas label ²
				X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	
1	682	0.00014	3.79	0	12	34	81% ACC
2	516	0.003	2.91	–4	–12	62	50% SMA

ACC, Anterior cingulate cortex; SMA, supplementary motor area.

¹Coordinates in mm, MNI152 standard space.

²Atlas label according to the Harvard-Oxford Cortical Structural Atlas.

myotonia, but myotonia of primarily muscular origin causes secondary, probably compensational cortical activations.

The prolonged abnormal relaxation enables the fMRI mapping of areas that are probably involved in normal muscle relaxation as well. Activations in the medial frontal cortex during myotonia may theoretically be due to different motor control mechanisms as movement initiation/preparation, ‘active’ motor termination, but may be part of conflict-related mechanisms as well.

The mechanism of voluntary muscle relaxation in the healthy state is not fully understood. A number of investigators raised that voluntary muscle relaxation may not simply be a result of the cessation of neural activity leading to contraction, but is mediated by an active inhibitory circuit (15–17). This inhibitory mechanism was shown to precede muscle relaxation similarly as motor preparation mechanisms precede muscle contraction. This type of inhibition, the one leading to contraction or motor performance termination, might be somewhat different from the inhibition of an entire action that is part of the motor selection mechanisms. However, both types of inhibition were proposed to be related to the SMA (15–18). It is quite possible that the higher BOLD signal found in the SMA in the present study during myotonia represents such inhibitory function; that is, the brain is inherently ‘willing’ to finish the abnormally prolonged relaxation, even though patients were told not to intentionally force the termination of myotonia. This result is in line with the theory of the role of inhibitory circuits in motor termination.

Other activated area during myotonia was the dACC (or aMCC), which is also a motor control area of the medial frontal cortex. This area is regarded to link cognitive functions to motor actions. From the aspect of myotonia, the most important ‘cognitive motor control’ functions

related to this area are perhaps action monitoring and conflict-related functions, such as error detection (19–21). Conscious error detection was shown to be an especially strong activator of the dACC (19). Although the mechanism of error detection during myotonia may somewhat differ from the mechanisms activated by the tasks used in these studies (e.g. ‘stroop task’ or ‘error awareness task’), it is likely that the major component of the dACC activation seen in our patients is related to error detection-like mechanism as well, as a result of the experience of non-occurring grip relaxation despite the intention to do so. Other explanation for dACC activation in our patients may be the negative affect, or pain caused by myotonia as both are represented in the dACC (22); however, neither patient reported pain during the tasks.

Interestingly, no significant difference in BOLD signals due to possibly delayed resting-state activation was detected during myotonia; that is, we could not detect lower BOLD signals during myotonia phase when compared to non-myotonic states of DM/myotonia– group or the myotonia absent phase of DM/myotonia+ group. A reason for this might be that resting-state network activation is slower than the period of myotonia, or spatially not uniform enough to reach a statistically significant difference.

Overall, simultaneous activation seen in the dACC and SMA during myotonia suggests that the muscular relaxation inhibition triggers secondary response in motor control areas encompassing motor monitoring: error detection and consequent relaxation preparation. The absence of significant BOLD signal difference between groups and sessions during passive hand movement task underscores that the dACC and SMA activations are myotonia related and are not a result of other possible motor or sensory mechanism alteration caused by DM1.

Medial frontal motor areas were shown to be linked to other diseases accompanied by motor disorders as Parkinson’s disease (23, 24), apraxias (25, 26), and dystonias (27).

Main limitation of this study is the low number of patients; however, considering the prevalence of DM1, inclusion criteria, and MRI compatibility, our sample size is still reasonable. Grip strength during fMRI tasks was not recorded, which could have been confounding when interpreting results. However, no difference was found in BOLD responses during grip phases either on inter- or intrasubject comparisons, indicating that no significant difference occurred in grip performance between groups or between sessions (i.e.,

fatigue may not explain intersession differences in the post-grip phase)(28).

We showed that myotonia is related to cortical activations in high-order motor control areas. This cortical involvement is most likely to represent action of inhibitory circuits intending motor termination. Our results may add important information to the field of motor area research and may help understanding the cortical contribution to other peripheral and central disorders affecting motor system as Parkinson's disease, dystonias, or apraxias.

Acknowledgments

Sources of funding: This work was supported by grants: SROP-4.2.2/A-11/1/KONV-2012-0017, Hungarian Brain Research Program Grant No. KTIA_13_NAP-A-II/9, KTIA_13_NAP-A-II/10, and by PTE ÁOK-KA-2013/12. Dr. Schwarcz was supported by a grant of Hungarian Scientific Research Found OTKA-K 109132 for which he served as primary investigator, and by Bolyai Scholarship. Dr. Kovacs was supported by a grant of Hungarian Scientific Research Found OTKA- PD103964 for which he served as primary investigator, and by Bolyai Scholarship.

Conflict of interest

Authors report no conflict of interest.

References

1. UDD B, KRAHE R. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol* 2012;**11**:891–905.
2. LOGIGIAN EL, BLOOD CL, DILEK N et al. Quantitative analysis of the “warm-up” phenomenon in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve* 2005;**32**:35–42.
3. CHARLET BN, SAVKUR RS, SINGH G, PHILIPS AV, GRICE EA, COOPER TA. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 2002;**10**:45–53.
4. MINNEROP M, WEBER B, SCHOENE-BAKE JC et al. The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease. *Brain* 2011;**134**:3530–46.
5. ROMEO V, PEGORARO E, FERRATI C et al. Brain involvement in myotonic dystrophies: neuroimaging and neuropsychological comparative study in DM1 and DM2. *J Neurol* 2010;**257**:1246–55.
6. CARAMIA F, MAINERO C, GRAGNANI F et al. Functional MRI changes in the central motor system in myotonic dystrophy type 1. *Magn Reson Imaging* 2010;**28**:226–34.
7. OLDFIELD RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* 1971;**9**:97–113.
8. SMITH SM. Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp* 2002;**17**:143–55.
9. JENKINSON M, BANNISTER P, BRADY M, SMITH S. Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *NeuroImage* 2002;**17**:825–41.
10. WOOLRICH MW, RIPLEY BD, BRADY M, SMITH SM. Temporal autocorrelation in univariate linear modeling of fMRI data. *NeuroImage* 2001;**14**:1370–86.
11. ANDERSSON JLR, JENKINSON M, SMITH S. Non-linear optimisation. FMRIB technical report TR07JA1. <http://www.fmrib.ox.ac.uk/analysis/techrep/>, 2007a.
12. ANDERSSON JLR, JENKINSON M, SMITH S. Non-linear registration, aka Spatial normalisation. FMRIB technical report TR07JA2. <http://www.fmrib.ox.ac.uk/analysis/techrep/>, 2007b.
13. PAXINOS G, MAI J eds. The human nervous system. Amsterdam: Elsevier, 2004; pp 915–49.
14. PALOMERO-GALLAGHER N, VOGT BA, SCHLEICHER A, MAYBERG HS, ZILLES K. Receptor architecture of human cingulate cortex: evaluation of the four-region neurobiological model. *Hum Brain Mapp* 2009;**30**:2336–55.
15. TERADA K, IKEDA A, NAGAMINE T, SHIBASAKI H. Movement-related cortical potentials associated with voluntary muscle relaxation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1995;**95**:335–45.
16. TOMA K, HONDA M, HANAKAWA T et al. Activities of the primary and supplementary motor areas increase in preparation and execution of voluntary muscle relaxation: an event-related fMRI study. *J Neurosci* 1999;**19**:3527–34.
17. TOXOPEUS CM, DE VRIES PM, DE JONG BM et al. Cerebral activation patterns related to initiation and inhibition of hand movement. *NeuroReport* 2007;**18**:1557–60.
18. NACHEV P, KENNARD C, HUSAIN M. Functional role of the supplementary and pre-supplementary motor areas. *Nat Rev Neurosci* 2008;**9**:856–69.
19. ORR C, HESTER R. Error-related anterior cingulate cortex activity and the prediction of conscious error awareness. *Front Hum Neurosci* 2012;**6**:177.
20. LUU P, FLAISCH T, TUCKER DM. Medial frontal cortex in action monitoring. *J Neurosci* 2000;**20**:464–9.
21. GEHRING WJ, KNIGHT RT. Prefrontal-cingulate interactions in action monitoring. *Nat Neurosci* 2000;**3**:516–20.
22. SHACKMAN AJ, SALOMONS TV, SLAGTER HA, FOX AS, WINTER JJ, DAVIDSON RJ. The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. *Nat Rev Neurosci* 2011;**12**:154–67.
23. PLAYFORD ED, JENKINS IH, PASSINGHAM RE, NUTT J, FRACKOWIAK RS, BROOKS DJ. Impaired mesial frontal and putamen activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann Neurol* 1992;**32**:151–61.
24. JAHANSHAHI M, JENKINS IH, BROWN RG, MARSDEN CD, PASSINGHAM RE, BROOKS DJ. Self-initiated versus externally triggered movements. I. An investigation using measurement of regional cerebral blood flow with PET and movement-related potentials in normal and Parkinson's disease subjects. *Brain* 1995;**118**(Pt 4):913–33.
25. DELLA SALA S, FRANCESCANI A, SPINNLER H. Gait apraxia after bilateral supplementary motor area lesion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;**72**:77–85.
26. SUZUKI Y, KIYOSAWA M, MOCHIZUKI M, ISHIWATA K, ISHII K. The pre-supplementary and primary motor areas generate rhythm for voluntary eye opening and closing movements. *Tohoku J Exp Med* 2010;**222**:97–104.
27. OGA T, HONDA M, TOMA K et al. Abnormal cortical mechanisms of voluntary muscle relaxation in patients with writer's cramp: an fMRI study. *Brain* 2002;**125**:895–903.
28. CRAMER SC, WEISSKOFF RM, SCHAECHTER JD et al. Motor cortex activation is related to force of squeezing. *Hum Brain Mapp* 2002;**16**:197–205.