Медицински Университет – София
Катедра по неврология
Ръководител: Чл. кор. проф. д-р Л. Трайков, д.м.н.

д-р Шима Мехрабиан-Спасова, д.м.

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ПРИ ФРОНТОТЕМПОРАЛНА ДЕМЕНЦИЯ И СРОДНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на научна степен

"ДОКТОР НА НАУКИТЕ"

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:

1. Проф. д-р Евгения Василева Русчева, д.м.н.
2. Проф. д-р Ивайло Людмилов Търнев, д.м.н.
3. Проф. д-р Стефка Тодорова Янчева, д.м.н.

Дисертационният труд съдържа 505 стандартни машинописни страници, включващи 48 таблици и 49 фигури. Книгописът включва 1045 заглавия, от които 23 на кирилица и 1022 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на Катедрен съвет на Катедрата по неврология на Медицински Университет-София на 29.03.2016 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 15.06.2016 г. от 14 часа, в учебната зала на Клиниката по нервни болести, УМБАЛ „Александровска", пред научно жури в състав:

1. Проф. д-р Евгения Василева Русчева, д.м.н.
2. Проф. д-р Ивайло Людмилов Търнев, д.м.н.
3. Чл. кор. проф. д-р Лъчезар Динчов Трайков, д.м.н.
4. Проф. д-р Стефка Тодорова Янчева, д.м.н.
5. Проф. д-р Людмил Димитров Йорданов-Мавлов, д.м.н.
6. Проф. д-р Радослав Иванов Райчев, д.м.н.
7. Доц. д-р Николай Пенчев Никоевски, д.м.н.

Използвани съкращения:

БА- болест на Алцхаймер
БДН- болест на двигателния неврон
БНХ- болест на Насу-Хакола
ДРН- деменция с ранно начало
ДСП- дългосрочна памет
ЕЕГ- електроенцефалография
ЕМГ- електромиография
ЕНГ- електроневрография
ЗЕП- зрителни евокирани потенциали
КАТ- компютърна аксиална томография
КБД- кортикобазална дегенерация
КБС- кортикобазален синдром
КСП- краткосрочна памет
ЛАС- латерална амиотрофична склероза
ЛКН- леко когнитивно нарушение
ЛПА- логопенична прогресивна афазия
МРТ- магнитно резонансна томография
НА- невроакантоцитоза
НФ-ППА – прогресивна нефлуентна афазия
ППА- първична прогресивна афазия
ПСП- прогресивна супрануклеарна пареза
П-ФТД- поведенчески вариант на фронтотемпорална деменция
СД- семантична деменция
СЕП- слухови евокирани потенциали
СК- креатин фосфокиназа
СМ- синдром на McLeod
ФТД- фронтотемпорална деменция
ФТЛД- фронтотемпорална лобарна дегенерация
ХА- хорея-акантоцитоза
Ab- амилоид бета протеин
ApoE- аполипопротеин Е
AGD- деменция с аргирофилни телца
APP- amyloid precursor protein
BDAE- Boston Diagnostic Aphasia Examination
BNT- Boston Naming Test
C9orf72- Chromosome 9 open reading frame 72
CDR- Clinical Dementia Rating
CDT- Clock Drawing Test
CERAD - Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CHMP2B- Chromatin Modifying Protein 2B
DAD- Disability Assessment for Dementia scale
FBI- Frontal Behaviour Inventory
FCSRT- Free and Cued Selective Reminding Test
FDG-PET- 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) Positron Emission Tomography
FUS- fused in sarcoma
GDS- Geriatric Depression Scale
GRN- Granulin

IST- Isaac`s Set Test
LDH- лактат дехидрогеназа
LRRK2- Leucine-rich repeat kinase 2
MAPT- Microtubule-associated protein tau
MMSE- Mini-Mental State Examination
NGS- Next generation sequencing, следваща генерация секвениране
NPI- Neuropsychiatry Inventory
PART- първична таупатия, свързана с възрастта
PRNP- PRioN Protein
PSEN1- Presenilin 1
PSEN2- Presenilin 2
p-tau- phospho-tau
SIGMAR1- Sigma Non-Opioid Intracellular Receptor 1
SNCA- synuclein alpha
SOD1- Superoxide Dismutase 1
SPECT- Single photon emission computed tomography
TARDBP- TAR DNA-binding protein 43
TDP-43- transactive response DNA binding protein-43
TMT-A – Trial Making A
TMT-B –Trial Making B
TREM2- triggering receptor expressed on myeloid cells 2 protein
t-tau- total tau
UPDRS- Unified Parkinson's Disease Rating Scale
UPS- ubiquitin-proteasome system
VCP- Valosin conteining protein
WAIS-R- Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised
WCST- Wisconsin Card Sorting Test
WMLT- Word List Memory Test

Глава 1. Въведение

Терминът "деменция с ранно начало" (ДРН) или "пресенилна деменция" определя всички деменции с начало преди 65-годишна възраст (Giannakopoulos et al., 1996, Harvey & Rossor, 1995). Деменцията с ранно начало има опустошителни психо-социални последици, които засягат най-продуктивните години от живота на хората. Броят на хората с ДРН нараства, заболяването има все по-голямо клинично значение и представлява важен социален проблем (Vieira et al, 2013).

Основният акцент на този труд се фокусира върху фронтотемпоралната деменция (ФТД), представляваща шапка на хетерогенна група невродегенеративни заболявания, и болест на Алцхаймер (БА) с ранно начало като група заболявания протичащи, предимно с "деменция с ранно начало". Диагностичните проблеми се появяват именно в началните етапи, когато ранната деменция трябва да бъде разграничена от когнитивния дефицит при нормалното стареене. Друг проблем в началните стадии е диференциалната диагноза между различните типове деменции, поради припокриване на значителна част от патологичния мозъчен субстрат при тези заболявания.

От голямо значение е да се установи спецификата на клиничните синдроми с деменция и/или двигателни разстройства в съответствие с генетичната и невропатоанатомичната диагноза на дадено невродегенеративно заболяване. Клиничната диференциална диагноза често е много трудна, защото един и същ клиничен дементен синдром може да се наблюдава при няколко заболявания.

Друг важен аспект на тази група заболявания са наследствените форми. Те са много по-редки от спорадичните форми на заболяването, но поставят много сериозни диагностични, терапевтични и етични проблеми във връзка с генетичната консултация. Наследствените форми на заболяванията са с по-ранно начало, отколкото спорадичните форми и понякога са с атипичен фенотип.

Изпъква необходимостта от идентифициране на биологични маркери, определящи пациентите подходящи за терапевтични интервенции. Рано в процеса на заболяването протеомичните анализи могат да открият продуктите на абнормния белтъчен

метаболизъм. Молекулярно-генетичният анализ на моногенни невродегенеративни заболявания постигна голям успех в насока идентифициране на генетичните дефекти при БА и ФТД. Използването на следваща генерация секвениране (NGS) методи допринесе за по-малко дискриминативен анализ със спестяване на време и средства. Този дисертационен труд представя резултати получени предимно посредством тези технологии.

През последните години са разработени ревизирани диагностични критерии на болестта на Алцхаймер и фронтотемпоралната деменция, използвайки специализирани невропсихологични тестове и биомаркери от ликвора, невроизобразяването и генетичните методи. За хармонизиране, стандартизиране и оптимизиране на новите диагностични критерии, както и новите биомаркери са необходими изследвания на повече извадки от различни популации.

Глава 2. Цел и задачи:

ЦЕЛ

ОСНОВНАТА ЦЕЛ на дисертационния труд е да се проучат и обобщят разнообразните и комплексни клинико-протеотипно-генетични взаимовръзки при ФТД и сродни заболявания в българска популация. С оглед разнообразните генетични дефекти при заболявания, протичащи с деменция, си поставихме за цел да проучим честотата и разпространението на различните генетични дефекти, да установим генотип-фенотип корелации и генотип-протеотип-фенотип корелации на откритите генетични варианти, където е възможно, използвайки NGS технологии, в съчетание с конвенционални молекулярно-генетични изследвания. Допълнително, имахме за цел да изследваме взаимовръзката на ликворните биомаркери и АроЕ полиморфизма при БА с ранно начало и БА с късно начало.

ЗАДАЧИ

За постигане на поставената цел и верифициране на основните хипотези е необходимо да се решат следните задачи:

1. Провеждане на теренни проучвания в цялата страна с оглед идентифициране на случаи с ФТД/фамилни и ранни случаи на деменции.

2. Подбор на пациенти с ФТД, пациенти с БА с ранно начало (с атипична клинична картина и/или фамилни случаи), БА с късно начало с автозомно-доминантно унаследяване и пациенти с фамилни и ранни форми на други невродегенеративни заболявания; подбор на здрави контроли, съответни по възраст, пол и образователен ценз на групите болни.

3. Изработване на специфична невропсихологична батерия, съобразно нуждите на новите диагностични критерии за различните подтипове ФТД.

4. Прецизно клинично фенотипизиране с определяне на неврологичния статус, когнитивния профил, отклоненията в поведението, демографските фактори, лабораторни и невроизобразяващи методи.

5. Генеалогично проучване на засегнатите фамилии с оглед изясняване типа на унаследяване.

6. Събиране на кръвни проби, както от засегнати, така и от здрави членове (там, където е възможно) на идентифицираните фамилии и насочване за молекулярно-генетично изследване.

7. Описание на генотип-фенотип корелации при пациенти с установен генетичен дефект; проучване на интра и интерфамилните вариации в клиничното протичането на заболявания, причинени от една и съща мутация.

8. Контрол на терапевтичния подход и симптоматичното лечение при пациентите от проучването, както и провеждане на когнитивна рехабилитация на пациентите и техните близки.

9. Съпоставяне на ликворните биомаркери, когнитивния профил и демографските фактори при пациенти с БА, според носителството на алелите на АроЕ.

Глава 3. Методики и Контингент

3.1. Методики

3.1.1. Клиничен метод

Диагностичният алгоритъм при болните в настоящото проучване включва подробна анамнеза, генеалогично изследване, соматичен и неврологичен преглед, невропсихологично изследване, невропсихиатрична оценка, ЕМГ, ЕЕГ, лабораторни изследвания, невроизобразяване, включващо компютърна аксиална томография (КАТ), магнитно резонансна томография (МРТ) на мозъка, SPECT (Single-photon emission computed tomography), FDG-PET (18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) Positron Emission Tomography), амилоид PET, визуални невроизобразяващи оценъчни скали, генеалогични, молекулярно-генетични, невропатологични и биохимични изследвания.

.

3.1.1.1. Двигателна оценка чрез Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)

3.1.2. Лабораторни изследвания

3.1.3. Визуални невроизобразяващи оценъчни скали

3.1.4. Скали за оценка на общ когнитивен капацитет, справяне с ежедневни дейности и поведенчески нарушения

За оценка на способността за справяне с ежедневни дейности, както и за оценка на тежестта на дементния синдром се прилагат следните оценъчни скали: за оценка тежестта на деменция (Clinical Dementia Rating, CDR) и въпросник за справяне с ежедневни дейности (DAD)- оценяване на неспособност при деменция.

Разстройствата в поведението се оценяват със структурирано интервю за честота и тежест на симптомите чрез следните скали: Frontal Behaviour Inventory (FBI), Невропсихиатричен въпросник (NPI) и Скала за оценка на депресивността (GDS).

При всички участници в проучването е прилагана и Mini-Mental State Examination (MMSE) - скринингова скала за когнитивен капацитет.

3.1.5. Невропсихологични методи

Когнитивните функции при всички болни, както и при групата от здрави контроли бяха оценявани с набор съставен от субтестове и съкратени версии на широко използвани невропсихологични методики.

Изследване на памет

Краткосрочна памет: Цифров обхват (прав ред);

Дългосрочна памет: Word List Memory Test (WLMT)- изследване на непосредствено припомняне, отсрочено припомняне и разпознаване. Дългосрочната невербална памет е оценявана чрез свободното припомняне на фигурите от тест с копиране на фигури. В настоящото проучване епизодичната памет е изследвана и с Free and Cued Selective Remining Test (FCSRT, Buschke, 1984) чрез изследване на свободното припомняне (непосредствено и отдалечено), улесненото припомняне с помощта на семантична подкрепа, общото (свободно и улеснено) припомняне и разпознаване.

Изследване на невербална памет

- Припомняне на дву- и триизмерни фигури (кръг, ромб, два пресечени правоъгълника и куб) (Morris, et al., 1989).
- Припомняне на Rey-Osterrieth Complex Figure Test

Изследване на внимание и екзекутивни функции

Тестове за изследване на насоченото и разпределено селективно внимание и екзекутивните функции: Цифров обхват (обратен ред), Trail Making Test-A и B, Тест на Stroop; Цифрово-символен тест, категориална вербална флуидност (15-секундната версия на Isaac`s Set Test (IST), вербална флуидност (буква М, К, С), Wisconsin Card Sorting Test (WCST), вкл. и модифицирана версия.

Изследване на реч

- Оценката на спонтанната реч
- Изследване на вербалната флуидност
- Езиковото разбиране се изследва със субтестовете за разбиране на чута реч от българската адаптация на Бостонския тест за изследване и диагноза на афазиите на Александрова и кол., 1995 (Goodglass&Kaplan, 1983)
- Кратка версия на Token Test (Spreen& Benton, 1969), оригиналният тест на De Renzi,Vignolo, (1962)
- За изследване на граматичното разбиране , респективно установяване и оценка на рецептивен аграматизъм, бе използвана пробата на Kempler (Kempler et al., 1998)
- Способността за назоваване се изследва със съкратената версия на Boston Naming Test (BNT) (Kaplan, et al., 1978),
- В настоящото проучване назоваването се изследва и с разширен тестов вариант, включващ 60 стимула, подбрани от стандартизирани 260 контурни рисунки (Snodgrass & Vanderwart, 1980),
- Повторната реч се изследва със задачи за повтаряне на различен тип материал
- Проби за изследване на семантичните процеси (Semantic Tasks): word-to-picture discrimination task/word-to-picture-matching task и semantic association task
- Оценка на тежестта на афазията от батерията BDAE

Изследване на зрително-пространствени функции и конструктивен праксис

Тест Копиране на фигури
Тест с рисуване на часовник (Clock Drawing Test, CDT)
Rey-Osterrieth Complex Figure Test –копиране
Block Design test (Тест Мозайка)

Изследване на разпознаването на емоции (социално познание)

- Facial recognition test (Benton, Sivan, Hamsher, Varney,& Spreen, 1990)
- Набор от лица за разпознаване на емоции

Изследване на праксис

- Пробите за букофациален праксис
- Мануалният праксис

- Допълнително се тестува способността за превключване от една мануална позиция към друга *(кинетични праксисни проби) с отчитане на инертност, персевериране на предишни задачи и под. (Райчев Р и съавт., 2001)*

3.1.6. Генеалогични, молекулярно-генетични, невропатологични и биохимични изследвания

Част от изследванията в това проучване са порведени в Катедра по медецинска генетика, София; Каролинска Институт, Худинге, Швеция; Technische Universität München, Мюнхен, Германия; Ludwig-Maximilians-Universität München, Мюнхен, Германия; Катедра по неврология и невропатология, Виена, Австрия, Катедра по невронауки, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Португалия; Radboud University Medical Center Нимеген, Холандия; Университетът на Verona-AOUI-Verona, Верона, Италия. Молекулярно-генетичните изследвания са извършвани на сляпо спрямо клиничната диагноза на пациентите, и обратното.

3.1.6.1. Генеалогичното (родословно) изследване

Бяха проведени мащабни теренни проучвания в страната с оглед генеалогично (родословно) изследване за изграждане на родословни дървета и установяване начина на унаследяване на БА при фамилните случаи.

3.1.6.2. Молекулярно-генетичен анализ

За провеждане на генетичния анализ беше използвана високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки в периферна кръв.

Изготвяне на ДНК проба и цялостно екзомно секвениране
Геномна ДНК се изолира с използване на QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN), съгласно инструкциите на производителя. Екзомно обогатяване се извърши чрез използване на Nextera Rapid Capture Exome Kit (Illumina). Целите екзомни библиотеки се секвенираха с помощта на 100 bp paired-end v3 chemistry върху Illumina HiSeq 2000 платформа. NGS прочитите се съпоставиха с b37 геномно асемблиране чрез 1000 геномният проект (Abecasis et al., 2012) проведени cGenomeAnalysis Toolkit (GATK) (McKenna et al., 2010) с помощта на BWA-MEM aligner (Li&Durbinq 2009). b37 асемблирането се базира на GRCh37 асемблиране с човешки decoy и човешки херпесвирус 4 тип 1 (Epstein-Barr Virus; AC:NC_007605) секвенция.

Следваща генерация секвениране (NGS) с изследавне на панел от гени за деменция

Геномна ДНК се изолира от периферна кръв, съгласно стандартни протоколи. Качеството и количеството на ДНК се оцени с флуорометър. Всички ДНК проби бяха нормализирани до 200 ng/ml. Пациентите са изследвани с панел от 17 гени за деменция (PRNP, PSEN1, PSEN2, APP, C9orf72, GRN, MAPT, CHMP2B, TARDBP, FUS, SOD, LRRK2, SNCA, PRNP, ApoE, TREM2, SQSTM1, SIGMAR1) които са замесени в етиологията на наследствена БА, ФТД, ФТД-ЛАС, паркинсонизъм и прионови заболявания.
Апликон секвениране на платформа Ion Torrent PGM се провежда с AmpliSeq панел, състоящ се от 196 различни таргети в 17 гена, 2 SNP's и 3 STR-маркери, с 200-базови

апликона и върху 316-Chip. На еднична серия на Illumina MiSeq, всички 135 проби са обработени едновременно, за достигане на желаната дълбочина на покритие> 150x. Окончателният анализ, обработка и проучване на вариантите е дело на дисертанта, което се осъществи по време на научния престой в Каролинска институт, Швеция.

Секвениране по Сангър

Всички двойки праймери за екзон-амплификация са проектирани с напредващ алтернативен MTR и обратни M13 опашки, за да се улесни секвенирането на двете вериги на ДНК. Всеки екзон беше индивидуално анализиран чрез директно секвениране на всеки PCR продукт на автоматизиран ДНК секвенатор (ABI 3130, ThermoFisher Scientific), използвайки BigDyeTerminatorv3.1CycleSequencing Kit (Thermo FisherScientific).
Всички редки варинати, идентифицирани от секвениращия ампликон на Ion Torrent PGM платформа platform, бяха валидизирани чрез секвениране по Сангер. Секвенирането по Сангер се извърши чрез директно ДНК секвениране с ABI 3100 with the BigDye 3.0 kit според инструкциите на производителя.

Генотипизиране на C9orf72 G4C2

Използван е алтернативен PCR анализ с repeat-primed PCR assay (reverse RP-PCR) и short tandem repeat (STR) fragment length анализ с flanking праймери оптимизирани за алели с високо съдържание на GC (STR-PCR), позволяващи надеждна идентификация на носителите на G_4C_2 експанзии и точен размер на нормалните дължини. Тези анализи са извършени при всички изследвани проби. Характерният амплификационен патерн (>40 повторения) на електроферограма се счита за доказателство за експанзията на патогенното повторение (Ratti et al., 2012; Gijselinck et al., 2012; van der Zee et al., 2012).

Детекция на APP дупликации

Ние използвахме комбиниран метод на микросателитен генотипизиращ маркер с количествен PCR в реално време за детекция на APP дупликации.

ApoE генотипиране

ApoE генотипа на всеки пациент беще определян чрез стандартна PCR методика.

3.1.6.3. Невропатоанатомично изследване

Невропатоанатомичното проучване се проведе върху фиксирани с формалин, парафинови блокове. Изследвани са участъци от фронталната, сингулатната, темпоралната, париеталната и окципиталната кора, енториналния кортекс и хипокампа, амигдалата, нуклеус каудатус, нуклеус акумбенс, путамен и глобус палидус, базалното ядро на Meynert, таламуса, субталамичното ядро, средния мозък, понса, продълговатия мозък и малкия мозък с нуклеус дентатус. В допълнение към Hematoxylin and Eosin (H&E), Luxol Fast Blue/nuclear fast red, Bielschowsky and Gallyas оцветявания, следните моноклонални антитела се използваха за имунохистохимия: anti-tau AT8, AT100, AT180, AT270, anti-4R tau (RD4), anti-3R tau (RD3), anti-phospho-TDP-43 (pS409/410), anti-TDP-43, anti-ubiquitin, anti-α-synuclein (clone 5G4), anti-Aβ (clone 6F/3D), anti-p62. В допълнение, е приложено поликлонално anti-FUS и поликлонално anti-Lrrk2 антитела. Направен е и Tay анализ в Sarkosyl-неразтворими фракции.

3.1.6.4. Измерване на серумни нива на GRN

Нивата на GRN се определят с Progranulin (човешки) ELISA Kit (Adipogen, Incheon, Korea) съгласно протокола на производителя с разреждане на серума 1:50. В експеримента са включени и проби от нормални контроли, положителна контрола с патогенна GRN мутация водеща до хаплоинсуфициенция.

3.1.6.5. Ликворни биомаркери

Анализът на ликворните биомаркери се извършва в рамките на рутинната клинична практика при пациенти с когнитивни нарушения в клиника по психиатрия към Technische Universität München, Мюнхен, Германия. Ликворните проби са анлизирани проба по проба, като се използват търговски достъпни Имуноензимен анализи (INNOTEST, Innogenetics) за определяне на нивата на Ab1-42, p-tau и t-tau.

3.1.6.6. Еритроцитни анализи

- Микрофлуидно устройство за изследване на пасажа на еритроцити (Cluitmans et al., 2014)
- Имуноблот анализ със специфични антитела срещу active Lyn (Lyn-396), total Lyn (Lyn), асоциирани с мембраната на червените кръвни клетки
- Оценка на съдържанието на хореин в еритроцитите, чрез теста на Western-blot (Dobson-Stone et al., 2004)

3.1.7. Статистически методи

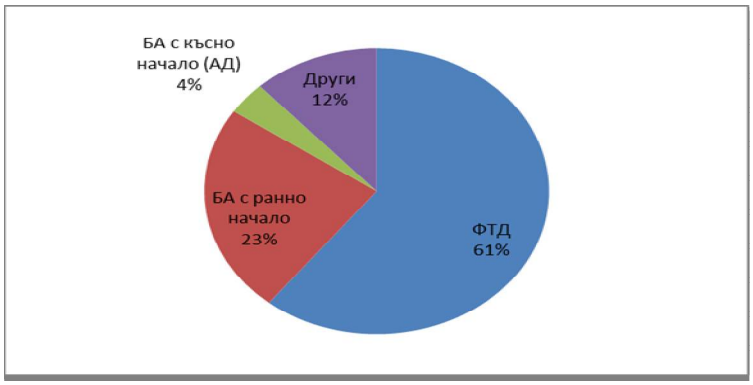
Дескриптивната статистика е описана със средни стойности и стандартни отклонения (SD). Разликите между групите във възрастта, образованието и резултатите от нвропсихологичните тестове са оценявани с помощта на ANOVA (one-way вариационен анализ). При наличие на значим ефект при ANOVA, разликите между групите се анализират post-hoc две по две с Bonferroni анализ ($p<0.05$). Честотата на алелите е определяна чрез анализ на честотата на генотиповете. Тяхното разпределение се оценява чрез Pearsons chi-squaredтест и Fisher's exact тест при необходимост. Сравнение на три групи е извършено чрез ковариететен анализ на ANCOVA. В случаите, при които се установява статистически значима разлика между групите при някой от основните клинични параметри, като например образователният ценз, пол, възраст и тежестта на заболяването е провеждан ковариентен анализ (ANCOVA).

3.2. Контингент

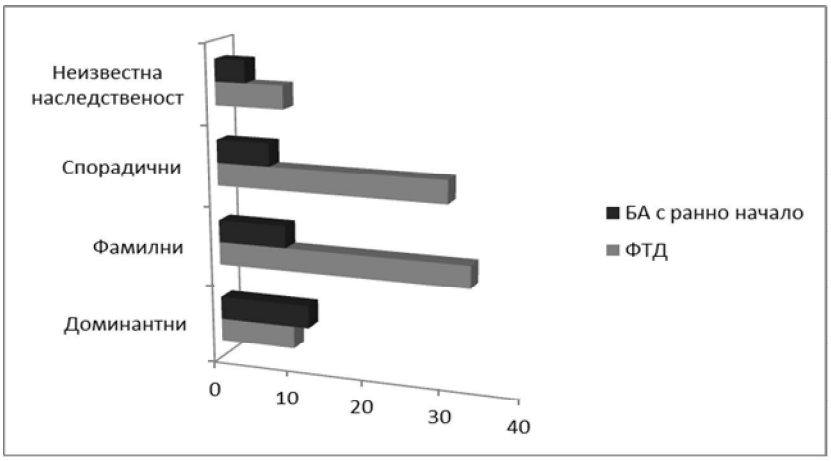
Този труд съдържа отделни проучвания с отделен контингент на болни.

I – Клинико-генетични проучвания при ФТД и сродни заболявания

Проучването е провеждано в Клиниката по неврология на УМБАЛ „Александровска" София, или по време на теренни проучвания из страната при 135 дементно болни страдащи от ФТД/БА и други невродегенеративни заболявания (фиг. 1). Данните за фамилност са представени във фиг. 2.



Фиг. 1. Клинична характеристика на извадката. БА- болест на Алцхаймер; ФТД- фронтотемпорална деменция; АД- автозомно-доминантен



Фиг. 2. Фамилност при пациенти с ФТД и БА с ранно начало. БА- болест на Алцхаймер, ФТД- фронтотемпорална деменция

Използвана е следваща генерация секвениране (NGS) с провеждане на масивно паралелно секвениране на 17 гени замесени в етиологията на дементните заболявания, в съчетание с PCR базирана технология за откриване на експанзия на хексануклеотидни повторения в C9orf72 гена с цел охарактеризиране на честотата и спектъра на мутациите, каталогизиране на генетичните варианти и установяване на клинико-генетични корелации

при Българска популация от дементно болни. Клиничните характеристики на пациентите са представени в таблица 1.

Таблица 1. Клинична характеристика на включените пациенти

Пациенти (N=135)	ФТД (N=82)	БА с ранно начало (N=32)	Други диагнози (N=21)
Пол (ж/м)	48/34	18/14	9/12
Възраст на дебют	56.7±7.3	54 ±11.1	55.8±17.8
Доминантни случаи	10	12	7
Фамилни случаи	33	9	6
Спорадични случаи	30	7	5
Случаи с неизвестна наследственост	9	4	3

БА- болест на Алцхаймер, ФТД- фронтотемпорална деменция

II-Цялостно екзомно секвениране и невропатологично изследване при фамилия с деменция с ранно начало

Проведени са подробни невропатологични изследвания и генетични изследвания със цялостно геномно секвениране при тази фамилия с подробно описание на генотип-прототип-фенотип корелации.

III- ApoE полиморфизъм и ликворни биомаркери

Проучването е провеждано в Клиниката по психиатрия, Technische Universität München, Мюнхен, Германия при 117 дементно болни страдащи от БА (от които 62 пациенти с БА с ранно начало) (таблица 2). При тях са проведени подробни клинични, невропсихологични, невроизобразяващи изследвания (включително FDG-PET и амилоид PET), изследване на ликворни биомаркери и ApoE генотипизиране. Пациентите са подбрани и обработени след подробен анализ и интерпретация на всичките изследвания от страна на дисертанта по време на научния престой в Мюнхен-Германия. Този труд е резултат на интереса на дисертанта към ApoE полиморфизма и ефектите му върху БА, като продължение на предишния й труд. Целта на настоящото проучване беше да се изследват асоциациите на честотата на ApoE ε4 алела, генотипа, възрастта, пола и възрастта на дебюта с нивата на ликворните биомаркери Aβ1-42, t-tau и p-tau в моноцентрова, специализирана за когнитивни нарушения клиника при група пациенти с БА, по-голямата част от които са с БА с ранно начало.

Таблица. 2. Клинична характеристика на групите

Характеристики	**Обща БА** (n=117)	**БА с ранно начало** (n=62)	**БА с късно начало** (n=55)
Пол (мъже/жени)	57/60	28/34	29/26
Продължителност на заболяването	2.5 (2.3)	2.7 (2.6)	2.2 (1.8)
Образование (години)	12.2 (3.9)	12.3 (4.2)	12.1 (3.5)
MMSE	22.3 (4.3)	23.2 (3.7)	21.5 (4.7)

Данните са средно аритметични (±SD); БА- болест на Алцхаймер; MMSE- Mini Mental State Examination

IV- Клинико-генетични проучвания при първи доказан случай на невроакантоцитоза в България

В допълнение към подробните клинични, невропсихологични и невроизобразяващи методи, са проведени подробни анализи на червените кръвни телца. Описва се също ефекта от терапията при този случай.

Контролни групи от клинично здрави лица

В проучването участват и 40 клинично здрави лица. При тях са проведени тестовете от невропсихологичната батерия. Контролната група е съставена от клинично здрави лица, които съответстват по възраст, пол и образователен ценз на пациентите. Те не съобщават данни, нито имат симптоми за каквото и да е неврологично или психиатрично заболяване и невропсихологичното изследване не показва нарушение на когнитивните им функции.

Глава 4. Собствени проучвания

4.1. Честота, фенотипна вариабилност и невропсихологични и невроизобразяващи характеристики на *C9orf72* мутации в българска кохорта от дементно болни

Неотдавна, експанзията на хексануклеотида GGGGCC в C9orf72 гена бе идентифицирана като обща генетична причина за ФТД и ЛАС и тази обща група заболявания се реферират като група заболявания с9ФТД/ЛАС (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011; Gijselinck I, 2011).

Ние изследвахме честотата на патологичната експанзия на C9orf72 хексануклеотидно повторение в кохорта от ФТД и сродни заболявания (n=135). Описваме подробно клиничните, невропсихологичните и харастеристиките от невроизобразяването на 4 носители на C9orf72 мутация с широк фенотипен спектър на невродегенеративни заболявания и атипични клинични и невропсихологични прояви.

Материал и методи

Предвид нарастващите доказателства за генетично и клиникопатологично припокриване между невродегенеративните заболявания, ние провеждаме нашия анализ при кохорта,

съставена от 82 пациенти със заболявания в спектъра на ФТД, 32 пациенти с БА с ранно начало (фамилна БА с ранно начало и/или БА с ранно начало с нетипична клинична характеристика), 5 пациенти с БА с късно начало и автозомно-доминантно унаследяване и 16 пациенти с други смесени заболявания с ранно начало/фамилни невродегенеративни заболявания, протичащи с деменция. Спектърът от ФТД нарушения се състои от 42 пациенти с п-ФТД, 12 пациенти с нф-ППА и 5 пациенти със семантичен вариант на ППА. Диагноза ФТД-ЛАС е поставена на 7 пациенти. 13 пациенти са с клинична диагноза на КБС и 3 пациенти са с ПСП, в съчетание с п-ФТД. Други смесени с ранно начало/фамилни невродегенеративни заболявания включват ранен паркинсонов синдром, спиноцеребеларна атаксия и мултисистемна атрофия, деменция с ранно начало, в съчетание с левкоенцефалопатия и/или мозъчна хеморагия.

Резултати

Тази кохорта (135 пациенти с деменция) включва 29 случая с автозомно доминантно унаследяване, 48 фамилни случаи, 42 спорадични случаи и 16 лица с неизвестна наследственост. Средната възраст на дебюта на заболяването е 55.9 ± 9.0 години, в диапазона от 23 до 77 години. Ние открихме, че 27 лица от нашата кохорта (20%) са с възраст на дебюта ≤50 години. Клиничните характеристики на пациентите, са представени в таблица 1.

Честотата на *C9orf72* мутациите

От 135 скринирани случая са открити 4 пациенти, които са носители на C9orf72 мутацията. Тази мутация е открита в хетерозиготно състояние. Резултатите показват, че 3/82 (3.7%) от всички случаи на ФТД и 1/37 (2.7%) от всички случаи на клинична БА имат C9orf72 мутация. Не са идентифицирани мутации в 16-те случаи с други невродегенеративни заболявания.

Клинични, невроизобразяващи, поведенчески и невропсихологични данни

Демографски данни за 4-те пациента носители на C9orf72 мутация са обобщени в таблица 3. Неврологичните и поведенческите симптоми са описани по-подробно в таблици 3 и 4. Визуалните оценъчни скали разкриват вариабилност при отделните случаи. Общите данни от МРТ визуални оценъчни скали за тези случаи са обобщени в таблица 5. Клиничният фенотип е вариабилен при 4-мата пациенти със C9ORF72 мутации. Единият пациент е диагностициран клинично като ФТД-БДН, другият пациент е с П-ФТД, третият е с ПСП, в съчетание с прояви на поведенчески вариант на ФТД и четвъртият е с клинично вероятна БА.

Невропсихологичните изследвания са представени в таблица 6.

Таблица 3. Клинична характеристика на пациенти със C9orf72 мутация

Характеристики	Случай 1	Случай 2	Случай 3	Случай 4
Клинична диагноза	П-ФТД	ФТД/ЛАС	ФТД-ПСП	Вероятна БА
Пол	М	ж	Ж	м
Дебют	50	50	49	61
Възраст на диагнозата	57	52	53	65
Продължителност на заболяването (години)	12	4	5	8
Възраст при смъртта	-	54	54	69
Наследственост	Фамилен	доминантен	Спорадичен	Доминантен (смесено начало)
Начални симптоми	Поведенчески нарушения, тревожност	Апатия, брадикинезия	Дезорганизация, падания, поведенчески нарушения	Паметови нарушения
Неврологичен статус				
o Оживени рефлекси	+	+	+	+
o Хофман	-	+	-	+
o Бабински	-	+	-	-
o Орални автоматизми	+	+	+	+
o Псевдобулбарен синдром	+	+	+	-
o Булбарен синдром	-	+	-	-
o Ригидност	+	+	+	+
o Брадикинезия	+	+	+	+
o Постурална нестабилност	-	+	+	-
o Тремор	-	-	-	-
UPDRS – III	18	27	44	14
Допа-отговор	+	-	-	-
GDS	4	5	4	4

БА- болест на Алцхаймер; ПСП- прогресивна супрануклеарна парализа, п-ФТД- поведенчески вариант на ФТД; ФТД-ЛАС- фронтотемпорална деменция/латерална амиотрофична склероза; UPDRS- Unified Parkinson's Disease Rating Scale; GDS- Geriatric Depression Scale; ж- женски пол; м-мъжки пол;

Таблица 4. Основни поведенчески нарушения при пациенти със C9orf72 експанзия

Frontal behavior Inventory (FBI) (Kertesz, et al, 2000)	**Случай 1 (п-ФТД)**	**след 1 г.**	**Случай 2 (FTD/ALS)**	**след 1 г.**	**Случай 3 (ФТД-ПСП)**	**Случай 4 (БА)**	**след 2 г.**
MMSE	20	15	26	24	25	23	14
FBI-A	18	25	15	21	21	5	18
o Апатия	3	3	3	3	2	1	2
o Аспонтанност	3	3	3	3	2	1	2
o Индиферентност	1	2	1	2	2	0	2
o Ригидност	2	3	2	3	3	1	2
o Лично неглижиране	2	3	1	2	3	0	2
o Дезорганизация	3	3	2	3	3	1	3
o Липса на внимание	1	2	2	2	3	1	2
o Некритичност	2	3	1	2	2	0	2
o Логопения	1	3	0	1	1	0	1
o Семантична деменция	0	0	0	0	0	0	0
o Афазия	0	0	0	0	0	0	0
o Апраксия	0	0	0	0	0	0	0
FBI-B	14	25	5	8	17	2	10
o Персеверации	2	2	3	3	3	1	1
o Раздразнителност	1	3	0	1	0	1	2
o Прекомерна шеговитост	0	0	0	0	0	0	0
o Импулсивност	3	3	1	2	2	0	0
o Колекционизъм	1	3	0	0	0	0	0
o Неуместност	2	3	1	1	3	0	1
o Скитане	1	3	0	0	0	0	2
o Агресия	1	2	0	0	0	0	1
o Хипероралност	1	2	0	0	2	0	2
o Хиперсексуалност	0	0	0	0	2	0	0
o Утилизационно поведение	1	1	0	0	2	0	0
o Инконтиненция	1	3	0	1	3	0	1
FBI – обща оценка	**32**	**50**	**20**	**29**	**38**	**7**	**28**

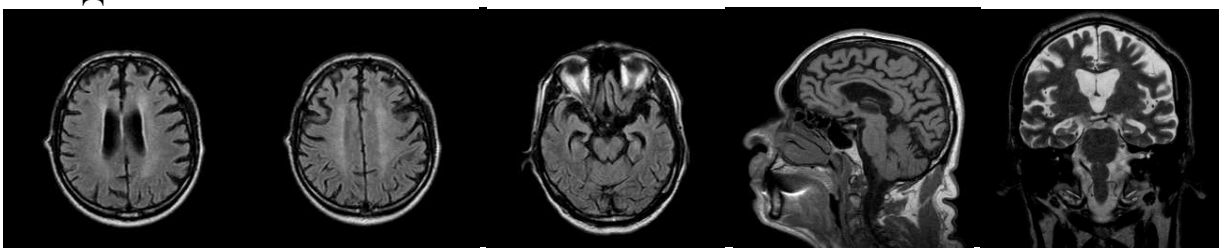
БА- болест на Алцхаймер; ПСП- прогресивна супрануклеарна парализа, п-ФТД- поведенчески вариант на ФТД; ФТД-ЛАС- фронтотемпорална деменция/латерална амиотрофична склероза; FBI - Frontal behavior Inventory; MMSE- mini mental state examination;

Таблица 5. Визуални оценъчни скали (MRI) при пациенти със C9orf72

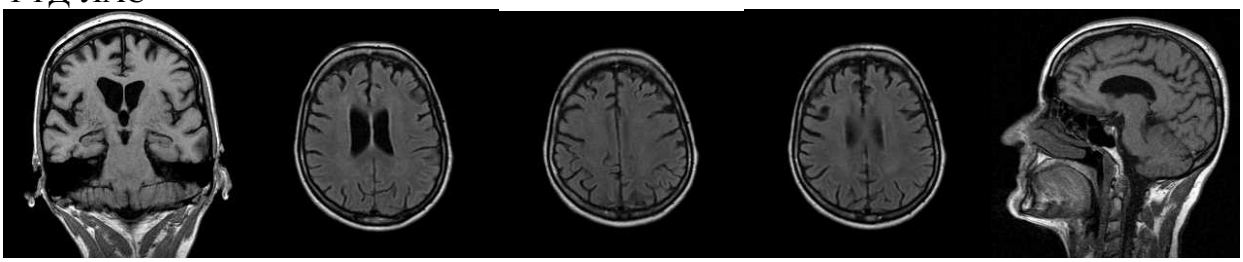
Визулни оценъчни скали (MRI) (дясно/ляво)	**Случай 1 (п-ФТД)**	**Случай 2 (ФТД/ЛАС)**	**Случай 3 (ФТД-ПСП)**	**Случай 4 (БА)**
MMSE (по време на изобразяването)	20	26	25	23
MTLA atrophy (0-4)	2/2	1/1	2/2	2/2
Modified Fazekas scale (0-3)	2	0	1	1
Posterior Atrophy (0-3)	0/0	0/0	0/0	2/2
Lobar atrophy				
Anterior temporal lobe (0-4)	2/2	1/0	0/0	2/2
Posterior temporal lobe (0-4)	2/2	0/0	0/0	2/2
Global Cortical Atrophy (0-3)				
• **Frontal**	2/2	1/1	0/0	1/1
Ventricular dilatation				
• **Frontal**	1/1	1/1	1/1	1/1
• **Parieto-occipital**	1/1	1/1	1/1	1/1
• **3-rd ventricle**	2	0	1	1

БА- болест на Алцхаймер; ПСП- прогресивна супрануклеарна парализа, п-ФТД- поведенчески вариант на ФТД; ФТД-ЛАС- фронтотемпорална деменция/латерална амиотрофична склероза; MMSE- Mini Mental State Examination; MTLA- Medial temporal lobe atrophy;

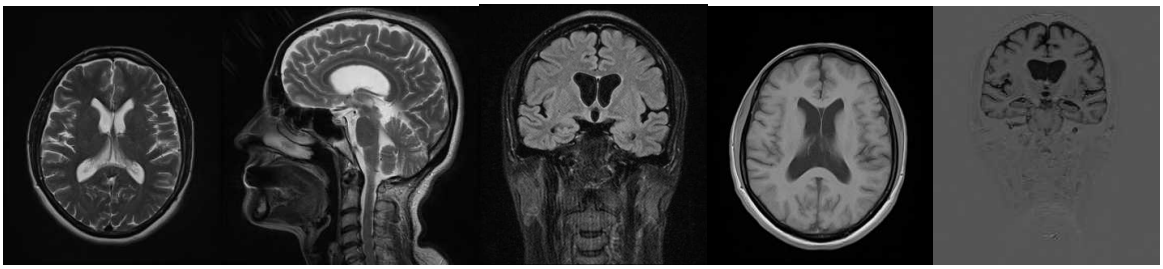
П-ФТД



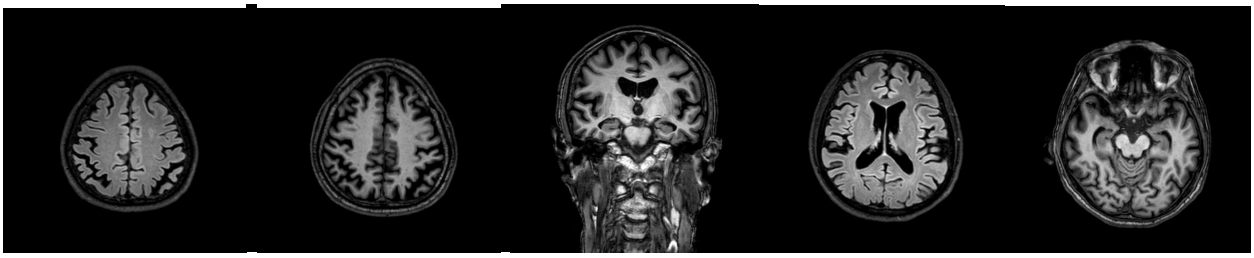
ФТД-ЛАС



ПСП



БА



Фиг. 3. МРТ на главния при случаите, носители на C9orf72 мутации

Таблица 6. Невропсихологични изследвания при пациенти носители на C9orf72 мутацията

Невропсихолигични изследвания	**Случай 1**	**Случай 2**	**Случай 3**	**Случай 4**
Клинична диагноза	П-ФТД	ФТД/ЛАС	ФТД-ПСП	Вероятна БА
MMSE	20/30	26/30	25/30	23/30
Вербална епизодична памет				
Buschke (FCSRT)				
o Свободно припомняне	20/48	19/48	31/48	14/48
o Общо припомнянel	30/48	43/48	45/48	26/48
o Отсрочено свободно припомнянel	2/16	6/16	10/16	4/16
o Общо отсрочено припомняне	4/16	10/16	16/16	10/16
o Разпознаване	40/48	45/48	46/48	36/48
Невербална памет				
o Rey–Osterrieth complex figure test (ROCF) – отсрочено припомняне	-	-	21/36	-
o Copy figure test (CERAD) отсрочено припомняне	5/11	7/11	-	4/11
Краткосрочна памет				
o Digit span forward	5	7	7	6
Работна памет				
o Digit span backward	3	4	4	4
Внимание/Екзекутивни функции				
o TMT-A	215 (2 гр.)	136 (1 гр.)	NA	127
o TMT-B	NA	360 (5 гр.)	NA	245 (3 гр.)
o Stroop test				
I	51	40	NA	64
II	31 (1 гр.)	29 (2 гр.)		55
III (incongruent)	15 (5 гр.)	17 (4 гр.)		31 (3 гр.)
Вербална флуентност				
o Фонемна (М)	1	2	3	7
o IST	12	21	22	25
Зрително-пространствени функции				
o Rey–Osterrieth complex figure test (ROCF)	-	-	31/36	-
o Copy figure test (CERAD)	9/11	10/11	-	7/11
Езикови функции				
BNT	13/15	13/15	13/15	14/15
BDAE – разбиране/команди	13/15	14/15	-	11/15
BDAE – разбиране на параграф	-	-	9/12	-
BDAE – разбиране на четене (думи)	8/8	8/8	8/8	8/8
Вербална флуентност				
o Семантична	6	11	9	15
Апраксия	Лека (идеомоторна, символна)	-	-	-
Agraphia	+ (аграфия)	+ (аграфия)	Микрография	-

БА- болест на Алцхаймер; ПСП- прогресивна супрануклеарна парализа, п-ФТД- поведенчески вариант на ФТД; ФТД-ЛАС- фронтотемпорална деменция/латерална амиотрофична склероза;

Дискусия

В тази специализирана клинична кохорта с деменция, ние открихме, че от всички клинични случаи на ФТД, 3,7% са носители на *C9orf72* мутация и при 2,7% от всички клинични случаи на БА се открива C9orf72 мутация. Тези данни предполагат слабо разпространение на *C9orf72* мутации в Българска популация от дементно болни. Ние описахме 4 фенотипа, свързани с *C9orf72* експанзии: БА, П-ФТД, ФТД-ЛАС и ФТД-ПСП, които подчертават изявена клинична хетерогенност на този синдром в българската кохорта. Клиничните, поведенческите и невропсихологичните характеристики (особено сферите на паметта и езика) и невроизобразяването варират значително в отделните случаи.

Разпространението на *C9orf72* експанзията в българска група пациенти с ФТД е в съответствие с най-ниския диапазон от скорошни проучвания в кохорти от Европейски произход (2-19%) (Majounie E, 2012). По-ниската честота на C9orf72 мутациите в българската кохорта може да се обясни с по-далечното местоположение на България от Северна Европа и вероятно липсата на смесване между българската и северно-европейските популации. От друга страна, България не е изолирана популация и има история за популационно смесване.

От кохортата с ФТД, 8,5% (7/82) проявиха клинична характеристика на ФТД-ЛАС. Независимо от това, само един от тях е имал мутация в C9orf72. Проучванията показват, че до 15% от пациентите с ФТД развиват симптоми на БДН, което е в съответствие с намерения от нас брой на индивиди с ФТД-БДН (Mendez, 2015). Индивидите със съчетание на ЛАС и ФТД или с фамилна история на деменция или БДН имат по-висок риск да бъдат носители на *C9orf72* мутация (33% -86%), което показва, че двете заболявания принадлежат към един и същ патогенен континуум (Byrne et al., 2012). За разлика нашите резултати показват само 14,3% на C9orf72 експанзия в българската кохорта с ФТД-БДН, която евентулно може да се обясни с малкия размер на групата или наличие на други неизяснени генетични фактори.

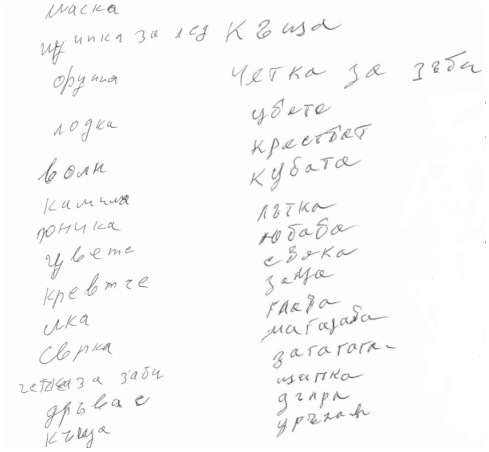
Скринингът на *C9orf72* мутация в нашата кохорта с БА (n=37) доведе до идентифицирането на един от пациентите с БА (2,7%) като носител на патологичната експанзия. Този процент е по-голям, отколкото по-рано описаните честоти на мутацията в кохорти с БА (0.9-1%) (Woollacot T, 2014). Няколко изследвания описват идентифициране на патогенната *C9orf72* експанзия при пациенти с профил на ликворните биомаркери характерен за БА (Wallon et al., 2012) и невропатологично потвърдени случаи на БА (Kohli et al.,2012; Bieniek et al., 2013). Въпреки това, в тези случаи, едновременното протичане на БА, несвързано с C9ORF72 експанзии, не може напълно да се изключи. В две серии от 568 и 424 пациенти с БА не бяха открити патогенни *C9orf72* експанзии (Rollinson et al., 2012; Xi et al., 2012).

Нашите описани случаи със *C9orf72* показаха невроизобразяващи и невропсихологични данни, подкрепящи различна степен на хипокампална атрофия и паметови нарушения от предимно хипокампален тип (три случая) в началото на заболяването. Предполага се, че носителите на *C9orf72* могат да имат по-сериозни паметови нарушения, отколкото пациентите с П-ФТД без *C9orf72* мутацията. Степента на паметовите нарушения варира от лека до изявена, и се открива често в началото на заболяването (Boeve, 2012; Cacase R, 2013; Dobson-Stone C,2012; Mahoney CJ, 2012; Wojtas A, 2012). Както беше обсъдено по-горе, те са значимо изразени, за да доведат до клинична диагноза на БА в някои случаи и

води до предположението, че с9ФТД случаи могат да се проявяват с отчетлив "амнестичен профил", което води до трудности в диференциалната диагностика.
Едновременното присъствие на БДН и екстрапирамидни симптоми в един и същи индивид е рядко явление. Последните изследвания разширяват спектъра на клиничния фенотип свързан със C9orf72, което предполага съществуването на нова нозологична единица покриваща C9orf72-позитивна ЛАС-паркинсонизъм (O'Dowdet al., 2012); тя се предизвиква от изразени патологични промени в екстрамоторните области, включващи нигростриалната система (Ticozzi, 2014).

Изследвания рядко описват намерени *C9orf72* експанзии при пациенти с ПСП. Доколкото ни е известно, само 2 проучвания описват случаи на ПСП със *C9orf72* експанзии. Lesage et al (2013) описват една *C9orf72* експанзия в 123 пациенти с ПСП и Origione et al (2013) съобщават за една открита *C9orf72* мутация при 12 пациенти с ПСП. При никой от нашите случаи с ППА субтипове не е установена *C9orf72* мутация.

Интересното е, че ние откриваме в ранната фаза на заболяването грешки в писмената реч без афазия в два случая с *C9orf72* експанзия. Доколкото ни е известно, нашето изследване е първото проучване, в което са описани грешки в писмената реч без афазия в ранните етапи на заболяването при пациенти с ФТД носители на *C9orf72* експанзия.



Фиг. 4. Аграфия при два случая, носители на C9orf72 мутация

Трябва да се отбележи, че изолираните придобити нарушения при писане на българските пациенти са сравнително редки като изолиран симптом и се наблюдават най-вече в рамките на афазия, главно поради пряката фонема-графема кореспонденция. Тази езикова система (не-прозрачна) прави писането не толкова уязвимо при различните патологични състояния.
Тези резултати показват, че грешките при писане могат да се проявят при пациенти с ФТД със C9orf72 експанзия и те не са просто последици от деменция/афазия. Предполагаме, че това състояние може да се дължи по-скоро на селективно включване на екстра-моторни региони, отколкото на дифузни мозъчни нарушения (Ichikawa 2008). Остава неясно дали грешките при писане са ранен признак за развитието на деменция при пациенти с ФТД и ЛАС носители на C9orf72 експанзии. Грешките при писане се оказаха честа находка при пациенти с ЛАС с булбарно начало в японска популация, въпреки това,

честотата на C9orf72 експанзиите в японската популация е ниска. Възможно е по-скоро тази асоциация да бъде медиатор на основната патология отколкото ефект на мутацията.
В заключение, ние описваме клиничните, невропсихологичните и невроизобразяващите характеристики на четири случаи със C9ORF72 мутации. От 135 проверени случаите, 3/82 (3.7%) от всички случаи на ФТД и 1/37 (2.7%) от всички случаи на клинична БА имат C9orf72 мутация. Мутацията е намерена само в 14.3% (1/7) от кохортата с ФТД-ЛАС. В нашата група, мутацията е открита в случаи с П-ФТД, ФТД-ЛАС, БА и ПСП, като един от тези случаи е спорадичен. Интересното е, че ние намираме ранни грешки в писането без наличие на афазия в двама индивиди с C9orf72 мутации. Това изследване представлява първия генетичен скрининг на C9orf72 мутации в българска кохорта от ФТД/БА пациенти. Това проучване подчертава факта, че C9ORF72 мутациите са в основата на цял спектър от невродегенеративни фенотипове, вероятно включващи БА и ПСП. Този факт има важни последици за клиницистите, които трябва да отсеят невродегенеративни заболявания за генетично изследване. Съществува необходимост от по-подробни проспективни невропсихологични и езикови изследвания на пациенти, скринирани за мутацията C9orf72 и невропатологични изследвания в по-големи кохорти от пациенти, които да отговорят директно на въпроса за анатомичните корелации на фенотипната вариабилност и вероятния сензитивен предиктор на когнитивните нарушения.

4.2. Клинико-генетични проучвания при българска кохорта от пациенти с ФТД и сродни заболявания с следваща генерация секвениране (NGS) технологии

В нашето проучване, с цел по-малко дискриминативна и време-ефективна стратегия на мутационен скрининг, използвахме масивно паралелно секвениране на 17 гени за деменция, за охарактеризиране на вариантния спектър и каталогизиране на генетични вариации, които участват в етиологията на деменция в българската популация с ФТД и сродни заболявания. Това е първото описание на генетичен скрининг на кохорта от български лица с деменция. Подробното описание на извадката е представено в глава „Контингент“. Всички пациенти в тази кохорта са скринирани за варианти в 17 гени, участващи в етиологията на деменция (PRNP, PSEN1, PSEN2, APP, C9orf72, Gene, MAPt, CHMP2B, TARDBP, FUS, SOD, LRRK2, SNCA, PRNP, ApoE, TREM2, SQSTM1, SIGMAR1

Резултати и дискусия

Дескриптивният анализ на кохортите е описан в таблица 1.
Бяха скринирани кандидат варианти с помощта на системен анализ на данните. Техният патогенен потенциал се определи според честотата на вариантите в здрави популации, in silico предиктивни инструменти, и съпоставяне с известни фенотипове. Ние използвахме визуален филтър, за да се идентифицират потенциално патогенните мутации въз основа на няколко критерия за филтриране на предполагаеми неверни положителни резултати, причинени от артефакти. Изключени са по-рано идентифицираните общи варианти (с честота> 0.5%), които са описани в базите данни, включително dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ projects/SNP/,Build 135), HapMap samples и 1000 Genome Project (http://www.1000 genomes.org). Вариантите са подбрани в рамките на кодиращите екзони, и интронни варианти в разстояние от 625 bp от екзона. Синонимните варианти не бяха взети под внимание. Бяха селектирани само некодиращите варианти, които имаха предиктивна оценка от in-silico методи за спрайс-сайт мутации. След визуалния етап за селекция и филтриране на варианти, генетичният скрининг на 135 български пациенти с

ФТД и сродни заболявания доведе до идентифициране на 32 редки/нови кодиращи варианти в PSEN1, APP, PSEN2, PRNP, GRN, MAPt, FUS, CHMP2B, C9orf72, LRRK2, TREM2, SQSTM1, и SIGMAR1 гени в 35 лица. Открит е и един некодиращ вариант в GRN гена в 3 индивида, при които сплайс-сайт мутация се предиктира чрез in-silico методи. Резултатите са показани в таблица 7.

Варианти в PSEN1, PSEN2, APP, PRNP гени

Открит е един нов хетерозиготен кодиращ вариант в PSEN1 гена (c.1054C>T, p.Arg352Cys) в пациент с клинична диагноза на П-ФТД, който има предиктивна патогенна оценка от два функционални предиктивни алгоритми. Допълнителните анализи показват съвместно съществуване на C9orf72 хексануклеотидна експанзия в пробанда (вж предишната глава, случай с п-ФТД). В литературата съвсем скоро са описани изключително редки случаи на съчетанието на мутации в други гени, учасващи в етиологията на деменцията (*GRN*, *TARDBP* и *MAPT)* със C9orf72 хексануклеотидна експанзия. В някои от тях дори патогенността на генетичния вариант е доказан, което поставя въпроса за ефекта върху фенотипа и усложняване на генетичната консултация и предиктивното тестуване (Woollacott, et al, 2014).

Описана е различна мутация в същата позиция (p.InsR352) в PSEN1 гена, която първоначално е била предвидена като патологична мутация, но впоследствие се доказва, че е не-патогенен вариант (Guerreiro, et al, 2011). От друга страна, на близо е разположена друга описана патогенна мисенс мутация с доказан сегрегационнен анализ (Arg377Met) (Janssen, et al. 2003). Предвид данните от литературата и предиктивните програми и характеристиката на варианта, този вариант се счита с неясен патогенен ефект.

Открити са два редки варианта в PSEN2 гена, които са описани преди (Guerreiro et al 2010, Bernardi et al 2008).

Открита е хетерозиготна миссенс мутация в PSEN2 гена (c.415G> A, p.Val139Met) открита в пациент с П-ФТЛД. Този вариант е описан при пациент с фамилна БА по-рано с неясна патогенност и е отчетен от предиктивните програми с висока вероятност за патогенност. Миссенс мутации в PSEN2 гена, причиняващи БА с ранно начало са редки и показват по-късна възраст на дебюта и по-дълга продължителност в сравнение с PSEN1. При същия пациент е открита и нова in-frame делеция във FUS гена (c.684-686 дел, p.Gly231del). Този вариант е определен като патогенен от предиктивните програми. В предишно проучване, ние описахме нова патогенна PSEN2 (Cys391Arg) мутация в спорадичен случай на БА с ранно начало. (Bekris et al., 2010, Трайков и съавт 2007).

Друг хетерозиготен миссенс вариант в PSEN2 гена (c.211C> T, p.Arg71Trp) е открит при пациент със спорадичен паркинсонизъм. Този вариант е описан два пъти преди това като евентуално патогенен/неясна патогенност при спорадична БА с късно начало. Вариантът няма висока патогенна оценка от предиктивните програми и предвид фенотипа на нашия пациент, ние го оценяваме като възможен бенигнен вариант.

Таблица 7. Окрити редки/нови варианти, валидизирани със секвениране по Сангер

Ген	Хр.	Екзон/ позиция	Нуклеотиден вариант	Ефект	Коментар	Диагноза
PSEN1	14	10 73678575	c.1054C>T	Missense p.Arg352Cys	Нов	П-ФТД
PSEN2	1	5 227073297	c.415G>A	Missense p.Val139Met	Рядък	П-ФТД
PSEN2	1	4 227071475	c.211C>T	Missense p.Arg71Trp	Рядък	Ранен паркинсонизъм
APP	21	14 27284152	c.1810G>T	Missense p.Val604Leu	Рядък	П-ФТД АД БА с късно начало
APP	21	12 27327966	c.1562A>C	Missense p.Lys521Thr	Нов	АД БА с късно начало
PRNP	20	2 4680185	c.319A>T	Missense p.Thr107Ser	Нов	П-ФТД
GRN	17	11 42429427	c.1224C>A	Missense p.Tyr408*	Нов	П-ФТД/БА с късно начало П-ФТД; нф-ППА
GRN	17	8 42428492	c.796G>C	Missense p.Ala266Pro	Нов	БА с ранно начало
GRN	17	Intron1 42422705	c.-8+3A>G	Splicing?	Нов	П-ФТД; КБС; П-ФТД
MAPT	17	6 44067341	c.1280C>T	Missense p.Ser427Phe	Рядък	П-ФТД
MAPT	17	6 44067310	c.1249C>T	Missense p.Pro417Ser	Нов	П-ФТД
C9orf72	9	6 27560260	c.703G>A	Missense p.Val235Ile	Нов	П-ФТД (атипичен)
CHMP2B	3	4 87302590	c.461A>G	Missense p.Asp154Gly	Нов	ППА-ФТД
FUS	16	6 31196403-5	c.684-686del	In-frame p.Gly231del	Нов	П-ФТД
FUS	16	14 31202286	c.1396G.A	Missense p.Gly466Ser	Нов	БА с ранно начало поведенчески вариант
LRRK2	12	6 40634318	c.605A>G	Missense Asn202Ser	Рядък	П-ФТД
LRRK2	12	6 40634345	c.632C>T	Missense p.Ala211Val	Рядък	ФТД/ЛАС
LRRK2	12	9 40645075	c.1000G>A	Missense p.Glu334Lys	Рядък	БА с ранно начало
LRRK2	12	21 40687426	c.2769G>C	Missense p.Gln923His	Рядък	Нф-ППА
LRRK2	12	25 40693032	c.3469A>T	Missense p.Ser1157Cys	Рядък	ФТД/ЛАС
LRRK2	12	23 40689336	c.2986G>C	Missense p.Asp996His	Нов	ФТД/ЛАС
LRRK2	12	28 40699684	c.3875G>A	Missense p.Ser1292Asn	Нов	ФТД/ЛАС
LRRK2	12	28 40699642	c.3833A>T	Missense p.Asn1278Ile	Нов	НФ-ППА
TREM2	6	4 41126713	c.574G>A	Missense p.Ala192Ser	Рядък	НФ-ППА
TREM2	6	3 41127543	c.469C>T	Missense p.His157Asn	Рядък	БА с ранно начало
TREM2	6	2 41129133	c.259G>A	Missense p.Asp87Tyr	Рядък	Нф-ППА
TREM2	6	2 41129207	c.185G>A	Missense p.Arg62Leu	Рядък	ППА/П-ФТД ППА/ДРН с моз. хеморагия
TREM2	6	2 41129252	c.140G>A	Missense p.Arg47Leu	Рядък	КБС
TREM2	6	2 41129295	c.97C>T хомозиготен	Missense p.Gln33*	Рядък	П-ФТД (атипичен)
SQSTM1	5	4 (6) 179250906	c.350C>T	Missense p.Ala117Val	Рядък	П-ФТД
SQSTM1	5	4 179250983	c.427A>G	Missense p.Ser143Gly	Рядък	ППА
SIGMAR1	9	4 34635679	c.622C>T	Missense	Рядък	П-ФТД/SCA П-ФТД

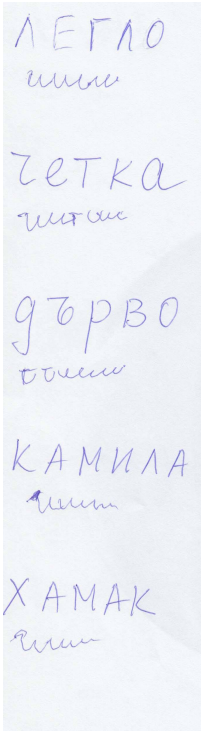
Описваме два не-синонимни варианти в APP гена. Единият, рядък вариант в APP гена, (p.Val604Leu) е идентифициран в две несвързани лица с диагноза П-ФТЛД и автозомно-доминантна БА с късно начало. Въпреки че този вариант се определя като патогенен вариант от някои предиктивни програми, ние предполагаме, че е с неясна патогенност, тъй като се намира извън екзон 16 и 17, където са описани всички патогенни мутации.
Другият открит нов вариант се намира в екзон 12 на APP гена (c.1562T> C, p.Lys521Arg), който се намери и в автозомно-доминантна БА с късно начало при пациента с предишния APP вариант. Някои предиктивни програми го оценяват като патогенен.
Откриване на такива варианти имат голямо значение за бъдещи генетико-клинични проучвания за изясняване на патогенността им, както и евентуално откриване на нови механизми и ефект от мутациите в съответния ген.

Открихме нов кодиращ вариант в екзон 2 на PRNP гена при пациент с фамилна П-ФТД (c.319A> T, p.Thr107Ser). Предиктивните програми го определят като патогенен вариант. От друга страна, при същия пациент се открива патогенен сплайс-сайт (C-8 + 3A> G) мутация в интрон 1 на GRN гена с повече от 50% редукция в серумните му нива на GRN (подробно описание - долу).

Варианти в GRN гена
Нашият мутационен скрининг открива нова frameshift мутация намираща се в exon11 на GRN гена (c.1224C> A, p.Tyr408*) в 4 индивида. Този вариант е идентифициран в един мъж с П-ФТЛД с ранно начало и майка му, при които хода и дебюта на заболяването са твърде различни (клинично вероятна БА с късно начало). Вариантът се откри и в други два индивида с клинични симптоми на П-ФТД и нф-ППА. Тази мутация води до прематурен стоп кодон и поради това се счита за патогенна. Допълнително са представени по-долу и резултатите от серумните нива на GRN при двама от тези пациенти, което е допълнителен фактор в подкрепа на патогенността на тази мутация.
Представен е подробен фенотип на четирима индивиди, както и сравнителни таблици на клиничните, невропсихиатричните и невропсихологичните резултати (Таблици 8,9,10; Фиг. 5,6).



Фиг. 5. Невроизобразяване на главен мозък на случай с П-ФТД и p.Tyr408* GRN мутация



Фиг. 6. Тежка аграфия при пациента с НФ-ППА и p.Tyr408* GRN мутация

Таблица 8. Клинична характеристика на пациенти със p.Tyr408* GRN мутация

Характеристики	Случай 1	Случай 2	Случай 3	Случай 4
Клинична диагноза	П-ФТД	БА с късно начало	П-ФТД	Нф-ППА
Пол	М	Ж	М	М
Дебют	47	67	45	55
Възраст на диагнозата	48	69	49	59
Продължителност на заболяването (години)	3	6	7	7
Възраст при смъртта	50	-	-	62
Наследственост	Фамилен	Фамилен	Спорадичен	Фамилен
Начални симптоми	Поведенчески нарушения	Забравяне	Поведенчески нарушения	Езикови нарушения
Неврологичен статус				
○ Оживени рефлекси	+	-	+	+
○ Хофман	-	-	-	+
○ Бабински	-	-	-	-
○ Орални автоматизми	+	+	-	+
○ Псевдобулбарен синдром				-
○ Булбарен синдром	-	-	-	-
○ Ригидност	-	-	-	+
○ Брадикинезия	+	+	+	+
○ Постурална нестабилност	+	-	+	-
○ Тремор	-	-	-	-
UPDRS – III	9	5	10	32
Допа-отговор	-	-	-	-
GDS	4	1	0	5

БА- болест на Алцхаймер; нф-ППА – нефлуентна първична прогресивна афазия, п-ФТД- поведенчески вариант на ФТД; UPDRS- Unified Parkinson's Disease Rating Scale; GDS- Geriatric Depression Scale; ж- женски пол; м-мъжки пол;

Таблица 9. Основни поведенчески нарушения при пациенти с p.Tyr408* GRN мутация

Frontal behavior Inventory (FBI) (Kertesz, et al, 2000)	**Случай 1**	**Случай 2**	**Случай 3**	**Случай 4**
Диагноза	П-ФТД	БА с късно начало	П-ФТД	Нф-ППА
MMSE	30	24	16	16
FBI-A	26	6	27	22
○ Апатия	3	1	3	2
○ Аспонтанност	2	1	3	2
○ Индиферентност	2	0	3	1
○ Ригидност	3	1	3	2
○ Лично неглижиране	1	1	3	1
○ Дезорганизация	3	1	3	2
○ Липса на внимание	3	1	3	2
○ Некритичност	3	0	3	0
○ Логопения	3	0	3	3
○ Семантична деменция	2	0	0	2
○ Афазия	1	0	0	3
○ Апраксия	0	0	0	2
FBI-B	5	1	33	2
○ Персеверации	1	0	3	1
○ Раздразнителност	0	0	3	0
○ Прекомерна шеговитост	0	1	2	0
○ Импулсивност		0	3	0
○ Колекционизъм	3	0	3	0
○ Неуместност	0	0	2	0
○ Скитане	0	0	3	0
○ Агресия	0	0	3	0
○ Хипероралност	0	0	3	0
○ Хиперсексуалност	0	0	3	0
○ Утилизационно поведение	0 1 0	0	3	0
○ Инконтиненция	0	0	2	1
FBI – обща оценка	31	7	60	24

БА- болест на Алцхаймер; нф-ППА – нефлуентна първична прогресивна афазия, п-ФТД- поведенчески вариант на ФТД; FBI - Frontal behavior Inventory; MMSE- mini mental state examination;

Таблица 10. Невропсихологични изследвания при пациенти, носители на p.Tyr408*GRN мутация

Невропсихолигични изследвания	**Случай 1**	**Случай 2**	**Случай 3**	**Случай 4**
Клинична диагноза	П-ФТД	БА с късно начало	П-ФТД	НФ-ФТД
MMSE	30/30	24/30	16/30	12/30
Вербална епизодична памет Buschke (FCSRT)				
o Свободно припомняне	22/48	-	9/48	-
o Общо припомняне	40/48	-	13/48	-
o Отсрочено свободно припомняне	9/16	-	0/16	-
o Общо отсрочено припомняне	16/16	-	2/16	-
o Разпознаване	47/48	-	30/48	-
CERAD				
Непосредствено припомняне	17/30	15/30	11/30	6/30
Отсрочено припомняне	4/10	4/10	0/10	0/10
Разпознаване	19/20	14/20	11/20	16/20
Невербална памет				
o Rey–Osterrieth complex figure test (ROCF) – отсрочено припомняне	21/36	12/36	0/36	4.5/36
o Copy figure test (CERAD) отсрочено припомняне	9/11	4/11	0/11	-
Краткосрочна памет				
o Digit span forward				
Работна памет	9/14	4/14	3/14	3/14
o Digit span backward	6/14	2/14	2/14	2/14
Внимание/Екзекутивни функции				
o TMT-A	65	105 сек	NA	NA
o TMT-B	178 (1гр.)	невъзможно	NA	NA
o Stroop test				
I	80	55	NA	NA
II	58	45 (2 гр.)		
III (incongruent)	32	13 (4 гр.)		
o Digit symbol	33/90сек.	15/90сек.	5/90 сек	NA
o WSCT	2 (+персеверации)	0	NA	NA
Вербална флуентност				
o Фонемна (М)	6	2	1	0
o IST	33	24	21	3
Зрително-пространствени функции				
o Rey–Osterrieth complex figure test (ROCF)	34/36	20/36	14/36	13/36
o Copy figure test (CERAD)	11/11	8/11	7/11	-
Езикови функции				
BNT	15/15	14/15	14/15	0/15
Вербална флуентност				
o Семантична	16	14	6	3
Апраксия	-	-	Лека кинетична апраксия	+ Умерено тежка

Agraphia	-	-	-	+
FAB	13/18	15/18	10/18	-

БА- болест на Алцхаймер; нф-ППА – нефлуентна първична прогресивна афазия, п-ФТД- поведенчески вариант на ФТД; FCSRT- Free and Cued Selective Reminding Test; CERAD- Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; TMT- Trial Making Test; IST - Isaacs Set Test; FAB- Frontal Assessment Battery;

Един друг нов GRN вариант се откри при пациент с БА с ранно начало (c.796G> C, p.Ala266Pro). Анализът с предиктивните програми смята този вариант за полиморфизъм. Анализът на серумните нива на GRN при този пациент (представени по-долу) показва нива съпоставими със здравата контрола, която е още повече в подкрепа на непатогенността на този вариант.

Ние идентифицирахме и един нов вариант в интрон 1 на GRN гена (C-8 + 3A> G) близо до екзон-интрон границата в три несвързани лица с клинични диагнози в спектъра на ФТД. Този вариант се прогнозира като сплайс-сайт вариант чрез in silico методите. Анализът на серумните нива на GRN при един пациент от тази група показва редуцирани серумни нива на GRN с повече от 50%, в сравнение със здравата контрола. Този факт е в подкрепа на патогенността на този интроннен вариант, който се наблюдава при трима различни индивида.

Клинични, поведенчески и невропсихологични данни

Сравнителни таблици за клиничните характеристики на тримата индивиди, носители на (C-8 + 3A> G) мутация в GRN гена са представени в таблица 11.

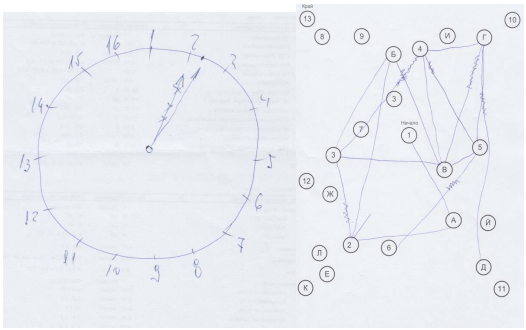
Клиничният фенотип е вариабилен при тримата пациенти с (C-8 + 3A> G) мутация в GRN гена. Единият пациент е диагностициран клинично като езиков вариант на ППА, най-вероятно нф-ППА, вторият пациент с интересното съчетание на нф-ППА и КБС, а третият с П-ФТД (Фиг. 7).

В допълнение към генетичните анализи, на разположение имахме и серум от пациентите носители на варианти в GRN гена. Изследвани са двама пациенти с p.Tyr408* вариант, един пациент носител на (17:42422705 A>G) интронен вариант и един пациент носител на p.Ala260Pro вариант. За този анализ беше предвиден и серум на българска здрава контрола и серум на пациент с (p.Tyr294*) GRN мутация с доказана патогенност. Три серумни проби на пациенти носители два варианта (стоп кодон вариант Tyr294* и интронен вариан с предпологаем сплай ефект 17:42422705 A>G) имат нива на програнулин по-ниски от 55 ng/ml (средно 47.5 ± 6.6 ng/ml ; диапазон 41.7-54.8 ng/ml). Носителите на тези два варианта имат> 50% по-ниски нива GRN, в сравнение с 134.1 ng/ml на здравата българска контрола и 70 пациента без мутации в GRN (Chiang, et al 2013) (средно 141.0 ± 27.6 ng/ml). Пациентът носител на p.Ala260Pro вариант има нормални нива на GRN (140,1 ng/ml) (Таблица 12, Фиг. 8)

Таблица 11. Клинична характеристика на пациенти с (C-8 + 3A> G) мутация в GRN гена

Характеристики	Случай 1	Случай 2	Случай 3
Клинична диагноза	ФТД-ППА	КБС-нф-ППА	П-ФТД
Пол	Ж	М	М
Дебют	68	70	49
Възраст на диагнозата	73	72	55
Продължителност на заболяването (години)	7	3	8
Възраст при смъртта	75	-	57
Наследственост	Автозомно Доминантен	Фамилен	Фамилен
Начални симптоми	Езикови нарушения	Езикови нарушения и забавеност	Поведенчески нарушения
Неврологичен статус			
o Оживени рефлекси	-	-	+
o Хофман	-	-	+
o Бабински	-	-	-
o Орални автоматизми	+	+	+
o Псевдобулбарен синдром	-	-	-
o Булбарен синдром	-	-	+
o Ригидност	+	+	+
o Брадикинезия	+	+	-
o Постурална нестабилност	-	-	+
o Тремор	-	+	
UPDRS – III	23	20	11
Допа-отговор	-	+	-
GDS	Невъзможно	7	0

ФТД-ППА- фронтотемпорална деменция-първична прогресивна афазиям; КБС/нф-ППА – кортикобазален синдром-нефлуентна първична прогресивна афазия, п-ФТД- поведенчески вариант на ФТД; UPDRS- Unified Parkinson's Disease Rating Scale; GDS- Geriatric Depression Scale; ж- женски пол; м-мъжки пол;

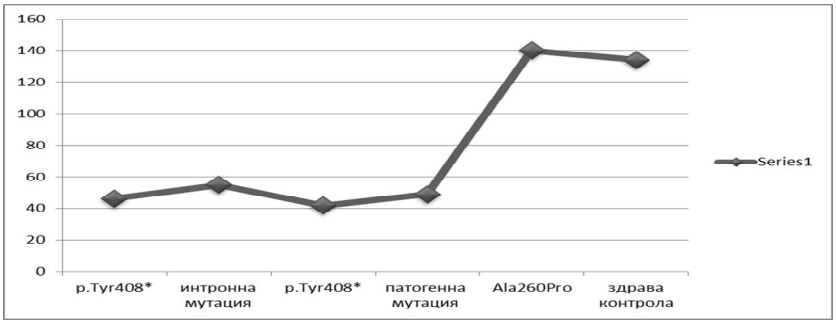


Фиг. 7 Нарушения в зрително-пространствените и екзукутивните функции при пациент с П-ФТД, носител на GRN гена (C-8 + 3A> G)

Таблица 12. Стойности на серумните нива на програнулин при пациенти с варианти в GRN гена, здрава контрола и пациент, носител на патогенна мутация в GRN гена

Пациент	PGRN, ng/ml	Вариант	Промяна в аминокиселина
нф-ППА	46,1	17:42429427 C >A	p.Tyr408*
ФТД-ППА	54,8	17:42422705 A>G	интронен
БА с ранно начало	140,1	17:42428492 G >C	p.Ala260Pro
П-ФТД	41,7	17:42429427 C>A	p.Tyr408*
Здрава контрола	134,1	Няма	Няма
Носител на патогенна мутация	48,9	17:42428777 T>G	p.Tyr294*

ФТД-ППА- фронтотемпорална деменция-първична прогресивна афазия; нф-ППА – нефлуентна прогресивна афазия, П-ФТД- поведенчески вариант на ФТД;



Фиг. 8. Серумните нива на GRN при пациенти носители на GRN варианти и здрава контрола

Вариант в CHMP2B гена

Описваме нов вариант (p.Asp154Gly) в гена CHMP2B при спорадичен случай на езиков вариант на ФТД.

Описание на случай

Пациентката е със средно-техническо образование.Първите симптоми се появяваткогато е на 66 години, с водеща езикова симптоматика - аномия, депресивна симптоматика, поведенческа симптоматика (тревожност, раздразнителност, дезинхибираност, настойчивост, промяна в преценката) като при първите й изследвания (3 години след дебюта на заболяването) е с леко снижен *общ когнитивен статус* MMSE- 28т., в диапазона на леко когнитивно нарушение, амнестичен тип, пробата за вербална епизодична памет CERAD показва умерен дефицит в заучаване и отдалечено припомняне и лек дефицит в разпознаване със съхранена автономна в ежедневието.

Пациентката е проследена клинично и невропсихологично (таблица 13, Фиг. 9, 10), подробно изследвана (респективно 6, 7 и 8 години след началото на заболяването) с картина на плавна прогресивна афазия с аномия и нарушено разбиране, лек паметов дефицит (езиков вариант на ФТД наподобяващ семантична деменция, но с ясни отличия и припокриваща се картина).

Спадът в общия статус е съответно MMSE -22т., MMSE -19т. и MMSE -12т, когато аномията и нарушеното разбиране са тежко изразени. Основната прогресия на нарушенията е във влошената вербална комуникация, по-късно и в епизодичната памет, добавят се поведенчески нарушения, делюзии, стереотипно поведение, промяна в храненето, довели до несамостоятелност 8 години след дебюта на заболяването, което подсказва дълго протичане на заболяването.

Вербалният контакт е ограничен главно поради изразена аномия в иначе плавна логореична „празна" реч с изобилие от описания на липсващите названия, изобилие от местоимения и наречия, параграматични дефицити (несъгласуваност, неправилно използване/дублиране на предлози, съюзи, местоимения). Продукцията е неинформативна, изисква допълнителни уточнявания, тежестта на комуникацията е върху събеседника.

Аномията е изразена в свързаната реч, както и при насочено тестуване на конфронтационно назоваване с BNT -6/15 (6 години след дебюта); BNT -2/15 (7 години след дебюта), при пробата за назовавне на 60 стимула, съотв. 53% успеваемост (6 години след дебюта) и 15% успеваемост (7 години след дебюта), *Повторната реч* остава съхранена на ниво отделни думи и кратки фрази, серии от срички. Речта е артикулаторно коректна, с хиперлалия, редки фонемни замени, редки нарушения в ударението на думите. Самостоятелното писане, устното четене, конструктивните способности в проби за прерисуване (сложна фигура на Rey -36/36, 6 години след дебюта) са съхранени. В задача за подреждане на кубчета по образец („Block design" – 3/13) има изразен дефицит, както и в по-сложни екзекутивни проби (WCST).

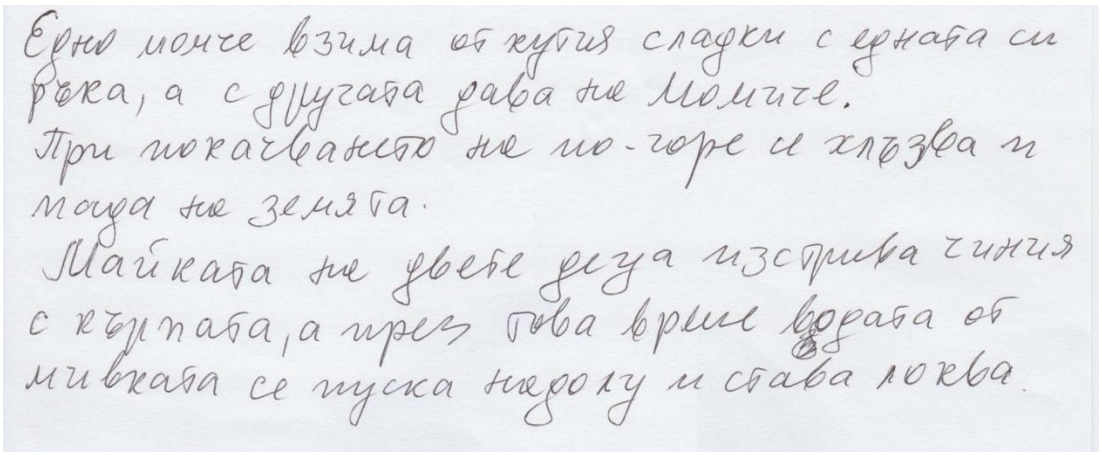
Езиковото разбиране е с леки до умерени нарушения по субтестовете за разбиране от BDAE, Token Test, пробата за граматично разбиране на Kempler, както и в пробата Word – to-Picture Matching Task, като езиковото тестуване през 2013 показва дефицит в разбирането на команди, параграфи, текст, при относително съхранено разбиране на ниво отделни думи, вкл. в семантичните проби (Пробата за вербално асоцииране „Рак и октопод" е в нормални граници 6 години след дебюта)

Самостоятелното писане (Фиг 9) демонстрира аналогичните на устната продукция параграматизъм и логоричност, при иначе коректно писане на думи.

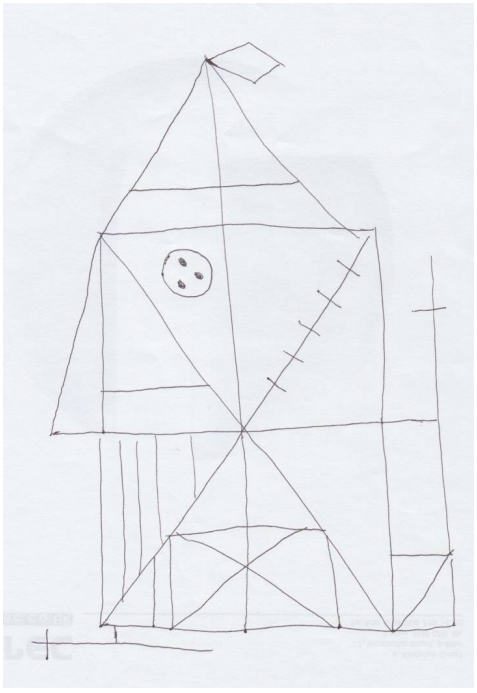
В тестуването (6 години след дебюта) се установяват дефицити в кратковременната и работната памет, във екзекутивните функции, особено в пробите за генериране на думи (Таблица 13).

Изследването на оценка на емоции в проби за разделяне на три групи показа съхранена преценка (46/48), интерес представлява ниският резултат в пробите за прозоп-гнозис – 30/54 в теста на Benton.

Праксис орален и мануален: водеща дясна ръка, лек дефицит при изпълняване на проби за идеомоторен праксис, особено по команда, и с подобрение при имитиране; изразена инертност при серия от мануални позиции, нарушена реципрочна координация.


Ерю мопче взима об кутия сладки с ерната си
ръка, а с другата дава не Момче.
При покачването не по-горе и хлъзва и
пада не земята.
Майката не двете деца изстрива сгиния
с кърпата, а трет това врше водата об
мивката се пуска надолу и става локва.

Фиг 9. Самостоятелно писане при пациент с CHMP2B вариант

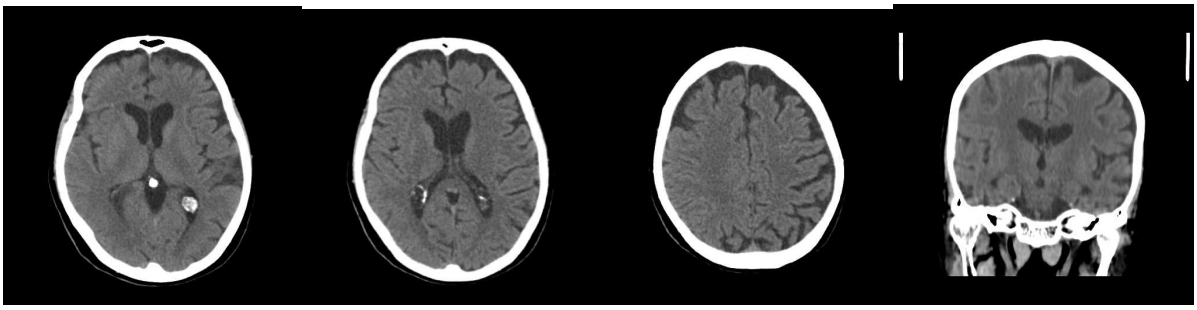


Фиг 10 Зрително-пространствени функции при пациент с CHMP2B вариант

Таблица 13. Невропсихологични изследвания с проследяване на пациент с CHMP2B вариант

Тестове/дата	**3 г. след дебюта**	**6 г. след дебюта**	**8 г. след дебюта**
MMSE (30)	**27-28**	**22**	**12**
CERAD –непосредствено припомняне (30)	8/30	4	
CERAD –отсрочено припомняве (10)	1/10	1	
CERAD разпознаване (20)	15/20	11	
Digit span		5;5	
Isaac's Test		13	6
Категориална флуентност: плод+животни+инстр+ мебели		4+6+1+5 общо16	2+1+0+0 (Общо 3)
Фонемна флунтност: М+К+С		4+6+5 (общо15)	
Rey копиране (36)		36	
Rey припомняве (36)		1	
Мозайка		3/13	
WCST		2 категории	
Stroop – четене (Т; грешки)		47	
Stroop -цветове (Т; грешки)		31 - 4 грешки.	
Stroop –интерфериране (Т; грешки)		14 – 4 грешки	
TMT –А (Т; грешки)		122сек./1грешка	
TMT -Б (Т; грешки)		недостъпно	
Емоции – разпознаване на емоции (48)		46/48 в три категории, 2 грешки във валентност	
Benton лица			30/54
Праксис			
TokenTest (80)	74/80	59/80	
BDAE думи/разбиране (72)	69/72	67/72	
BDAE тяло (20)	19/20		
BDAE команди (15)	11/15		
BDAE разбиране/параграф (12)	6/12	8/12	
BDAE Повтаряне Н (8)	8	7	
BDAE повтаряне L (8)	7	2	
BDAE четене/разбиране (8)	5/8	2/8	
PNO -60	32/60- 53% успеваемост-умерена аномия	9/60 – 15% успеваемост-тежка аномия	
Kempler (24)	22/24	21/24	
Спонтанна реч	Плавна, логорична, аномична, „празна" реч-умерено тежък дефицит	Плавна, логорична, „празна реч", липсват названия - тежък дефицит	
BDAE Writing	Съхранено писане, параграматчни белези	Достъпно писане, параграматизъм	
Повтаряне срички (12)	съхранено	Съхранено	
ПовтарянеRep words (20)	20/20	19/20	
BNT устен (15)	6/15	2/15	
BNT писане (15)		15/15	
Семантична дискриминация (24)	23/24		
Рак и октопод (45)		43/45	
BDAE (оценка 0-5)	2 – възможен разговор с помощ	1- Много ограничена обмяна	

Фамилната анамнеза сочи, че се касае за спорадичен случай. Неврологичният преглед установява оживени СНР с двустранно положителен Хофман, екстрапирамидни симптоми с лека ригидност, постурален тремор (допа-отрицателен) и положителни орални автоматизми.
МРТ на главен мозък показва асиметрична корова атрофия, предимно вляво, в съчетание с лека хипокампална атрофия (Фиг. 11).



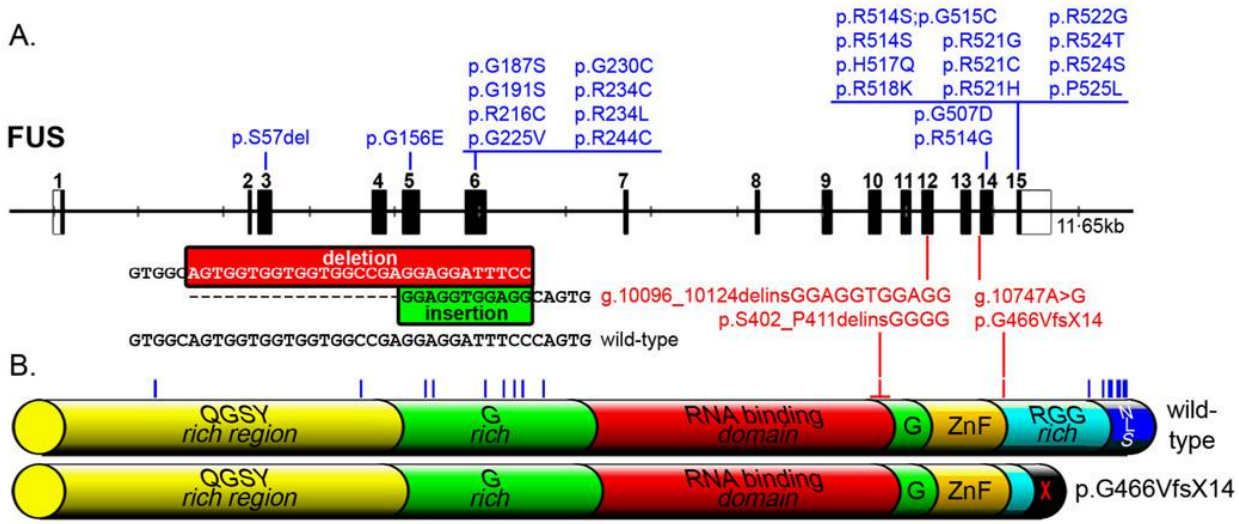
Фиг. 11. Невроизобразяване на случай с нов вариант (p.Asp154Gly) в гена CHMP2B

Описаната от нас нова мутация има висока оценка за патогенност чрез предиктивните програми. От друга страна, в близост до тази мутация е разположена патогенната мутация p.Asp148, с клинична картина на смесен езиков вариант на ППА. Въпреки че много подробни невропсихологични и изикови изследвания не са представени, последният до известна степен прилича на фентипът, описан от нас. Нашите изследвания предоставят много добре езиковите нарушения в лонгитудинален план, който е много ценна фенотипна характеристика. Тези данни ни карат да смятаме, че се касае за вероятно патогенен вариант. Честота описана за тази мутация в нашата извадка от ФТД индивиди представлява 1.2% (1/82), която приближава съобщената честота в белгийска кохорта (0.97% при 1/103 индивида с ФТД) (Van der Zee, et al 2007).

Варианти в MAPT гена
Описваме два некодиращи варианти в MAPT гена (c.1280C> T, p.Ser427Phe – рядък вариант; c.1249C>T, Pro417Ser – нов вариант) при двама пациенти с П-ФТД. Двата варианта са разположени в екзон 6 от MAPT гена, където до момента пагенни мутации не са описани. Бъдещите клинико-генетични изследвания биха допринели до изясняване на характера на мутациите и евентулен механизъм и ефекта от тях. Новият вариант е определен по-скоро като полиморфизъм чрез ин-силико методите. Редкият вариант е определен с висока оценка на патогенност чрез предиктивните програми. Последната я оценяваме на този етап като вариант с неясна патогенност.

Варианти във FUS гена
Откриваме нов кодиращ вариант във FUS гена (c.1396G.A, p.Gly466Ser) при жена с фенотип на фронтален вариант на БА с ранно начало и автозомно-доминантно унаследяване. Дебютът на заболяването е на 60 годишна възраст със забравяне и ранна поява на поведенчески нарушения като делюзии, импулсивност и стреотипност. Девет

години след дебюта на заболяването, пациентката е с умерен дементен синдром, което предполага дълга продължителност на заболяването. Този вариант се прогнозира in-silico като патогенен вариантчрез PolyPhen/SIFT програми. На същата позиция е описана една патогенна стоп-кодон мутация. Ние смятаме този вариант за вероятно патогенен. Интересен е фактът, че почти всички патогенни мутации във FUS гена водят до фенотип на ЛАС. Описан е единствен вариант с неясна патогенност при клиничен фенотип на ФТД (http://www.molgen.vib-ua.be/FTDMutations).



Фиг. 12. **(A)** Схематично представяне на 11.65kb геномен регион на *FUS* показващ описаните мутации до момента на публикацията (**B**) Схематично представяне на структурата на протеина на FUS с неговата организация на домените.
G-insertions/deletions в G-rich региона са толерирани варианти (Van Langenhove T, Neurology, 2010).

Описаната делеция в екзон 6 на този ген (Gly223del) предвид литературните данни, които смятат делециите в този регион като не-патогенни варианти (фиг.12) и http://www.molgen.vib-ua.be/FTDMutations).

Варианти в LRRK2 гена

В нашата кохорта бяха открити 8 редки кодиращи варианти в LRRK2 гена (3 от които бяха нови) в спектъра от случаи на ФТД-ЛАС-БА с ранно начало. Всичките варианти са извън познатите патогенни екзони на този ген. Новите варианти са идентифицирани като патологични чрез in-silico методи и всички редки варианти са с предиктивна стойност за полиморфизъм. Въпреки това, три от отчетените LRRK2 кодиращи варианти (c.632C>T, p.Ala211Val; c.1000G>A, p.Glu334Lys; c.2769G>C, p.Gln923His) са открити в пациенти с фамилен паркинсонизъм, но с неясен патогенен характер (www.molgen.database).

Варианти в TREM2 гена

Интересното е, че ние откриваме също миссенс мутация (c.703G>A, p.Val235Ile) в C9orf72 гена при пациент с хомозиготна мутация в TREM2 гена и с атипичен фенотип на БНХ, наподобяващ П-ФТД и много бърза прогресия. Този вариант се прогнозира като патогенен

чрез in-silico методите. Има описан един случай на миссенс мутация (p.Thr66Ser) в C9orf72 гена без ясен патогенен характер (van der Zee, et al 2013)
Ние открихме nonsynonymous вариант в TREM2, rs75932628 (кодиращ R47H) при пациент с КБС. Този вариант наскоро бе описан като силно асоцииран с БА (Guerreiro et al., 2013a; Jonsson et al., 2012). Rs75932628-T е рядък вариант, който експресира различна честота на минор алела (MAF) при здрави индивиди от различни популации. Rs75932628-T е рядък nonsynonymous вариант, който е описан като генетичен рисков фактор за развитие на БА с ефект подобен на този на ε4 алел ApoE Guegrreiro et al., 2013a; Jonsson et al., 2012). При пациенти с ФТД и БА са открити още четири други редки кодиращи варианти в TREM2 гена, описани по-рано.

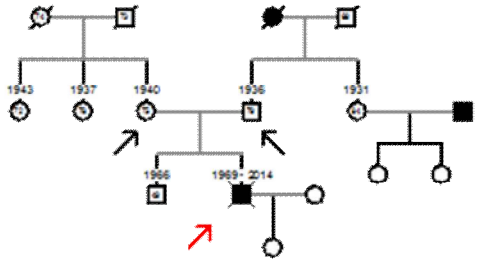
В заключение, невродегенеративните заболявания са подходяща група кандидати за приложение на следващата генерация секвениране (NGS) за изясняване на генетичната етиология на заболяването. Много малък на брой проучвания са публикувани в тази област. Необходими са по-добра оптимизация и валидизиране на технологиите при различни популации от дементно болни. Ние използваме масивно паралелно секвениране на 17 гени, замесени в етиологията на дементните заболявания, за охарактеризиране на спектъра на мутациите, каталогизиране на генетичните варианти и провеждане на клинико-генетични корелации при българска популация от дементно болни. Тази методика има предимството на по-малко дискриминативна стратегия със спестяване на време и средства. Проучването се провежда в кохорта от пациенти с ФТД и сродни заболявания (n= 135). Генетичният скрининг на 135 български пациенти с деменция идентифицира 32 редки/нови кодиращи варианти в PSEN1, APP, PSEN2, PRNP, GRN, MAPT, FUS, CHMP2B, C9orf72, LRRK2, TREM2, SQSTM1, и SIGMAR1 гените в 35 индивиди. Има и един нов некодиращ вариант в GRN гена в 3 индивида, където сплайс-сайт мутация се предиктира чрез in-silico методи. В това проучване е описан подробен анализ на вариантния спектър на тези пациенти.
Това е първото описание на генетичен скрининг в кохорта от български пациенти с деменция, използвайки NGS технология. Откритите варианти са потвърдени от секвениране по Сангер. Чрез скрининга на кохорта от пациенти с ФТД и сродни заболявания, това проучване каталогизира генетичните варианти, които участват в етиологията на деменция в българската кохорта и подчерта различното разпределение на гените причинители в популацията. NGS технологията би могла да се използва в близко бъдеще като стандартен скринингов тест за ранна и точна клинична диагноза на невродегенеративните заболявания на по-ниска цена в сравнение с конвенционалните методи. Направените изводи имат практическа насоченост за развитието на нови политики в здравеопазването, насочени към използването на генетичен скрининг при деменция сред населението, подходящо за молекулярна диагностика с помощта на NGS.

4.3 Клинична хетерогенност на TREM2 мутации - първи генетично доказан случай на болест на Насу-Хакола с атипичен фенотип, наподобяващ поведенчески вариант на ФТД и много бърза прогресия без костни фрактури

Ние представяме първи генетично доказан случай на пациент с болест на Насу-Хакола с атипичен фенотип, наподобяващ поведенчески вариант на ФТД без костни фрактури. Представени са подробни клинични, невропсихологични, невропсихиатрични и невроизобразяващи изследвания на този пациент.

Описание на случай

Пациентът е мъж на 41 години с висше образование. Родителите нямат кръвнородствен брак. Дебютът на заболяването е на 41 години с поява на поведенчески нарушения – изразена апатия, аспонтанност, липса на инициативност, липса на емпатия, лично неглижиране, стереотипност, разсеяност и ювенилно поведение. Година по-късно е освободен от работа поради несправяне с професионалните дейности. Имал затруднения в извършването на ежедневните дейности като справяне с финансите и приемане на лекарствата. Скоро след това се появяват промени на походката, инконтиненция на урина и забавяне на движенията. Изразена дезинхибиция, нарушена преценка, раздразнителност и липса на критичност се добавят към поведенческите промени. Родителите на пробанда са здрави и когнитивно съхранени (Фиг. 13).



Фигура 13. Родословно дърво на пробанда.

Неврологичният преглед установява квадрипирамиден синдром с оживени СНР двустранно, повече вляво; патологични рефлекси от групата на Бабински и Росолимо положителен двустранно, по-изразени вляво; лека спастична долна парапареза; екстрапирамиден синдром - леко ригидно повишен мускулен тонус, повече вдясно; много дискретен постурален и интенционен тремор двустранно в ръцете; тазоворезерворен синдром- инконтиненцио урине ет алви и еректилна дисфункция. Резултатите от изследване на HIV и VDRL са негативни. Серумната биохимия открива високи нива на холестерол и триглицериди.

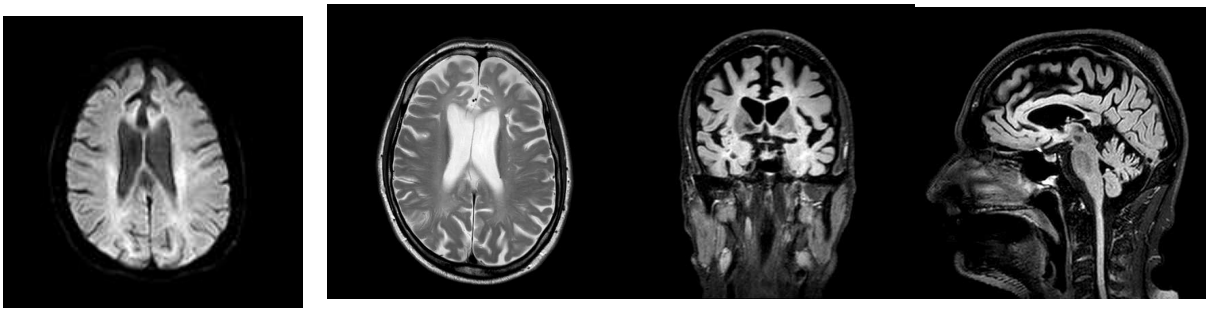
Невропсихологичните изследвания демонстрират лек дементен синдром (MMSE=24) (Таблица 14) със съхранена ориентация, водеща дизекзукутивна симптоматика, в съчетание с паметов дефицит за вербален (смесен тип) и невербален материал. Проведените невропсихиатрични изследвания установяват поведенчески фронтален синдром с оценка на FBI=31;

МРТ на главен мозък установява корова атрофия, предимно фронто-темпорална, дифузна подкорова левкоенцефалопатия, ангажиращи хипокампи, париетални и окципитални дялове и изтъняване на корпус калозум. От проведената КАТ на глава не се установяват данни за калцификати на базалните гангли (Фиг 14).

През следващите две години се отчете бърза прогресия на заболяването. Проследяването на неврологичния и невропсихологичен статус откриват бърз когнитивен спад, влошаване на невропсихиатрични симптоми (FBI=46), долна спастична парапареза, затруднено самостоятелно придвижване и паркинсонизъм. Пациентът е починал на 44 години вследствие на уроинфекция и сепсис.

При секвениране с панел от гени участващи в етиологията на деменция, при пациента се установиха две мутации:

- Мисенс мутация в TREM2 гена със замяна на нуклеотид C с T на позиция 97. Тази мутация конвертираGlnна позиция 33 в стоп кодон, водещ до трункетиран полипептид (c.97C>T)
- Нова мисенс Val235Ilемутация в C9orf72 гена (c.703G>A)



Фиг. 14. МРТ на главния мозък на пациента

Ние представяме пациент с ранна поява на поведенчески и когнитивни нарушения по типа на П-ФТД, с паркинсонизъм, спастична долна парапареза, ранна поява на инконтиненция за урина и еректилна дисфункция. Пациентът няма данни за епилептични припадъци и клинично проявено костно заболяване. Въпреки честите падания, вследствие на спастичната парапареза, не са наблюдавани фрактури на крайниците. Нашият случай последва пет скорошни проучвания, които показват подобна вариабилност в клиничната картина на БНХ, при ливанска, турски, колумбийска и италианска фамилии, носители на различни мутации в TREM2 гена. Интересното е, че пациентите носители на една и съща p.Q33X мутация (като нашия случай) проявяват различен фенотип. Тази мутация е установено за първи път при два засегнати сиблинга от италианска фамилия, с типична клинична картина за БНХ, с дебют на заболяването в трета декада, прогресивни поведенчески и когнитивен спад, костни кисти и епилептични припадъци. МРТ на главен мозък показва дифузна корова атрофия с калцификати на базалните ганглии. Второто съобщение на p.Q33X мутация описва се два засегнати сиблинга от белгийска фамилия с дебют на заболяването към 30 годишна възраст, костни фрактури, дебют на деменция към 38-39 годишна възраст и данни за МРТ на глава за левкоенцефалопатия, корова атрофия, изтъняване на корпус калозум и калцификати на базалните ганглии. Съвсем скоро е описана една турска фамилия, носител на тази мутация, с фенотип подобен на П-ФТД, без костни фрактури, с дебют на заболяването към 20 годишна възраст, с агресивно поведение, епилептични припадъци, офталмоплегия с брадикинезия, с МРТ данни за фронтотемпорална атрофия, изтъняване на корпус калозум, дифузна конфлуираща левкоенцефалопатия и без калцификати на базалните ганглии.

Допълнително при този пациент се установи нова мисенс p.Val235Ilемутация в C9orf72 гена с ин-силико предиктивна оценка за патогеннен ефектна мутацията. Понастоящем, патогенните мутации в C9orf72 гена са установени единствено при експанзии на нуклеотидни повторения в интерон 1 на гена. Има описана мисенс p.T66S мутация (c.196A>T) в този генс неясен характер на патогенност. Има непубликуван случай на мисенс мутация в C9orf72 гена при пациент с патологично доказана ФТД но без доказан ефект на патогенност на мутацията. При този случай, случайно съпътстваща спорадична ФТД не може да се изключи.

Таблица 14. Невропсихологично изследване на пациента - изходно изследване на 42 годишна възраст

Общ когнитивен статус (MMSE)	24/30
Езикови функции	
Назоваване - Boston Naming Test	14/15
Семантична флуентност (1 min)	
- животни	10*
- супермаркет	19
Заучаване и паметови процеси	
Buschke SRT	
Непосредствена памет	5/16*
Свободно непосредствено припомняне	2/48
Общо припомняне (свободно и с подпомагане)	21/48
Свободно отсрочено припомняне	0/16*
Общо отсрочено припомняне	3/16
Разпознаване	45/48
Digit Span Forward	5/14 *
Невербална памет	
o Rey–Osterrieth complex figure test (ROCF) – отсрочено припомняне	0/36
Праксис	
Идеомоторен	Съхранен
Кинетичен	Лека апраксия
Конструктивен	Леко нарушен
Внимание/Екзекутивни функции	
Digit Symbol (90 sec)	13/93*
Digit Span Backwards	3/14*
TMT – A	85s
TMT – B	Невъзможно
Stroop CWT (интерференция)	16 грешки/45s*
WCST	2 категории*
Вербална флуентност- буква М (1 min)	4*
IST	26
Frontal Assessment Battery	10/18*
Зрително-пространствени функции	
o Rey–Osterrieth complex figure test (ROCF)	30/36
o Copy figure test (CERAD)	10/11

* показва патологични стойности; MMSE- Mini Mental State Examination; Buschke SRT- Buschke Selective Reminding Test; TMT- Trial Making Test; WCST-Wisconsin Card Sorting *Test*; Stroop CWT- Stroop Color Word Trial.

Ние представяме първия описан случай в България на пациент с доказана БНХ, носител на хомозиготна мутация в TREM2 гена, с атипичен фенотип, наподобяващ П-ФТД и много бърза прогресия на заболяването без костни фрактури. Литературните данни в съчетание с нашия случай подчертават клиничната хетерогенност и липсата на ясна генотип-фенотип корелация при пациенти, носители на TREM2 мутации. Предполагат се наличието на модифициращи генетични или фактори на околната среда. Съпътстващата точкова мутация в C9orf72 може да допринесе до клиничната хетерогенност и бързата прогресия на заболяването при този пациент. Това генетично заболяване трябва да се включи в диференциалната диагноза на деменция с ранно начало, особено деменция, наподобяваща П-ФТД. Включването на TREM2 гени в панел от гени участващи в етиологията на дементни заболявания е оправдано.

4.4. Copy number вариации (CNV-s) в APP гена

Предвид наличие на случаи с деменция с ранно начало, в съчетание с атипичен фенотип с левкоенцефалопатия и/или интрацеребрални хеморагии, ние изследвахме 6 индивида от нашата извадка с подобна характеристика за наличието на APP дупликации. Използвахме комбиниран метод на микросателитен генотипизиращ маркер с количествен PCR в реално време за детекция на APP дупликации. Ние не намерихме нито една дупликация на APP гена в изследваните лица.

4.5. MAPT мутация при ФТД с много ранно начало, атипична клинична картина и бърза прогресия

Представяме пациент с ФТД с много ранно начало и бърза прогресия на заболяването с атипична клинична картина, носител на Gly389Arg MAPT мутация. Описани са подробните клинични, невропсихологични, невропсихиатрични и невроизобразяващи данни на пациента.

Описание на клиничен случай

Пациентът е леворък, с първи симптоми на запъване и по-бедно изразяване на 31 годишна възраст, по това време станал несръчен, потреперва лявата ръка, променил се почерка и коректността при писане, не можел да извършва добре усвоени действия с двете ръце. Близките забелязват, че все по-тромаво и накъсано говори, примляква, отговаря забавено, с леко приведена стойка, по неизразителна мимика, като продължава да е ориентиран и самостоятелен, справя се с елементарна работа и можел да шофира. Има анамнестични данни за забавено езиково развитие при нормално ранно психично развитие в детска възраст.

Година по-късно невропсихологичното изследване показва снижен *общ когнитивен статус MMSE- 23т.,* съхранена ориентация, акалкулия, аграфия, конструктивна апраксия, прогресивна неплавна афазия с речева апраксия, мануална апраксия и алиенирана лява ръка, дисекзекутивен синдром.

Вербалният контакт е ограничен главно поради нарушена експресия - редуцирана реч, накъсана, апрозодична, с фонемни парафазии, с белези на аграматизъм (самостоятелната реч е еднообразна, стереотипно използва прости конструкции, инверсия на глагола). Назоваването е съхранено с актуализиране на правилни названия, произнасяни с усилие (забавеност, трудна инициация, апрозодия, фонологична редукция, скандиране). Повторната реч е по-добра от самостоятелната, с фонемни парафазии и редуциране на звуковия състав на думите при по-дълги и звуково сложни думи. Греши при повтаряне на серия от фонеми и срички по типа на речева апраксия. Разбира инструкции, изпълнява тристепенни команди, с лек дефицит в по-сложни проби за разбиране (Token Test -77/80). При възприемане на сложен текст не разбира преносен смисъл, не може да изведе поука. Писането е нарушено, трудно - неловко използва лявата ръка, променен почерк - пише с печатни букви, прави опити да пише и с дясната си ръка, с която обикновено не е писал. Грешките при писане са изпускане и замени на букви (параграфии), сливане на думи, персевериране на букви и срички, до невъзможно самостоятелно писане на изречения. В пробите за преписване допуска параграфии (Фиг. 15).

Внамание/екзекутивни функции: Обемът на внимание/работна памет с Digit span: 5 числа в прав ред и 3 в обратен ред. TMT – недостъпно изпълнение в TMT-B, забавено коректно в TMT-A. В теста на Stroop -20 знака при четене, 22 знака при назоваване на цветове, 18 в

пробата за интерфериране, 1 грешка. В пробата за екзекутивни функции WCST е с нисък резултат -1 категория. Много бедно генериране в проби за вербална флуентност – Isaac's – 15/40, генериране по категории (животни, плодове, инструменти, мебели за 1 минута – 6;6;3;7. Фонемна флуентност –генериране на думи с първа фонема «м», «с», «к» за една минута – 1;5;3. *Праксис орален и мануален*: при изпълняване на орални действия по команда са достъпни елментарни действия (хоботче, издуване на бузите, бонбон в бузата), не може да изпълни/затруднено изпълнява символни орални действия („конче", цъкане, целувка, подсвиркване, всумкване), като се провокират примляскванията, изпълнението не се подобрява при имитиране ; също е нарушено преминаването от една позиция към друга (напр. да демонстрира „духане"-„плюене"), стереотипно повтаря едната позиция. Имитирането на позиции (да покаже палец, да направи колелце от показалец и палец, да направи „ушички" от палец и кутре) изпълнява еднакво с лява и с дясна ръка; при проби за демонстриране на инструментални и конвенционални действия има минимален превес в полза на дясната ръка.

Конструктивна апраксия се установява в проби за прерисуване и в задачи за подреждане на кубчета по образец („Block design" – 5/13) още рано при първите тестове на пациента.

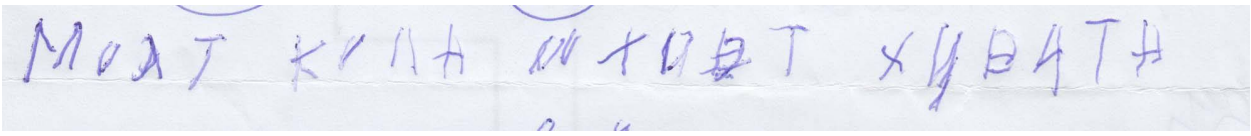
Пробите за памет за вербална епизодична памет (CERAD) показват неравномерна снижена крива на учене с обем на непосредствено припомняне 17/30 – 56%, 1 интрузия, отдалечено припомняне 60%, 100% разпознаване. Вербалната епизодична памет бе тестувана и с пробата на Grober/Buschke, при която се потвърди предимно дисекзекутивния профил на дефицита при учене, отчете се и леко снижен ефект на семантично подпомагане, при почти 100% резултат в разпознаването.

Допълнително бяха тестувани езикови функции със субтестове от BDAE, WAB, кратка версия на Token Test, проба на Kempler за разбиране на граматични конструкции, семантични проби, назоваване, проби за повтаряне на различен материал, които показват леко снижение за езиковото разбиране и семантичните процеси и предимно неплавния – аграматичен и апраксичен вариант на прогресиращия езиков дефицит.

Оценката на поведенческите нарушения, оценени с FBI е 9 като доминиращи поведенческите нарушения са апатия, персеверации и ювенилно поведение. Общата оценка на поведенческите нарушения е значително по-ниска за приетата граница при п-ФТД.

Неврологичният преглед открива квадрипирамиден синдром (Л>Д), с положителен Хофман и Бабински вляво, екстрапирамидни белези с ригидно повишен мускулен тонус и постурален тремор, повече вляво и синдром на чуждия крайник вляво.

Пациентът бе проследен в хода на заболяването, две години след началото на заболяването показва бърза прогресия на болестта с MMSE -3т. (взима листа, назовава «молив», закрива с ръка очите си при четене на команда), силно редуцирана самостоятелна реч , снижени резултатите в тестовете за езиково разбиране, недостъпно тестуване на езикови и конструктивни задачи. В този период близките описват изразен спад в ежедневните дейности.



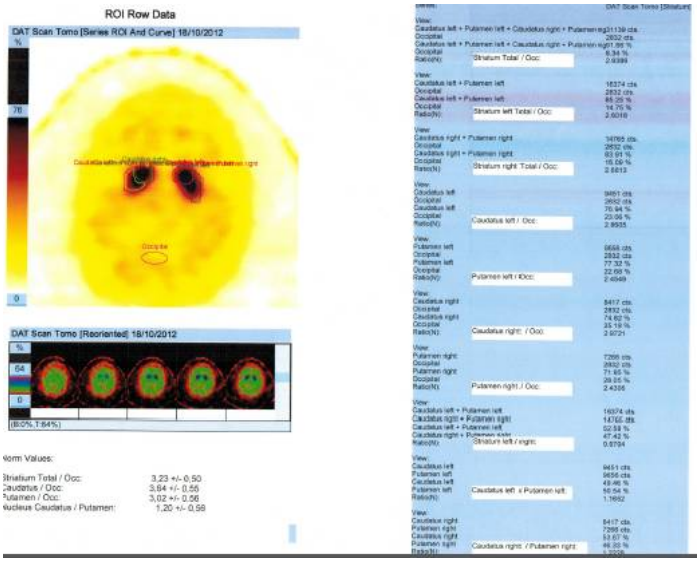
Фиг. 15. Пример на аграфия при пациента в изходното изследване. (МОЯТА КОЛА Е ХУБАВА)

МРТ на главен мозък открива асиметрична корова атрофия предимно фронтотемпорално и повече вдясно. Установява се атрофия на медиален темпорален лоб, изразено вляво (Фиг. 16).
Еднофотонна емисионна компютърна томография (*SPECT) с 123ЙОДdАТСКЕН* показва леко намалено натрупване на радиофармацевтиката в стриатума (Фиг. 17).

Молекулярно-генетичен анализ
При пробанда се проведе молекулярно-генетичен анализ след изолиране на ДНК. Следните гени бяха секвенирани: MAPT (Exon 1-5, 7, 9-13) , GRN (Exon 1 -13), TARDBP (Exon 2-6), FUS (Exon 1-15) and PRNP (Exon 3). В екзон 13 на MAPT гена се отркрива мутация в кодон 389 (c.2170G > A; Gly389Arg).



Фиг. 16. МРТ на главен мозък на пробанда



Фиг. 17. Single-photon emission computed tomography (*SPECT)* изследване при пробанда

Клиничният фенотип при нашия пациент представлява интерес поради изключително рядкото съчетание на нефлуентната ППА с КБС от една страна, и развитие на ППА на фона на предимно десностранна корова атрофия. Последното се случва на базата на това, че пациентът е леворък. Този случай показва някои общи черти и някои различия от фенотиповете, описани при предишните две съобщения за тази мутация. Първият случай описва поведенчески нарушения, пирамидни и екстрапирамидни белези, в съчетание с прогресивни езикови нарушения по типа на Вернике афазия. Тази клинична характеристика предполага поведенчески вариант на ФТД. Описаните прогресивни езикови нарушения се отличават от типа на езикови нарушения при нашия пациент, които определят на първо място нарушения по типа на нф-ППА. От друга страна, поведенческите нарушения не са толкова силно изявени при нашия пациент. При втория случай е описан спорадичен КБС без афазия и установена непълна пенетрантност при бащата на пациента. Предвид това, че родителите на нашия пациент до момента са клинично здрави, може да се предполага същия феномен и при нашия случай. В нашия случай дебютът на заболяването е с около 10 години по-рано, в сравнение с описаните до сега случаи. Наличието на нарушения в развитието на езиковите функции в детската възраст е в съответствие с редките описани случаи на подобни нарушения при случаи с ППА. Поведенческите нарушения не са изявени (не покриващи критериите за П-ФТД) при нашия случай, за разлика от предишните описани случаи.

В заключение, описания от нас спорадичен случай на носител на Gly389Arg мутация в MAPT гена има атипичен фенотип с много ранно начало, бърза прогресия и вероятно непълна пенетрантност.

4.6. Фамилна деменция с ранно начало със сложни невропатологични и геномни данни

В това проучване ние представяме клинични, невропсихологични, невроизобразяващи, невропатологични и генетични наблюдения върху една фамилия с деменция с ранно начало, свързана с комплексен невропатоанатомичен фенотип. Описаното фамилно невродегенеративно заболяване се характеризира клинично с поведенчески/дизекзекутивен вариант на БА с невроизобразяващи характеристики на БА при липсващи Aβ отлагания в мозъка. Вместо това наблюдавахме комплексна таупатия, показваща характеристики на PART (NFT-dementia), ПСП, КБД и AGD, заедно с TDP-43 протеинопатия, която не е съвместима нито с ФТД-TDP, нито с лимбичната предоминираща TDP-43 протеинопатия наблюдавана при случаи на БА. Цялостният екзомен анализ не определи една единствена мутация, причиняваща заболяването, но осигури няколко кандидат мутации.

Въпреки че първият симптом в хода на БА обикновено е нарушение в епизодичната памет, описан е и фронтален вариант на БА, който не е амнестичен (Johnson et al., 1999; McKhan et al., 2011). Фронталният вариант (отнасящ се до предимно поведенческии/илидизекзекутивни нарушения) впоследствие бе включен в новите диагностични критерии за БА-тип деменция (Dubois et al., 2014; McKhan et al., 2011). Тези варианти показват типични невропатологични характеристики на БА с NFTs и Aβ плаки. Въз основа на относително съхранения фронтален кортекс, беше предложено да се предефинират тези клинични синдроми като

"поведенчески/дизекзекутивен" вариант на БА вместо фронтален вариант на БА (Ossenkoppele et al., 2015).

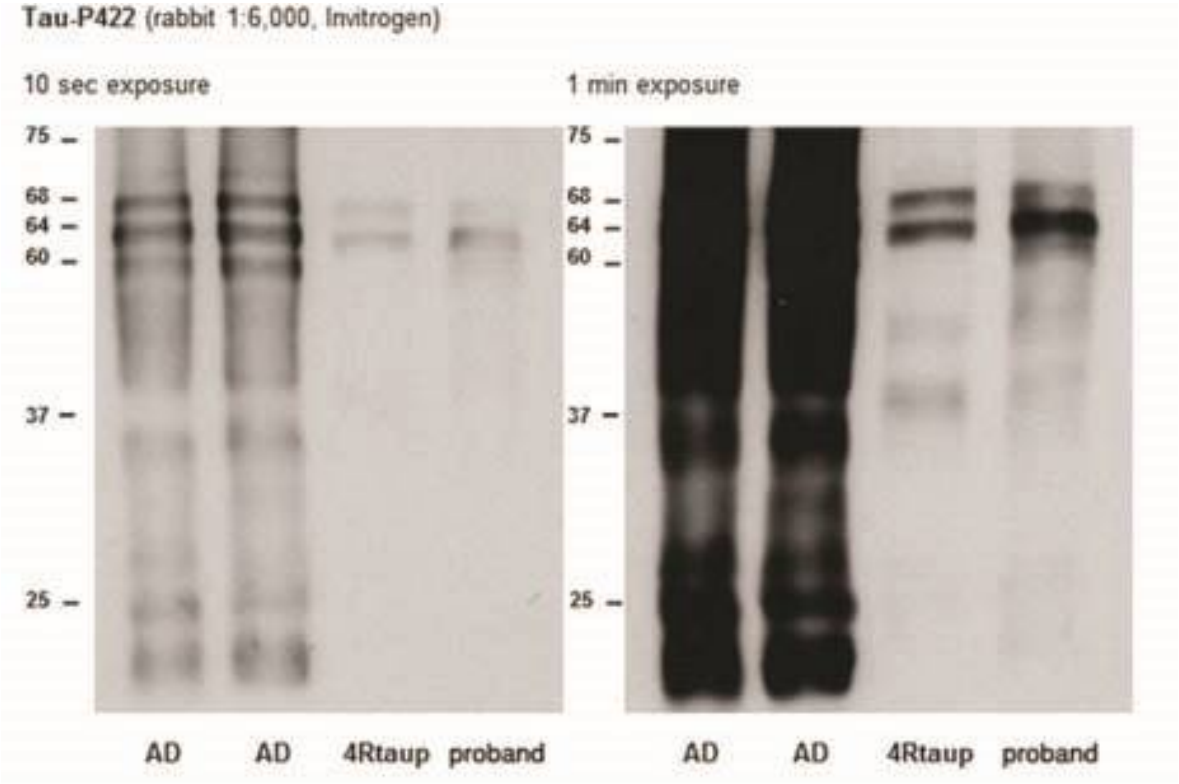
Пробандът показа прояви на ранни и прогресивни поведенчески нарушения. Въпреки това, пробандът не отговаря на клиничните критерии за възможна П-ФТД. При сиблинга се установи ранна поява на амнестичен синдром от хипокампален тип на базата на резултатите от невропсихологичните изследвания. Изследването на епизодичната памет показва значимо нарушение и се характеризира с ниски показатели на свободно припомняне, които не се подобряват от семантично подпомагане, както и дефицити в разпознаването. Тези нарушения са специфични за БА и отразяват корелация с обема на хипокампите. Тези нарушения се приемат като валиден клиничен маркер за типична БА (Dubois et al., 2014). Въпреки че резултатът от FBI при сестрата на пробанда е (25) и доближава патологичната граница за диагнозата ФТД, по-подробното разглеждане на резултатите от поведенческите нарушения, точка по точка, разкриват по-високи резултати за апатия, аспонтанност и по-ниски резултати за персеверации и хипероралност, които повече са в подкрепа на диагнозата фронтален вариант на БА (Woodward et al., 2010).

Когнитивно-поведенческият профил показа в по-малка степен поведенчески нарушения и по-силно изразени когнитивни нарушения, отколкото при пациенти с П-ФТД. Невропсихиатричната симптоматика типична при БА като безпокойство, възбуда и раздразнителност преобладават и при двамата пациенти. От друга страна, при сиблинга наблюдаваме само 2 от шестте основни поведенческо-когнитивни симптоми, което е на границата, необходима за покриване на клиничните критерии за възможна П-ФТД 3 от 6 основни поведенческо-когнитивни симптоми) (Rascovsky et al., 2011). В обобщение, на базата на клиничните симптоми, невропсихологичния профил и по-изразената хипокампална атрофия, в съчетание с по-леката фронтална атрофия предполагаме наличие на клинично-невроизобразяващ фенотип в рамките на поведенчески/дизекзекутивен вариант на БА, както е предложено от Ossenkoppele и колегите (Dubois et al., 2014; Ossenkoppele et al., 2015). Изненадващо, обаче, невропатологичното изследавне на пробанда не разкрива патологични промени по типа на амилоидни отлагания в мозъка характерни за БА.

Невропатологичният фенотип се състои от комбинирана картина на първичните таупатии. Наличието на астроцитни плаки в кората на главния мозък и базалните ганглии заедно с олигодендроглиални навити телца, влакна и изобилие на невронална цитоплазмената уимунореактивност може да се интерпретират като КБД-подобна картина (Dickson et al., 2002). Въпреки това, допълнителното присъствие на много глобуларни NFT в базалните ганглии, субталамичното ядро и мозъчния ствол ни насочва към ПСП и не са съвместими с КБД (Kovacs, 2015). По-специално, липсата на туфи от астроцити и наличието на имунореактивност за 3П изоформата на тау в субкортикалните NFT са необичайни за ПСП.

Обилна NFT патология се наблюдава в хипокампа и базалните ядра на Meynert, наблюдават се също и фантомни (ghost) неврофибрилерни дегенерации. Всички подрегиони на хипокампа, както и гранулираният клетъчен слой на гирус дентатус показаха изразена невронална таупатология, имунореактивност на тау изоформите с 3П и 4П. Това са отличителните белези на NFT-деменция (т.е. липса на Аβплаки) или както наскоро е наречена PART (Crary et al., 2014; Jellinger&Attems, 2007). Въпреки това, съдейки от възрастта на пробанда е неправилно да се тълкува PART типа таупатология като свързана с възрастта, а по-скоро като ускорено стареене на мозъка.

Допълнителното присъствие на аргирофилни телца може да подкрепи тази идея, въпреки че те се асоциират с КБД (Tatsumi et al., 2014).
Таупатологията се характеризира с тау изоформи имунореактивни лезии с 4П, въпреки че присъстват и тауизоформи имунореактивни на неврофибрилерни дегенерации с 3П, което се потвърждава и от биохимични изследвания (Фиг 18). Трябва да се отбележи обаче, че само фронталният кортекс е изследван чрез метода Westernblot. Изразената таупатология е характерна патологична черта на наследствените заболявания, свързани с MAPT мутации (Ghetti et al., 2015). Секвениране на MAPT гена не откри мутации в този ген. Дефекти в няколко други гени могат да се асоциират с таупатология (Kovacs 2015), които при екзомно секвениране не показаха промени в нашето изследване.



Фиг. 18. Sarkosyl-неразтворими фракции покрити canti-phosphorylated tau Ser422 показват две ивици от 68 и 64 kDa при пробанда. Този профил е различен от наблюдавания профил при паралелно проведените проби с БА, при които характерната хиперфосфорилиран тау има профил на ивици с 68, 64 и 60 kDa, в допълнение към по-висока и слаба ивица от 73 kDa и няколко ивици с по-малко молекулно тегло. Профилът на пробанда прилича на успоредно проведената проба при ФТД-4П таупатия.

Интересното е, че са описани LRRK2 мутации в асоциация с лимбичните неврофибрилерни дегенерации или ПСП-подобна патология (Poulopoulos et al., 2012; Santpere&Ferrer, 2009; Wider et al., 2010; Zimprich et al., 2004). В допълнение, експериментални изследвания показват, че *LRRK2* и тау си взаимодействат (Bailey et

al., 2013; Kawakami&Ichikawa, 2015; Li et al., 2010; Li et al., 2009).
В това изследване дадохме приоритет на варианти с различен генотип от незасегнатия член от семейството, които се намират в хромозомни области, които са били унаследени от идентични по произход (ИП) региони при двамата засегнати сиблинга. Важно е, че LRRK2 гена се нарежда на видно място сред трите топ гени в този списък. В допълнение, ние открихме LRRK2 имунореактивност в натрупвания, свързани с таупатологията.
Ние също така наблюдавахме TDP-43 протеинопатия в пробанда, която не бихме могли ясно да класифицираме като предложената за ФТД-TDP подвидове (Mackenzie et al., 2011). Важно е, че такава TDP-43 патология е описана при варианти в *LRRK2* гена (Covy et al., 2009; Ling et al., 2013; Waider et al., 2010). Неочаквано, това е описано (Ling et al., 2013), без съпътстващи телца на Леви в честата G2019S мутация в LRRK2 гена при фамилна болест на Паркинсон (БП) (Zimprich et al., 2004). Проучванията показват, че LRRK2 може да играе роля в растежа на нервните израстъци, поддържането на цитоскелета, транспортирането на везикули, деградацията на протеините на автофагите (Li et al., 2014; Raideout&Stefanis, 2014). Интересното е, че двамата засегнати сиблинги са носители на вариант S1647T, несинонимна мутация, която е свързана с БП в азиатските популации (Zheng et al., 2011), но не споделят хаплотип 1647T-2397T, който по-рано беше демонстриран, че има протективен ефект срещу БП (Wu et al., 2013). Трябва да се отбележи, че другият вариант, който установихме (M2397T) наскоро е описан като асоцииран към мултисистемна атрофия, друга α-синуклеинопатия (Heckman et al., 2014).
Топ генът в списъка на приоритетните варианти беше SYNE2. Мутации в SYNE1 и SYNE2 (наричани също Nesprin-1 и 2) са свързани с множество заболявания, включително аутизъм, церебрална атаксия, и мускулна дистрофия (Zang et al., 2007). Фамилията протеини Nesprin подпомага ядреното и органелното закрепване и позициониране. В нервната система, Nesprin-1 и 2 са известни с регулацията на неврогенезата и миграцията на невроните. Интересното е, че се намира асоциация между SYNE2 и фенотипа при БА, използвайки кластърни анализи за откриване на гени биомаркери (Guttula et al., 2012).
В допълнение, потърсихме гени, носители на stop-loss или stop-gain варианти унаследени от ИП регионите при засегнатите сиблинги и установихме при засегнатите пациенти четири гена със значими мутации, за които е установена асоциация с генните пътища или фенотипове свързани с невродегенеративни или други неврологични състояния. DDI1 принадлежи към семейството на совалковите протеини, насочени към полиубиквитинирани субстрати за протеазомна деградация (Nowicka et al., 2015). Липсват невродегенеративни фенотипове, свързани с мутации в DDI1. Въпреки това обработката на протеина и протеазомната деградация са основни компоненти в патогенезата на невродегенеративни заболявания (Kovacs et al., 2010). KRBA1e ген, който взаимодейства с glycogen synthase kinase-3beta (GSK3B) (Pilot-Storck et al., 2010). Интересното е, че GSK3B и MAPT гените си взаимодействат при БА (Kwok et al., 2008) и GSK3B действа като предполагаем медиатор в аберантната хиперфосфорилация на таупротеин (Jayapalan &Natarajan, 2013).
Новата stop-gain мутация в гена TOR1A също е унаследена от ИП региони при двамата сиблинги. Генът TOR1A предизвиква DYT1, формата на наследствена генерализирана дистония с ранно начало (Leung et al., 2001). Предполага се, че

биохимични промени може да имат по-голямо значение от морфологичните промени при DYT1 (Paudel et al., 2014). Предполага се, че ролята на торзин А се определя като ендоплазмен ретикулум съпътстващ протеин обаче, невропатологичните изследвания не показват преобладаваща таупатия, както се наблюдава в този случай (Paudel et al., 2012). Накрая, ZNF550 принадлежи към семейството на zinc finger proteins, обаче, няма специфични фенотипове, свързани с този ген.

Анализът на генетичните пътища на топприоритетните гени, които могат да са в основата на новия изследван фенотип, показва, че гените, определени за потенциално замесени, включват, или са свързани с гени, които са били предварително асоциирани с БА и БП. Кадхерин сигнализацията се появява като най-силно засегнатият генетичен път. Основните класирани гени изглежда да играят активна роля също в никотин-ацетилхолин рецепторна сигнализация, цитоскелетна регулация чрез RhoGTPase, възпалително медиирани хемокиницитокин сигнализация, VEGF сигнализация и Wnt сигнализация. Интересно е, че всички тези пътища са известнипътища, които по-рано са били замесени в някои аспекти на невродегенеративния процес (Ramanan&Saykin, 2013).

В заключение, описваме една фамилия с прогресивна деменция с ранно начало с атипичен фенотип и атипична невропатоанатомична картина на амигдала-хипокампална и палидо-Лузиан-ниграла дегенерация свързана с комбинирани характеристики на първични тауопатиии TDP-43 протеинопатия, при липса на бета-амилоидиα-синуклеин натрупвания. Биохимични изследвания потвърждават таупатология доминирана от тауизоформи с 4 повторения. Невропатологията разкри нов фенотип, характеризиращ се с комплексна таупатия с TDP-43 протеинопатия. Ние наблюдавахме значително припокриване на първичната таупатия и показахме, че TDP-43 патологията не следва разпространението характерно за ФТД-TDP (Mackenzie et al., 2011) или при БА като съпътстваща патология (Josephs et al., 2014) и може да бъде значимо по-асиметрична (Stefanits et al., 2012). За разлика от познатия факт, че фамилните случаи на деменция са моногенни заболявания, нашият цялостен екзомен анализ подкрепя и хипотеза за поразително сложен комплекс от геномни промени, участващи в забележителен състав на невродегенеративни заболявания.

Ние проведохме цялостно екзомно секвениране при двама от засегнатите сиблинги и една незасегната леля. Чрез идентифициране на идентични по произход региони в сиблингите и класиране на вариантите според техния потенциално патогенен ефект, открихме голям брой потенциални кандидат гени замесени в етиологията, включително LRRK2 и SYNE2. В допълнение, DDI1, KRBA1, TOR1A, и ZNF 550 гените са носители на нови stop-loss или stop-gain мутации само при засегнатите членове.

Анализът на генетичните пътища и протеин-протеин взаимодействията подкрепя хипотезата, че този уникален клинико-патологичен фенотип може да се отдаде на съвкупност от множество гени, взаимодействащи в генетични пътища, които са добре познати като участващи в невродегенерацията със значимо обогатяване на кадхериниклетъчно-адхезионни молекули.

Генетични пътища, генната онтология и анализа на протеин-протеин взаимодействията са в хармония с идеята, че набор от гени, които взаимодействат по различни пътища, може да допринесе за етиологията на комплексните фенотипове.

4.7. Ликворни биомаркери при болест на Алцхаймер: ролята на аполипопротеин Е генотип, възраст, пол и възраст на дебюта на заболяването

Ликворните биомаркери спомагат за подобряване на диагностичната точност при болестта на Алцхаймер (БА), дори в предементния етап на заболяването. ε4-алелът на аполипопротеин Е(ApoE ε4), женският пол и по-напредналата възраст, са добре известни рискови фактори за БА. Не е ясно как тези рискови фактори влияят върху ликворните биомаркери при пациенти с БА. Целта на това проучване е да се изследват асоциациите на ApoEε4, пола, възрастта и възрастта на дебюта, с нивата на ликворните биомаркери в моноцентрова извадка от пациенти с БА, в която голяма част от пациентите са с БА с ранно начало.

Резултати

В изследването са включени данните от 117 пациенти с БА. Пациентските характеристики са обобщени в таблица 15. 49% от пациентите са мъже и 53% са с БА с ранно начало с дебют на заболяването преди 65-годишна възраст. Представени са също така и нивата на ликворните биомаркери, фамилна анамнеза за деменция и честотата на ApoE алела.

Ефектът на *ApoE* полиморфизма върху ликворните биомаркери

Таблица 16 показва средните нива на ликворните биомаркери според ApoE генотипа в цялата група пациенти и съответно в подгрупите на пациентите с БА с ранно начало и тези с БА с късно начало.

Хомозиготните ε4 индивиди в общата група на БА и в групата на БА с късно начало, имат значимо по-ниски нива на Aβ1–42 в ликвора, в сравнение с хетерозиготни ε4 индивиди и тези, които не са носители на ε4 алела (цяла група p =0.002; БА с късно начало p= 0,003). Разликата между хетерозиготните ε4 индивиди и тези, които не са носители на ε4 алела не е статистически значима. Такава връзка не се установява в групата на БА с ранно начало. Асоциациите остават значими след ажустиране за пола и резултатите от MMSE теста.

Нивата на ликворните t-tau и p-tau не показват значими различия по отношение на наличието на един или два ε4алела в нито една от подгрупите, както и цялата група. Подгруппите, както и цялата група не показват значими разлики в нивата на t-tau и p-tau между хомозиготните, хетерозеготните носители на ε4 и тези които не са носители на ε4.

Ефект на възрастта, пола и ApoE статуса върху ликворните биомаркери

Ковариационен унивариативен анализ (ANCOVA) показа, че в общата група пациенти, само *ApoE* ε4 дозата е значимо асоциирана с нивата на ликворния биомаркер Aβ1–42. Полът, както и MMSE резултата и възрастовата група (БА с ранно начало срещу БА с късно начало) нямат значим ефект.

Ефект на пола в комбинация с *ApoE ε4* статуса върху ликворните биомаркери

Пациентите са групирани в зависимост от *ApoE* ε4 статуса (тези без e4 алел (ε4-) и индивиди, носители на поне един e4 алел (ε4+). Жените, носители на поне един e4 алел, имат значимо по-ниски нива на ликворните Aβ1-42, в сравнение с жените без e4 алел. Тази разлика не се наблюдава между мъжете, носители поне на един e4 алел, и мъжете, които не са носители на e4 алел.

Таблица 15. Клинична и генетична (АроЕ) характеристика на групите – разлики между групите пациенти мъже/жени и БА с ранно начало/БА с късно начало

Характеристики	**Обща БА** (n=117)	**Мъже** (n=57)	**Жени** (n=60)	**P**	**БА с ранно начало** (n=62) (мъже, 28)	**БА с късно начало** (n=55) (мъже, 29)	**p**
Възраст на дебют	63.59 (9.1)	65.0 (8.5)	62.3 (9.5)	0.16	57.1 (5.2)	72.2 (5.1)	irrel.
Възраст по време на лумбална пункция	66.9 (9.0)	68.7 (8.1)	65.4 (9.5)	0.057	60.3 (6,5)	74.4 (4.4)	irrel.
Продължителност на заболяването	2.5 (2.3)	2.8 (2.8)	2.2 (1.6)	0.19	2.7 (2.6)	2.2 (1.8)	0.21
Образование	12.2 (3.9)	12.4 (4.0)	12.0 (3.8)	0.55	12.3 (4.2)	12.1 (3.5)	0.77
MMSE	22.3 (4.3)	23.2 (3.7)	21.5 (4.7)	0.03*	21.9 (4.7)	22.8 (3.9)	0.31
Нива на ликворни Aβ1-42 (pg/ml)	541 (186)	515 (153)	566 (212)	0.14	533 (190)	551 (184)	0.61
Нива на ликворни t-tau (pg/ml)	635 (362)	577 (373)	683 (347)	0.11	657 (354)	609 (372)	0.48
Нива на ликворни p-tau (pg/ml)	83 (44)	76 (40)	89 (47)	0.17	65 (8)	80 (38)	0.35
Положителна фамилна обремененост (%)	34.9	35.5	34.5	0.93	39.3	28.9	0.26
АроЕ генотип ○ ε2/ε2 ○ ε2/ ε3 ○ ε2/ ε4 ○ ε3/ ε3 ○ ε3/ ε4 ○ ε4/ ε4	 0 6 4 36 49 22	 0 3 3 15 26 9	 0 3 1 21 23 13	0.61	 0 3 1 20 26 12	 0 3 3 16 23 10	0.87

Данните са представени в средни стойности и стандартно отклонение (SD). Беше проведен сравнителен анализ между групите мъже/жени и БА с ранно начало/БА с късно начало. БА- болест на Алцхаймер; irrel. – неуместен анализ; MMSE - Mini Mental State Examination; Aβ1-42 - amyloid-β 1-42; t-tau - total tau.* $p<0.05$.

Таблица 16. Нива на ликворните биомаркери в зависимост от АроЕ статуса – индивиди, които не са носители на е4 алела, хетерозиготни носители и хомозиготни носители на е4 алела в общата група на пациенти с БА и в отделните групи на БА с ранно начало и БА с късно начало

Ликворни биомаркери		**ε4 (-)** без е4 алел	**Носители на един ε4 алел**	**Носители на два ε4/ε4 Алели**	**p** (ажустирана)
Ликворни нива на Aβ1-42 (pg/ml)	БА	(n=41) 581 (228)	(n=54) 559 (161)	(n=22) 422 (93)	0.002*
	БА с ранно начало	(n=22) 583 (210)	(n=28) 533 (192)	(n=12) 441 (103)	0.176
	БА с късно начало	(n=19) 578 (253)	(n=26) 588 (115)	(n=10) 400 (77)	0.003*
Ликворни нива на t-tau (pg/ml)	БА	(n=41) 591 (342)	(n=54) 647 (375)	(n=22) 667 (377)	0.63
	БА с ранно начало	(n=22) 612 (349)	(n=28) 704 (394)	(n=12) 634 (278)	0.69
	БА с късно начало	(n=19) 568 (342)	(n=26) 602 (355)	(n=10) 706 (483)	0.68
Ликворни нива на p-tau (pg/ml)	БА	(n=41) 71(40)	(n=54) 87(50)	(n=22) 86(34)	0.21
	БА с ранно начало	(n=22) 76 (47)	(n=28) 90 (49)	(n=12) 85 (41)	0.35
	БА с късно начало	(n=19) 70 (32)	(n=26) 81 (39)	(n=10) 89 (43)	0.59

Данните са представени в средни стойности и стандартно отклонение (SD); p-стойностите са ажустирани за пол и MMSE; *Значима разлика между индивидите без е4 алел и хомозиготните носители на е4 алел, както и между хомозиготните носители на е4 алел и хетерозиготните носители на е4: p = 0.001; MMSE - Mini Mental State Examination; Aβ1-42 - amyloid-β 1-42; t-tau - total tau;

АроЕ статус и когнитивни функции

Пациентите са разделени на 3 групи на базата на АроЕ генотипа – не- носители на е4 алел, хетерозиготните носители на е4 и хомозиготните носители на е4. Сравняването на общия когнитивен статус не открива значими разлики между трите групи пациенти с БА. По-подробните изследвания на когнитивните функции не откриват статистически значими разлики за почти всички когнитивни субтестове освен за разпознаване от паметовите субтестове, което има значимо по-ниска стойност в групата на хомозиготните носители на ε4, в сравнение с хетерозиготните и тези, които не са носители на е4 (p = 0.003). Значима разлика също се открива в оценката за ежедневните дейности в групата на тези, които не са носители на е4 алела, в сравнение с хомозиготните и хетерозиготните носители на е4 алела. Важно е да се отбележи, че статистически значима разлика в изолиран показател от когнитивните функции може да не доведе до основно заключение по отношение на когнитивното функциониране. Въпреки това може да се предположи, че по-ниските резултати на разпознаването са във връзка с по-тежка хипокампална дисфункция при пациенти, носители на е4 алела.

Дискусия

Резултатите от това проучване при 117 пациента с БА (53% БА с ранно начало, 47% БА с късно начало), което се проведе в моноцентрова, специализирана за когнитивни нарушения клиника, открива значима асоциация между честотата на ApoE ε4 алела и нивата на ликворния биомаркер Aβ1–42. Хомозиготните ε4-индивиди имат значимо по-ниски нива на ликворен биомаркер Aβ1–42, в сравнение с хетерозиготните ε4-индивиди и тези, които не са носители на ε4 алела. Това предполага дозо-зависим ефект на ApoE ε4 върху нивата на ликворния биомаркер Aβ1–42. Нито полът, нито възрастта или тежестта на деменцията, изследвана чрез MMSE тест, са значимо асоциирани с нивата на ликворния биомаркер Aβ1–42. Не беше отчетена значима асоциация между ApoE ε4 и нивата на t-tau и p-tau в ликвора.

60% от пациентите в нашето изследване са носители на най-малко един ApoE ε4 алел. 18% са хомозиготни ε4-носители. Разпространението на носителите на ApoE ε4 в това проучване е значително по-високо, отколкото се съобщава в немска популация с БА (Kurz, 1996). Мета-анализ направен от Ward и съавт. (2012) установява, че средният процент на разпространение на ApoE ε4 в проучвания при БА е 48,7% (95% CI: 46,5% - 51,0%). Пациентите, включени в проучването, имат подробни изследвания за уточняване на диагнозата, включително подробни невропсихологични изследвания, анализ на ликвора, невроизобразяване на всеки един пациент-при 61% от пациентите е проведена FDG-PET и при 25% амилоид PET образна диагностика в подкрепа на БА. Следователно, вероятността от погрешна диагноза е изключително ниска и по този начин "чистата" кохорта от пациенти с БА може да обясни по-високия процент на носителите на ApoE ε4 от съобщения в популацията на пациенти с БА.

В съответствие с факта, че ε4 алела на ApoE е рисков фактор за развитие на БА, няколко проучвания са показали, че носителите на ApoE ε4, както при когнитивно здрави лица, така и при пациенти с БА, имат абнормни нива на ликворни биомаркери, в сравнение с тези, които не са носители на e4 алела в същата диагностична група (Kester, et al. 2009; Sunderland, et al. 2004; Popp, et al. 2010; Mulder, et al. 2010; Vemuri, et al, 2010, Fjell, et al, 2010; Randall, et al, 2013). Когнитивно здрави лица носители на ApoE ε4 (ApoE ε4+) имат по-ниски нива на Ab42 (Kester, et al, 2009; Vemuri, et al, 2010; Prince, et al. 2004) и лонгитудално по-голям спад в нивата на Ab42 (Stomprud, et al 2010), в сравнение с тези, които нямат e4 алел. Проучванията относно ликворните нива на t-tau са противоречиви. Някои проучвания показват по-високи нива на t-tau при носителите на ApoE ε4 (Goldzik-Sobanska, et al. 2009; Kester, et al, 2009; Golombowski, et al, 1997), докато други не откриват значима връзка между нивото на t-tau и ApoEε4 статуса (Sunderland, et al. 2004; Vemuri, et al. 2010; Huey, et al. 2006).

Нашето проучване открива, че ApoE ε4 генотипът е свързан с по-ниски ликворни нива на Ab1-42 с дозо-зависим ефект, което е в съгласие с по-ранни проучвания и едно предишно проучване на този център (Shaw, et al, 2009; Sunderland, et al, 2004; Verumi, et al. 2010; Palmqvist, et al. 2014, Riemenschneider, et al 2000), но не и t-tau и p-tau (Lautner, et al. 2014; Galasko, et al. 1998; Shaw, et al. 2009; Sunderland, et al. 2004; Verumi, et al. 2010).

Наличието на ApoE ε4 е свързано с абнормни концентрации на ликворни биомаркери (Glodzik-Sobanska et al., 2009; Sunderland et al., 2004), по-висока степен на атрофия на мозъка (Basso et al., 2006; Fleisher et al., 2005; Potkin et al., 2009; Schuff et al., 2009;

Sluimer et al., 2008, Tosun, et al. 2010) и по-голямо амилоидно отлагане в мозъка доказано чрез амилоид PET изследване (Grimmer, et al. 2010; Fleisher, et al. 2013).
Няколко проучвания демонстрират, че амлоидното отлагане установено с амилоид PET изследване се повишава леко с годините при симптоматична БА, докато нивата на ликворните Ab1-42 достигат плато преди продромалния стадий на БА (Buchhave P, et al 2012; Mattsson, et al. 2012). Нашите резултати на понижени нива на ликворните Ab1-42 при пациенти с БА, в диапазон на лека до умерена деменция, са в подкрепа на твърдението, че това е характерна "черта" на носителите на e4 алела, а не само преходно "състояние" при пациенти с различна степен на тежест на деменция.
Как ε4 алела влияе върху нивата на когнитивния спад през предклиничната, продромалната и дементната фаза на БА не е ясно, но основната разлика в нивата на биомаркерите между носителите на e4 и тези, които нямат e4 алел, е в съгласие с предишните литературни съобщения, както и с невропатологични проучвания, които показват, че ε4 алела може да окаже най-силно въздействие върху продромална фаза на БА и подкрепя хипотезата, че когато невродегенеративният процес напредва, тя става все по-независима от изходните събития (Holland et al., 2013).
Все още се дискутира, дали асоциацията на ниските нива на Aβ1–42 в ликвора с наличието на ApoE ε4 следва да се имат предвид при дефинирането на референтните граници на Aβ1–42 при използването му като биомаркер за БА. Някои изследвания посочват, че ApoE генотипът трябва да се има предвид; други, обаче, описват, че праговите нива на Aβ1–42 трябва да бъдат еднакви за всички ApoE генотипове. (Dumurgier, et al. 2014; Palmqvist, et al. 2014).

Важно е да се подчертае, че до този момент, големите проучвания са фокусирани върху връзката между ApoE полиморфизма и нивата на ликворните биомаркери при БА с късно начало и са игнорирали групата пациенти с БА с ранно начало. Това е изненадващо, тъй като патофизиологията, особено по отношение на производството и изчистването на бета-амилоида, изглежда се различава между БА с късно начало и спорадична БА с ранно начало (Bao et al., 2013; Choo et al., 2011; Bateman et al., 2006). Следователно, това е първото проучване, което изследва асоциацията на ApoE ε4 с нивата на ликворните биомаркери специално при пациенти с БА с ранно начало и описва, че при БА с ранно начало, за разлика от БА с късно начало и на цялата група пациенти, честотата на ApoE ε4 алела не се асоциира значимо с нивата на Aβ1-42 в ликвора. Въпреки това, предвид относително малката извадка от пациенти с БА с ранно начало в настоящото изследване, тази констатация трябва да бъде изследвана допълнително в по-големи проучвания.

Нашите резултати показват, че нито пола, нито възрастта поотделно повлияват върху нивата на Aβ1–42, t-tau и p-tau. Макар да е установено, че ApoE ε4, женският пол и по-напредналата възраст са рискови фактори за БА, резултатите от изследването са показателни по отношение на ефекта от женски пол или по-висока възраст за нивата на ликворните биомаркери.
Ние откриваме значимо по-ниско ниво на ликворните Ab1-42 при жени носители на ε4, в сравнение с жени, които нямат e4. Не е ясно как общи генетични рискови варианти и полът влияят върху експресията и прогресията на заболяването. Предишни проучвания показват, че промените в мозъчната структура и функция, свързани със стареенето и БА не прогресират равномерно при различните индивиди

и зависят от възрастта, пола и ApoE статуса (Holland et al., 2013). Някои проучвания намират връзка между пол и ApoE, демонстрирайки, че жените имат по-висок риск от развитие на БА при наличие на e4 (Farrer et al., 1997; Poirier et al,. 1993).
Едно невропатоанатомично проучване показва, че в ранните фази на БА жените, особено носителите на ε4 алела, са изложени на по-висок риск за развитие на неврофибрилерни дегенерации и амилоидни плаки, в сравнение с мъжете (Corder et al., 2004). ДругоADNI проучване показва, че жените и носителите на ApoE ε4 алела имат по-голям когнитивен спад при нормалното стареене, ЛКН и БА. Тези ефекти не са напълно обяснени с изходните нива на протеините, свързани с патологията на БА (Holland et al., 2013).
В заключение, в това проучване ApoE ε4 алела е свързан с намаляване на нивата на Aβ1-42. Този резултат е в съответствие с резултатите от няколко предишни проучвания. В подгрупата на пациенти с БА с ранно начало тази асоциация не се потвърждава. Необходими са по-големи проучвания за по-нататъшно изследване на асоциациите между честотата на ApoEε4 алела и нивата на ликворните биомаркери при пациенти с БА с ранно начало.
Резултатите от това проучване сочат, че за диагностични и терапевтични стратегии при БА може да се имат предвид и ефекта на ApoE статуса и женския пол и тяхната взаимовръзка. От друга страна, тези резултати изискват внимателни бъдещи проучвания върху механизма за намалените нива на ликворните Ab1-42 при носителите на ApoE ε4 и индивидите от женски пол и как тези рискови фактори могат да бъдат поне частично отговорни за някои от наблюдаваните хетерогенности на заболяването. В светлината на бъдещи биомаркери, концепцията за ин виво сурогатни биомаркери трябва да бъде допълнително проучена, за да се уточни връзката между циркулиращите биомаркери и патологичните механизми в мозъка. Използване на селективни ин виво тау невроизобразяване, в допълнение към амилоидно изобразяване в предклиничната и предементната фаза на БА, могат да осигурят много по-точна представа за патологията и връзката й с генетичните рискови фактори, пола и възрастта.

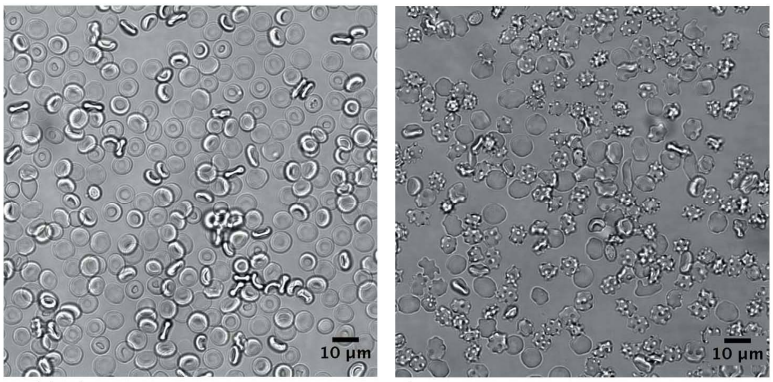
4.8. Първи молекулярно-генетичнодоказан случай на хореа-акантоцитоза в България

Синдромите на невроакантоцитоза (НА) са група генетични заболявания, характеризиращи се с асоциация на акантоцитоза на червените кръвни клетки и прогресивна дегенерация на базалните ганглии. Сред неговите "основни" синдроми са хорея-акантоцитоза (ХА), причинена от мутации на VPS13A гена (Rampoldi et al., 2001) и Х-свързания синдром на McLeod (СМ), причинен от мутации на XK gene (Ho et al., 1994).
Представяме първи молекулярно-генетично доказан случай на ХА при 39-годишна жена, с поведенчески и когнитивни нарушения, проявени няколко години преди появата на двигателните нарушения. Описваме подробните клинични, неврологични, невроизобразяващи, невропсихологични и молекулрно-генетичните изследвания при този пациент.

Описание на случай

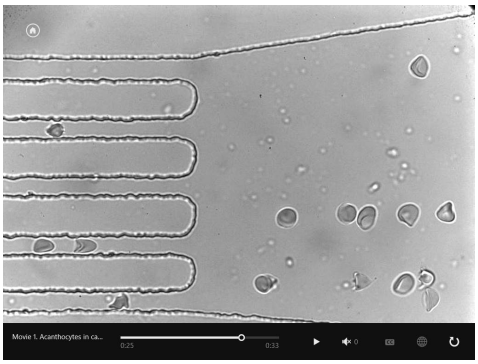
Родителите на пациентката не са родственици и не са имали фамилна анамнеза за неврологични заболявания. На 29-годишна възраст се появяват поведенчески

нарушения: импулсивност, тревожност, проблеми при вземане на решения, обсесивно-компулсивно поведение, както и увреждания на съня. Четири години по-късно пациентката преустановява работата си като шивачка, поради поведенчески промени и скоро след това развива паметови нарушения, проблеми при вземане на решения и нарушения в концентрацията, както и неволеви движения на крайниците.
Близките описват чести прояви на невъздържаност, слаба социална преценка, затруднения с контрола на импулсите и емоциите, лека депресия, стереотипна реч, повишена консумация на цигари и детинско поведение. След започване на лечение с антипсихотици се наблюдава подобрение в хиперкинетичните движения и поведението. Между 34 и 36-годишна възраст пациентката получава пет генерализирани тонично-клонични гърчове, които се купират на фона на лечение с леветирацетам и валпроат.
Пациентката е насочена към нашата клиника на 35 годишна възраст поради хореични движения и тежка мускулна болка със значителни нарушения в ежедневните дейности. Мускулната болка не се повлия от нестероидни противовъзпалителни средства. Мускулната сила в горните и долните крайници е намалена до MRC степен 4, по-специално m. deltoideus, m. supraspinatus, m. pectoralis major, m. quadriceps, m. pectineus, m. sartorius, m. gluteus maximus, m. semitendinosus и мускулите под коляното. Наблюдава се и арефлексия, хорея и дизартрия. Нивата на креатин фосфокиназа (CK) и лактат дехидрогеназа (LDH) бяха повишени съответно до 3280 U/l (при норма <180) и 913 U/l (при норма 120-480).
Молекулярното изследване за болестта на Хънтингтън е отрицателно. Микроскопското изследване на натривки от периферна кръв, на морфологията на червените кръвни клетки, показа наличието на много акантоцити и други деформирани червени кръвни клетки в кръвта на пациентката, но не и в тази на контролата (Фиг. 19).



Фиг. 19 – Кръвна натривка на изолирани червени кръвни клетки на здрава контрола, в сравнение с пациентката с ХА

Преминаването на червените кръвни клетки на пациентката през микрофлуидното устройство, с помощта на метод, описан по-рано (Cluitmans et al., 2014) не разкри никакви пречки за деформираните клетки да преминават през капилярите (представен слайд от филм, Фиг. 20).

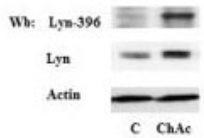


Фиг 20 – Деформация на еритроцитите и капацитета на релаксацията се изследва чрез микрофлуидно устройство с 7 um микроканали, използвайки предишно описан метод (Cluitmans et al., 2014)

Червените кръвни клетки на пациентката съдържат по-малко HbA1c (4.6%) и повече HbF (2.4%), в сравнение с червените кръвни клетки на контролата (6,1% и 1,4%, съответно), което предполага възможно смущение в процесите на матурация на еритроцитите.

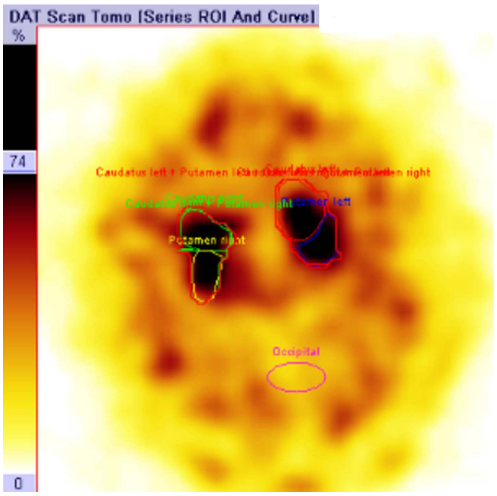
При оценка на съдържанието на хореин в еритроцитите, чрез теста на Western-blot (Dobson-Stone et al., 2004), при пациентката е установено значително намалено ниво и молекулярният генетичен анализ на VPS13A гена (Neutel et al., 2012) разкри две мутации. Мутацията c.9065_9066delAG (p.Gin3022Argfs*10) в екзон 67 е вече известна от предишни случаи (Genereview, 2010). Новата алтерация c.1207C>T (p.Gln403*) в екзон 14 генерира преждевременно стоп кодон и по този начин вероятно също е патогенна.

Образуването на абнормно оформени червени кръвни клетки е свързано с нарушения в пътищата за сигнална трансдукция (Pantaleo et al., 2010). При ХА е описано абнормно активиране на Lyn, която представлява киназа от семейството на Src (De Franceschi et al.,2011; De Franceschi et al.,2014). В нашето проучване оценяваме количеството на активния Lyn (Lyn 396), свързан към мембраната на червените кръвни клетки от пробанда (ХА), в сравнение със здрава контрола. Както е показано на фиг. 21, количеството активен Lyn (Lyn-396) и общият Lyn транслоциран към мембраната са значително повишени при пациентката с ХА, в сравнение със здравата контрола, което е в съответствие с предишни проучвания.



Фиг. 21- Имуноблот анализ със специфични антитела срещу active Lyn (Lyn-396), total Lyn (Lyn), асоциирани с мембраната на червените кръвни клетки на здрава контрола (C) и пациент с ХА (ChAc); actin се използва като loading control protein. Показан е един от трите експеримента с подобни резултати.

ЕНГ и ЕМГ изследвания демонстрират нормална скорост на провеждане по сетивните и двигателните влакна на горните и долните крайници и двустранно миогенни промени в m. biceps и m. gastrocnemius, нормална скорост на провеждане. ЕЕГ показа леко забавена за възрастта основна активност и генерализирани епилептиформени прояви. МРТ на главния мозък установи двустранна атрофия на нуклеус каудатус. Невроизобразяването на допаминовия транспортер (I-123) DAT-SPECT показва намалено натрупване в левия и десния стриатум (Фиг. 22).



Фиг. 22 - Dopamine transporter imaging (I-123) (DAT-SPECT) показва намалено натрупване в левия и десния стриатум.

Невропсихологичните изследвания показват резултати от общ когнитивен статус в границите на нормата, съхранени езикови функции, леко снижени резултати при заучаване и тежки екзекутивни нарушения. Наблюдават се паметови нарушения, с редуцирана непосредствена/краткосрочна памет, лек дефицит при заучаване и свободно отсрочено припомняне, с много добро възстановяване при семантично подпомагане и отлично разпознаване, обобщени като леки паметови нарушения от екзекутивен тип.

Доминиращи нарушения в сферата на вниманието и екзекутивните функции са изразените дефицити в екзекутивния контрол, превключването на психичната активност, ограничения обем на вниманието и работната памет. Изпълнението на Уисконсин теста (Wisconsin Card Sorting Test -*WCST*) за сортиране показва ниски възможности за концептуализация и слаб контрол на вниманието. Потвърди се тежкък дизекзекутивен синдром с много ниски резултати на Stroop теста, бедно генериране при вербална флуентност и go-no go грешки при изпълнение на Frontal Assessment Battery (Таблица 17). Скалата Frontal Behavioural Inventory (FBI), която е изключително подходяща за установяване на основните поведенчески симптоми на фронталния дял, показа 16 точки. Този резултат е в подкрепа на умерено изразените поведенчески симптоми от фронталния дял.

Таблица 17. Невропсихологични изследвания на пациентка с хорея-акантоцитоза - изходно изследване на 35 годишна възраст

Общ когнитивен статус (MMSE)	26/30
Езикови функции	
Назоваване - Boston Naming Test	15/15
Семантична флуентност (1 min)	
- животни	10*
- супермаркет	20
Заучаване и паметови процеси	
Buschke SRT	
Непосредствена памет	12/16*
Свободно непосредствено припомняне	31/48
Общо припомняне (свободно и с подпомагане)	47/48
Свободно отсрочено припомняне	
Общо отсрочено припомняне	9/16*
Разпознаване	15/16
Digit Span Forward	48/48
	5/14 *
Праксис	Лека апраксия
Идеомоторна, кинетична и конструктивна	
Внимание/Екзекутивни функции	
Digit Symbol (90 sec)	19/93*
Digit Span Backwards	4/14*
TMT – A	53s, 1 грешка*
TMT – B	140 s, 3 грешки*
Stroop CWT (интерференция)	15 грешки/45s*
WCST	2 категории*
Вербална флуентност- буква М (1 min)	4*
Frontal Assessment Battery	12/18*

* показва патологични стойности; MMSE- Mini Mental State Examination; Buschke SRT- Buschke Selective Reminding Test; TMT- Trial Making Test; WCST-Wisconsin Card Sorting *Test* ; Stroop CWT- Stroop Color Word Trial.

Диагнозата на хорея-акантоцитоза е доказана въз основа на клинични, електрофизиологични, невроизобразяващи и лабораторни данни. Заради силната болка в мускулите и покачването на нивата на CPK, беше предложена терапия с кортикостероиди.

Започнахме интравенозно вливане на метилпреднизолон 80 мг / ден. В рамките на няколко дни след започване на тази терапия, мускулната болка изчезна и нивото на CPK се понижи до 300 U/l. След 5 дни дозата на метилпреднизолон прогресивно се намаляваше на всеки 5 дни и лечението продължи около два месеца.

След 2 месеца, когато се достигна перорална доза метилпреднизолон 4mg, лечението се прекрати. Не са наблюдавани странични реакции.

При клиничното проследяване на пациентката на 37-годишна възраст се установи периодична поява на прехапване и протрузии на езика, дистония при хранене и издаване на неволеви звуци. Речта е дизартрична и трудно разбираема. Често се появяват аксиални симптоми като падане на главата и флексии и екстензии на туловището. В седнало положение, тези чести движения на туловището предизвикват неволево блъскане на главата в стената. Наблюдава се странна походка,

характеризираща се с клатене на главата, спазми на туловището и внезапни свивания на коленете.
Аксиалните феноми като падане на главата, флексия и екстензия на тялото назад са описани преди това при пациенти с ХА (Dobson-Stone et al., 2004). В едно скорошно проучване, Schneider et al. съобщават, че аксиалните флексии и екстензии са силно подкрепящи черти на клиничната картина на ХА. Въпреки липса на ясна терминология, движенията напред са израз на негативна миоклонична атония, докато движенията назад са израз на дистония. Хореята или позитивните миоклонии могат да са отговорни за аксиалните симптоми свързани с мускулната контракция.
Поради влошаването на хореята и заради поведенческите промени в лечението е добавен Халоперидол (FBI=23). За около три години неврологичните характеристики остават сравнително стабилни и последващите контролни невропсихологични тестове не показват значителни промени на когнитивните нарушения. Наблюдавани са епизодични пикове до 3000-9000 U/l в нивото на СРК с добър терапевтичен отговор към периодично лечение с кортикостериоди.

Дискусия
При нашата пациентка се появяват невропсихиатрични и когнитивни нарушения няколко години преди развитието на неврологичните симптоми. Клиничната картина се състои от разнородни поведенчески и когнитивни нарушения в ранните фази на заболяването, което предполага особената роля на прекъсването на пътищата на стриатума, участващи в не-моторните фронто-стриатални кръгове и може да обясни отдалечеността във времето на изявата на класическата картина на болестта. Загубата на невроните на стриатума може да настъпи в началото на болестта и да следва дорзално-вентрален градиент, който корелира с ранните невропсихиатрични и когнитивни нарушения. Хистопатологично, сравнително ограничен брой случаи на ХА с потвърдени VPS13A мутации показват изразена загуба на неврони на стриатума с реактивна астроцитна глиоза (предимно на главата на каудатното ядро и по-леко засягане на глобус палидус) с минимални промени в таламуса и субстанция нигра и почти съхранен церебрален кортекс (Walterfang et al., 2011; Bader et al., 2008)
Функционалните последици от промени в стриатума се представят с относително характерните хореични движения в резултат на нарушаване в моторните кръгове на путамена и палидума (Danek et al., 2005), поведенчески и невропсихиатрични симптоми. Когнитивните, моторните и емоционалните кортико-стриатално-кортикални кръгове могат да си взаимодействат в стриатума и да модулират един на друг изходната реакция от кортекса (Kimura and Matsumoto, 1997). Заболявания, които засягат стриатума по този начин могат да доведат до комбинация от нарушения, които характеризират много от проявите на синдромите на невроакантоцитоза: едновременно развитие на двигателни нарушения с когнитивни и невропсихиатрични нарушения. Клинично значима психопатология, вариращa от поведенчески нарушения до изразено психично заболяване се описва при до 60% от пациентите с ХА (Danek et al., 2004; Hardie et al., 1991; Walterfang et al., 2008).
Изразените психични промени могат да предхождат появата на неврологични смущения в някои случаи с до десетилетие (Sorrentino et al., 1999; Walterfang et al., 2008). Ранните съобщения за невропсихиатричните промени са фокусирани върху поведението и когнитивните нарушения (апатия, дезинхибиция, лоша преценка и

планиране) и наличието на дизекзекутивен синдром при повече от половината от пациентите (Hardie et al., 1991). Изразените екзекутивни нарушения, обикновено представени с нарушена преценка, дезинхибиция и импулсивност, присъстват при повечето пациенти с ХА с прогресия на заболяването (Hardie et al., 1991; Kartsounis and Hardie, 1996; Walterfang et al., 2008) или могат да се появят като дебют на заболяването. Допълнително пациентите развиват нарушения в паметта и скоростта на когнитивното процесиране (Danek et al., 2001b; Kimura et al., 1997; Danek et al., 2004; Walterfang et al., 2008).

Диагнозата ХА трябва да се има предвид при пациенти с промени в поведението с дебют между 20 и 40-годишна възраст и признаци на двигателни нарушения като хорея, орофациални тикове, протрузия на езика, дистония и резки аксиални флексии и екстензии. За редките заболявания с клинична хетерогенност и променлив ход на болестта е необходимо по-високо ниво клинични знания. (Walterfang et al., 2011)

Хистопатологичните и електрофизиологичните резултати варират при различните пациенти с ХА и СМ. Въпреки това, по данни от мускулни биопсии и ЕМГ, при СМ миопатните промени са по-често изразени, отколкото при ХА. (Ishikawa et al., 2000).

Предишни хистологични находки в скелетната мускулатура при пациенти със СМ включват групиране на влакна, преобладаване на влакна тип 1, атрофия на влакна тип 2, повишена вариабилност в размера на влакната, повишена централна нуклеизация и само едно съобщение на пациент с възпалителни инфилтрати. Въпреки че групирането на влакната може да отрази феномен на реинервация, дължащ се на аксонална невропатия, повечето автори обясняват тези резултати с миопатичните промени, подобни на тези при жени носители на мускулна дистрофия тип Дюшен (Jung et al., 2001; Swash et al., 1983; Barnett et al., 2000; Witt et al, 1992).

Hewer и съавт. (2007) показват, че миопатията при СМ е по-скоро неврогенна и по-малко доброкачествена, за разлика от първоначалния термин "доброкачествена Х-свързана миопатия с акантоцити" (Swash et al., 1983). Те показаха, че миопатните ЕМГ промени не прогнозират миопатните промени при мускулна биопсия. Авторите предполагат, че моторната невропатия е основната причина за слабост и атрофия при МС, отколкото миопатия.

Въпреки това, първична миопатия е установена при мускулна биопсия с данни за наличие на немалинови пръчки и белтъчни натрупвания на тъканна трансглутаминаза. Това предположение се подкрепя от находки на селективна мускулна атрофия на крайниците, използвайки компютърна томография при 2 пациенти. Повишени нива на СК могат да бъдат открити преди появата на неврологичните симптоми и се оказва, че пациентите с ХА са предразположени към рабдомиолиза (Walker et al., 2006; Tamura et al., 2005; Melone et al., 2002; Ishikawa et al., 2000; Lossos et al., 2005; Robinson et al., 2004).

Доколкото ни е известно, досега при никой друг случай на ХА, не е проведена симптоматична кортикостероидна терапия с последващо успешно купиране на миопатната болка и понижаване на нивата на СК.

Ефектът от терапията с кортикостероиди е добре известен при идиопатични възпалителни миопатии, както и при мускулна дистрофия тип Дюшен (Lazarou et al., 2013; Manzur et al., 2008; Sato et al., 2014). За съжаление, не е взета мускулна биопсия от нашата пациентка и по този начин е трудно да се реши дали симптоматичният ефект на кортикостероидите корелира с хистопатологичните промени в мускулите.

В заключение, представяме първи доказан случай на ХА в България при 39-годишна жена, с поведенчески и когнитивни нарушения, проявени няколко години преди появата на двигателните нарушения. Наблюдават се двигателни нарушения, включително хорея, дистония на храненето, падане на главата, миоклонус и арефлексия, асоциирани с гърчове, миопатия, силни мускулни болки и повишени серумни нива на СК, както и на LDH. Диагнозата ХА е потвърдена от липсата на хореин в червените кръвни клетки чрез Western-blot анализ и идентифициране на две хетерозиготни VPS13A генни мутации, едната от които е нова. За първи път са проведени подробен анализ на червени кръвни клетки при пациент с ХА. При този случай се осъществи лечение с метилпреднизолон, което доведе до намаляване на болките в мускулите и нивата на СК. Въпреки че ХА все още е нелечимо заболяване, правилната диагноза е от решаващо значение, тъй като тя отваря вратата за симптоматично лечение и за генетична консултация на членовете на семейството. Ние демонстрираме, че кортикостероидната терапия има положителен ефект за намаляване нивата на СК, както и успешно купиране на мускулните болки. Необходими са допълнителни проучвания за установяване на безопасността, индикациите и ефекта от кортикостероидната терапия при различни хистопатологични характеристики на мускулните промени при невроакантоцитозните синдроми.

Глава 5. Изводи и приноси

5.1. Изводи

1. Генетичният скрининг на 135 български пациенти с ФТД и сродни заболявания идентифицира 32 редки/нови варианти в PSEN1, APP, PSEN2, PRNP, GRN, MAPT, FUS, CHMP2B, C9orf72, LRRK2, TREM2, SQSTM1, и SIGMAR1 гените в 38 индивиди. Откритите варианти са потвърдени от секвениране по Сангер. Това проучване каталогизира генетичните варианти, които участват в етиологията на деменция в българската кохорта от пациенти с ФТД и сродни заболявания и подчертава различното разпределение на гените-причинители в популацията. В българската популация с ФТД честотата на мутациите се изчислява на 7.3% (6/82) за мутации в GRN гена, последвани от 3.7% (3/82) за хексануклеотидни повторения на C9orf72 и 1.2% (1/82) за хомозиготна мутация в TREM2 гена. В изследваната популация с клинична диагноза вероятна БА се открива 2.7% (1/37) честота за хексануклеотидни повторения на C9orf72. Честотата на мутациите в GRN гена в ФТД популацията е в съответствие с литературните данни. Установената по-ниска честота на мутациите в C9orf72 гена е в подкрепа на хипотезата за наличие на градиент север-юг в Европа за честотата на тази мутация.
2. В GRN гена са установени две различни нови мутации – нова frame shiftp.Tyr408*мутация в екзон 11 (в три фамилии и четирима пациенти) и нова интронна (C-8 + 3A> G) мутация в интрон 1 (в трима пациенти). Редукцията на серумните нива на GRN повече от 50% в сравнение със здравите контроли е в подкрепа на патогенността на тези две мутации.
3. Клиничният фенотип на мутациите в GRN гена показва широка интра и интер-фамилна вариабилност, покриващи широк клиничен спектър от ФТД и БА. Този факт има важно значение за генетичния скрининг на невродегенеративни заболявания. Мутациите в GRN гена се откриват както в автозомно-доминантни случаи, така и във фамилни и спорадични случаи.
4. Това проучване подчертава факта, че C9orf72 мутациите са в основата на цял спектър от невродегенеративни фенотипове, вероятно включващи БА и ПСП. Този факт има важни последици за клиницистите, които трябва да отсеят

невродегенеративни заболявания за генетично изследване. Интересното е, че намираме ранни грешки в писането без афазия в двама индивиди със C9orf72 мутации като възможен сензитивен предиктор на когнитивни нарушения. Необходими са по-подробни проспективни невропсихологични и езикови изследвания на пациенти, скринирани за мутацията C9orf72, в съчетание с невропатоанатомични изследвания в по-големи кохорти от пациенти.

5. Открихме два нови варианта в CHMP2B и FUS гена, които са оценени като вероятно патогенни:

- Новата мутация p.Asp154Gly в CHMP2B гена се описва при пациент с клинична картина на езиков вариант на ФТД, наподобяващ семантична деменция, но с ясни отличия и припокриваща се картина. Нашите изследвания много добре представят резултатите от езиковите нарушения в лонгитудинален аспект, което е много ценна фенотипна характеристика. Честотата, описана за тази мутация в нашата извадка от ФТД индивиди, е 1.2% (1/82), която е подобна на съобщени данни в литературата.
- Открихме нов кодиращ вариант във FUS гена (p.Gly466Ser) при автозомно-доминантен случай на фронтален вариант на БА с ранно начало и сравнително дълга продължителност на заболяването. В ФТД извадката честотата на тази мутация представлява 1.2% (1/82). Интересен е фактът, че почти всички патогенни мутации във FUS гена водят до фенотип на ЛАС. Описан е единствен вариант с неясна патогенност при клиничен фенотип на ФТД.

6. Открихме и съчетани несинонимни варианти в различни гени при един и същ индивид. Патогенността и значението на тези съчетани мутации е обект на бъдещите клинико-генетични изследвания.

7. Откриването и каталогизирането на варианти с несигурна патогенност има важно клинично значение за провеждане на бъдещи изследвания и оценка на патогенността им. Интерес представляват и вариантите открити в APP, MAPT и LRKK2 гени, които се намират извън познатите до момента патогенни зони, но въпреки това имат предиктивна патогенна стойност чрез ин-силико методи.

8. Представяме първия описан случай в България на пациент с доказана БНХ, носител на хомозиготна мутация в TREM2 гена, с атипичен фенотип, наподобяващ П-ФТД и много бърза прогресия на заболяването без костни фрактури. Литературните данни, в съчетание с нашия случай подчертават клиничната хетерогенност и липсата на ясна генотип-фенотип корелация при пациенти, носители на TREM2 мутации. Съпътстващата точкова мутация в C9orf72 може да допринесе за клиничната хетерогенност и бързата прогресия на заболяването при нашия пациент. Това генетично заболяване трябва да се включи в диференциалната диагноза на деменция с ранно начало, особено деменция, наподобяваща П-ФТД. Включването на TREM2 гени в панел от гени, участващи в етиологията на дементни заболявания, е оправдано.
9. Проведеното изследване за откриване на APP дупликации при 6 пациента с клинична картина на автозомно-доминантна деменция с ранно начало и левкоенцефалопатия с или без церебрални микрохеморагии/ интрацеребрални хеморагии даде негативен резултат.
10. Въпреки нашите комбинирани методики за генетичен скрининг, в голям брой от фамилните и доминантните случаи липсват мутации в известни гени. Интересно е да е отбележи, че 20% от извадката са индивиди с дебют на заболяването под 50 годишна възраст. Това показва, че въпреки значителния напредък на съвременното разбиране за наследствените невродегенеративни заболявания, списъкът от гени, свързани с деменция, все още не е завършен. Предполага се, че нов локус или локуси са замесени в патогенезата на тези случаи, които ще бъдат подложени на бъдещи генетични изследвания.
11. Описваме спорадичен случай на носител на Gly389Arg мутация в MAPT гена с атипичен фенотип с много ранно начало, бърза прогресия и вероятно непълна пенетрантност. Клиничният фенотип при нашия пациент представлява интерес поради изключително рядкото съчетание на НФ-ППА с КБС от една страна, и развитие на ППА на фона на предимно десностранна корова атрофия. Наличието на нарушения в развитието на езиковите функции в детската възраст е в съответствие с много редките описани случаи на подобни нарушения при случаи с ППА.

12. Описваме една фамилия с прогресивна деменция с ранно начало с атипичен фенотип и протеотип. Невропатоанатомичните данни разкриха нов фенотип, характеризиращ се с комплексна таупатия с TDP-43 протеинопатия. За разлика от познатия факт, че фамилните случаи на деменция са моногенни заболявания, нашият цялостен екзомен анализ подкрепя хипотезата за поразително сложен комплекс от геномни промени, участващи в забележителен състав на невродегенеративни заболявания. Анализът на генетичните пътища и протеин-протеин взаимодействията са в хармония с идеята, че набор от гени, които взаимодействат по различни пътища, може да допринесе за етиологията на комплексните фенотипове.
13. Резултатите от това проучване сочат, че АроЕ ε4 алела е свързан с намаляване на нивата на ликворния Аβ1-42 при БА. Хомозиготните ε4-индивиди имат значимо по-ниски нива на ликворен Аβ1–42, в сравнение с хетерозиготните ε4-индивиди и тези, които не са носители на ε4 алела. Това предполага дозо-зависим ефект на АроЕ ε4 върху нивата на ликворния Аβ1–42. В подгрупата на пациенти с БА с ранно начало тази асоциация не се потвърждава. Нито полът, нито възрастта или тежестта на деменцията, са значимо асоциирани с нивата на ликворния Аβ1–42. Не беше отчетена значима асоциация между АроЕ ε4 и нивата на t-tau и p-tau в ликвора. Необходими са по-големи проучвания за изследване на асоциациите между честотата на АроЕε4 алела и нивата на ликворните биомаркери при пациенти с БА с ранно начало.
14. Хорея-акантоцитоза е рядко наследствено невродегенеративно заболяване с поведенчески и когнитивни нарушения, в съчетание с двигателни и други неврологични нарушения. Нашето проучване подчертава факта, че това заболяване трябва да се има предвид в диференциална диагноза на ФТД, тъй като поведенческите и когнитивните нарушения могат да се появят няколко години преди поява на другите симптоми. По-нататъшни проучвания са необходими за изследване на безопасността и индикацията за стероидна терапия при синдромите на невроакантоцитоза.

5.2. Приноси

1. Събрана е първата голяма кохорта от български пациенти с различни субтипове ФТД и сродни заболявания с ДНК банка от всички клинично изследвани семейства, съобразно ревизираните критерии, при които са проведени клинико-генетични проучвания. Те са основа на настоящите и бъдещите генетични изследвания.
2. Подбрана и разработена е подробна невропсихологична и невропсихиатрична батерия за когнитивна и поведенческа оценка на пациенти с различни форми на ФТД и сродни заболявания, в съответствие с новите диагностични критерии.
3. Подбран и приложен е набор от визуални оценъчни невроизобразяващи скали за оценка на невроизобразяващите промени при ФТД и сродни заболявания.
4. Това е първото описание на генетичен скрининг в кохорта от български пациенти с деменция, използвайки комбинирана технология (панел от гени, участващи в етиологията на деменция, в съчетание с PCR методика за откриване на C9orf72 хексануклеотидни повторения и методика за детекция на APP дупликации). По наши данни, това е първо подобно проучване в популация от дементно болни в източна/централна Европа. Тази комбинирана методика би могла дасеизползва в близко бъдеще катостандартен скринингговтестза ранна и точна диагнозананевродегенеративните заболявания. Направените изводи имат практическа насоченост за развитието на нови политики в здравеопазването, насочени към използването на генетичен скрининг при деменция сред населението, подходящо за молекулярна диагностика с помощтана тази технология.
5. За първи път е определено серумното ниво на GRN при пациенти с варианти в GRN гена, което има практическа насоченост за доказване на патогенноста на вариантите и/или подбор на подходящи пациенти за генетичен скрининг на GRN гена.
6. Определена е честотата на мутации в GRN, C9orf72 и TREM2 мутации в българска популация от ФТД и сродни заболявания

7. Описани са генотип-фенотип корелации при нова frame shift p.Tyr408* мутация в екзон 11 (в три фамилии и четирима пациенти) и нова интронна (C-8 + 3A> G) мутация в интрон 1 (в трима пациенти).
8. Описани са генотип-фенотип корелации при четирима пациенти, носители на мутация в C9orf72 гена.
9. Описани са фенотип-генотип корелации при два нови и вероятно патогенни варианта в CHMP2B и FUS гени. Мутациите в тези гени са изключително редки.
10. Описан е много рядък атипичен фенотип на БНХ, наподобяващ атипичен П-ФТД с бърза прогресия с хемозиготна мутация в TREM2 гена. Описана е съчетана нова мисенс мутация в C9orf72 гена при този индивид.
11. Описани са генотип-фенотип корелации при Gly389Arg мутация в MAPT гена.
12. За първи път е изследвана извадка на пациенти с деменция с ранно начало/левкоенцефалопатия/интрацеребрална хеморагия с методика за детекция на APP дупликации.
13. За първи път се установява нов генетичен механизъм на фамилна деменция с ранно начало, който протича с атипичен фенотип и атипична невропатологична характеристика.
14. За първи път е изследвана връзката между ApoE генотипа и ликворните биомаркери, специално при БА с ранно начало. Установено е за първи път, че ApoE4 алела няма ефект върху ликворните биомаркери при БА с ранно начало, за разлика от БА с късно начало.
15. Хорея-акантоцитоза, като изключително рядко заболяване е доказана за първи път в България. За първи път се прилага лечение с метилпреднизолон при това заболяване с добър ефект на мускулните болки, слабостта и екстремно повишените нива на СК на миопатията при това заболяване.

Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд

Статии публикувани в международни списания във връзка с дисертационния труд с импакт фактор

1. **Mehrabian S**, Alexopoulos P, Ortner M, Traykov L, Grimmer T, Kurz A, Förstl H, Bickel H, Diehl-Schmid J. Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: the role of apolipoprotein E genotype, age, and sex. Neuropsychiatr Dis Treat. 2015;11: 3105-10. **(*Impact Factor*: 1.891)**
2. Bocchetta M; Galluzzi S; Kehoe P; Aguera E; Bernabei R; Bullock R; Ceccaldi M; Dartigues J-F; Mendonça A; Didic M; Eriksdotter M; Félician O, Frölich L; Gertz H-J; Hallikainen M; Steen G Hasselbalch; Lucrezia Hausner; Heuser I; Jessen F; Jones RW; Kurz A; Lawlor B; Lleo AB; Martinez-Lage P; Mecocci P; **Mehrabian S;** Monsch A; Nobili F; Nordberg A; Rikkert MO; Orgogozo J-M; Pasquier F; Peters O; Salmon E; Sánchez-Castellano C; Isabel Santana; Marie Sarazin; Traykov L; Tsolaki M; Visser P.J; Åsa K Wallin AK; Wilcock J; Wilkinson D; Wolf H; Yener G; Zekry D; Frisoni G. (2014). The Use of Biomarkers for the Etiologic Diagnosis of MCI in Europe: an EADC Survey. *Alzheimer's & Dementia*. Alzheimers Dement. 2015;11(2):195-206. **(*Impact Factor*: 12.41) (цитирания: 12)**
3. Pavlova R, **Mehrabian S**, Petrova M, Skelina S, Mihova K, Jordanova A, Mitev V, Traykov L. Cognitive, Neuropsychiatric, and Motor Features Associated with Apolipoprotein E e4 Allele in a Sample of Bulgarian Patients with Late-Onset Parkinson's Disease. Am J Alzheimers Dis Other Demen 2014;29(7):614-9. **(*Impact Factor*: 1.627)**
4. **Mehrabian S**, Raycheva M, Traykova M, Stankova T, Penev L, Grigorova O, Traykov L. Neurosyphilis with dementia and bilateral hippocampal atrophy on brain magnetic resonance imaging. BMC Neurol 2012;12(1):96. **(*Impact Factor*: 2.564) (цитирания: 14)**
5. Traykov L, **Mehrabian S**, Van Den Broeck M, Raycheva M, Cruts M, Jordanova A, Van Broeckhoven C. Novel PSEN1 mutation in a Bulgarian patient with very early onset Alzheimer's disease, spastic paraparesis and extrapyramidal signs. Am J Alzheimers Dis Other Demen 2009;24(5):404-7. **(*Impact Factor*: 1.627) (цитирания: 11)**

Статии публикувани в български списания

1. Райчева М, Петрова М, Желев Я, **Мехрабиан Ш**., Киркова В, Трайков Л. Нарушение на екзекутивния контрол при пациенти с леко когнитивно нарушение с и без паркинсонова болест. *Българско Списание по Психология,* 2008, 1-4, 679-685.
2. Дюкмеджиева Д., Петрова М., Киркова В., **Мехрабиан Ш.,** Райчева М., Трайков Л. Вербална флуентност при леко когнитивно нарушение с и без паркинсонова болест. *Българска Неврология,* 2009, 9, 3, 109-111.
3. Петрова М, Райчева М, **Мехрабиан Ш**, Желев Я, Ангов Г, Трайков Л. Връзка между депресията и когнитивните дефицити при пациенти с Паркинсонова болест и леко когнитивно нарушение. *Българска Неврология,* 2010,10,3,122-126.

4. **Мехрабиан Ш**, Йорданова А, Райчева М, Петрова М, Трайков Л. Аполипопротеин Е и невропсихиатрични симптоми при болни с болест на Алцхаймер. *Българска Неврология,* 2011, 11, 1, 54-58.
5. **Мехрабиан Ш,** Райчева М, Дурон Е, Пенев Л, Трайкова М, Анон О, **Трайков Л**. Ортостатична хипотония като рисков фактор при съдова деменция и болест на Алцхаймер. *Медик Арт. Неврология и Психиатрия,* 2012, 2, 87-92.
6. **Мехрабиан Ш**, Райчева М, Трайков Л. Генотип-фенотип корелации при болестта на Алцхаймер с ранно начало (2012). В: Трайков Л. (Ред), Ранна диагноза на деменция при дегенеративни заболявания. София: 76-95.
7. **Мехрабиан Ш,** Райчева М, Трайков Л. Проучвания върху честотата на АроЕ е4 при болестта на Алцхаймер в България (2012). В: Трайков Л. (Ред), Ранна диагноза на деменция при дегенеративни заболявания. София: 96-105.
8. Павлова Р, Петрова М, **Мехрабиан Ш**, Михова К, Кънева Р, Митев В, Трайков Л. Аполипопротеин Е е4 и немоторни симптоми при пациенти с болест на Паркинсон с късно начало. *Обща медицина,* 2013, 3, 21-26.
9. Райчева, М., Стоянова К, Джанян А, **Мехрабиан Ш**, Павлова Р, Петрова М, Трайков Л. Валидизиране на българските версии на скрининговите методики за когнитивни нарушения Mini-Mental State Examination и Isaac's Set Test при възрастни. *Психологически изследвания*, 2013, 1-2, 139-156
10. Павлова Р, Райчева М, Петрова М, **Мехрабиан Ш**, Михова К, Кънева Р, Трайков Л. Аполипопротеин Е ε4 алел и когнитивни нарушния при пациенти с болест на Паркинсон с късно начало. *Българска Неврология*, 2014, 15, 3, 234-237.
11. Павлова Р, **Мехрабиан Ш**, Скелина С, Желев Я, Михова К, Кънева Р, Митев В, Йорданова А, Трайков Л. Характеристика на дегенеративния паркинсонов синдром в зависимост от Аполипопротеин Е генотипа. *Неврология и психиатрия* 2014;4:30-33.
12. Скелина С, Павлова Р, Петрова М, **Мехрабиан Ш,** Григорова О, Трайков Л. Проучване на профила на когнитивни нарушения при пациенти с прогресивна супрануклеарна пареза. *Българска Неврология,* 2015, 16, 2, 138-143.

Участие в конгреси с публикувани резюмета

1. **Mehrabian S,** Jordanova A, Raycheva M, Traykov L. The contribution of Apolipoprotein E alleles on cognitive performance and behavioral changes in Alzheimer's disease. (2009) In: AAN 61st Annual meeting. April 25- May 2, Seattle, USA. Neurology, 72, Suppl 3, A330
2. **Mehrabian S**, Bader B, Danek A, Raycheva M, Miltenberger-Miltenyi G; Skelina S, Pavlova R, Velizarova R, Traykov L. Chorea-acanthocytosis: the first case from Bulgaria. New breakthroughs in NA/NBIA; towards unraveling underlying mechanisms Oct. 26-27 2012, Ede, Netherlands.
3. **Mehrabian S,** Jordanova A, Raycheva M, Cruts M, Van Broeckhoven C, Traykov L. Genotype-phenotype relationships in Bulgarian Alzheimer's patients. (2010) In: 12th Congress of the EFNS. August 23-25, Madrid, Spain. J Neurol, 257, Suppl 1, 204.
4. Сарафов С, **Ш. Мехрабиан**, Райчева М, Ишпекова Б, Тодорова Г, Търнев И, Трайков Л. (2011) Случай на прогресивна нефлуентна афазия и болест на двигателния неврон – клинични, електро-физиологични, невропсихологични и

мрт характеристики В: XII Национален конгрес по неврология. 19-21 май, Боровец, България. Българска неврология, 11, 2, 109

5. **Mehrabian S,** Raycheva M, Sarafov S, Tournev I, Traykov L. Language, behavioural and cognitive impairments in bulbar onset ALS. The 8-th International Conference on Frontotemporal Dementias. Manchester 5-7 September 2012, UK.
6. Pavlova R, Mihova K, **Mehrabian S**, Petrova M, Skelina S, Kaneva R, Mitev V, Traykov L. Novel LRRK2 6165C>G mutation in a patient with Parkinson's diseasedementia: a case report. (2014) In: Joint Congress of European Neurology. 31 May-3 June, Istanbul, Eur J Neurol, 21, Suppl 1, 692.
7. Pavlova R, Mihova K, **Mehrabian S**, Petrova M, Skelina S, Kaneva R, Jordanova A, Mitev V, Traykov L. LRRK2 mutation c.4536+3A>G in a patient with multiple system atrophy: a case report. (2014) In: Joint Congress of European Neurology. 31 May-3 June, Istanbul. Eur J Neurol, 21, Suppl 1, 692.

Рецензент на:

- Journal of Alzheimer's disease
- Journal of *Cognitive and Behavioral Neurology*
- International Neuropsychiatric Disease Journal
- Journal of "Neurological Research".
- American Journal of Cardiovascular Drugs
- Journal of Neurological Sciences"

Награди

2011- Награда „Млад учен" на името на акад . Асен Хаджиолов, 2011.

2012- Young Scientist Award (New Breakthroughs in NA/NBIA), 2012, Ede, Netherlands.

2012- Грант от FTD Conference, 2012, Manchester, UK.

Специализация в чужбина във връзка с дисертационния труд:
2014 – Грант за научна специализация "BAYHOST MOBILITY GRANT" – 2014 в клиника по психиатрия, TUM, Мюнхен, Германия.
2014-2015- Грант за Postdoc fellowship специализация на тема „Генотип-фенотип корелации при ФТД и сродни заболявания"; Каролинска институт; Швеция– 7 месеца

Цитирания (Google Scholar)

Citation indices	**All**	**Since 2011**
Citations	210	174
h-index	8	8
i10-index	8	6

Summary

Frontotemporal dementia (FTD) represents the second most frequent cause of degenerative presenile dementia. It is an umbrella term for a clinically, neuropathologically, and genetically heterogeneous and diverse group of neurodegenerative disorders with prominent frontal and/or temporal lobar cortical atrophy. Nearly 40% of FTD patients show an autosomal dominant pattern of inheritance and 30-50% being familial FTD. Mutations in a single gene can underlie a broad phenotypic range of neurodegenerative disease. The wide clinical, microscopic and genetic heterogeneity exhibited by neurodegenerative diseases with dementia make them attractive candidates for the development of NGS technologies.

The frequency and contribution of variants of these genes in 135 Bulgarian dementia patients (82 FTD), 37 Alzheimer's disease (AD), and 16 other neurodegenerative disorders) were assessed. For this purpose, massive parallel-sequencing of 17 known dementia genes, together with PCR based assessments of the *C9orf72* hexanucleotide repeat expansion, was investigated.

We identified 32 rare/novel variants in several genes in 38 individuals. GRN mutations were most commonly occurring in our patient cohort. They were found in 7.3% (6/82) of the FTD patients, followed by C9orf72 expansions in 3.7% (3/82) of the FTD patients. The frequency of mutations in GRN gene in FTD patients is in agreement with the data found in literature. We demonstrated that the frequency of C9orf72 mutations was lower, an evidence which supports the hypothesis of a north-south mutation gradient in Europe. In our cohort, the *C9orf72* pathological expansion was found in a broad spectrum of neurodegenerative phenotypes. Interestingly, we showed early writing errors without aphasia in 2 subjects with *C9orf72* expansions. Additionally, a homozygote TREM2 mutation (1/82) was found in 1.2% of the FTD patients. Hexanucleotide repeat of C9orf72 was detected in 2.7% (1/37) of AD patients group.

In the present study we describe a kindered with early-onset dementia with atypical phenotype and neuropathology. By performing whole exome sequencing, we revealed a large number of candidate genes potentially implicated in the etiology, including *LRRK2* and *SYNE2*. In addition, *DDI1, KRBA1, TOR1A*, and *ZNF550* genes possessed novel stop-loss or stop-gain mutations only in the patients. These observations are concordant with the notion that a set of genes working together in different pathways may contribute to the etiology of complex phenotypes.

We assessed the CSF levels of Amyloid-β 1-42 (Aβ1-42), p-tau and total-tau (t-tau) of 117 subjects (55 late-onset AD (LOAD) and 62 EOAD). In the whole patients sample and in the LOAD subgroup ε4 homozygous subjects had significant lower CSF Aβ1–42 levels compared to ε4 heterozygous subjects and ε4 non-carriers. This association was not detected in the EOAD group. Larger studies are necessary to further investigate associations between *ApoE* ε4 allele frequency and CSF biomarker levels in patients with EOAD.

We report clinical features, novel erythrocyte analysis and a symptomatic treatment option for a proven case of chorea-acanthocytosis. Chorea-acanthocytosis was confirmed by erythrocyte Western-blot analysis and the identification of two heterozygous *VPS13A* gene mutations. Red cell analysis showed increased amount of active Lyn (Lyn-396) and total Lyn translocated to the membrane. The flow of the patient's erythrocytes through the capillaries did not reveal any dysfunction. A treatment with methylprednisolon led to

reduction in muscle pain and CK levels. Further studies on safety and indications of steroid therapy in neuroacanthocytosis syndromes seem warranted.
In conclusion, this study represents the first genetic screening in a Bulgarian FTD/AD cohort using NGS technology, along with PCR based assessments of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion. This combined genetic method could soon be used as a standard screening test for early and accurate diagnosis of neurodegenerative diseases. Despite significant progress in our understanding of hereditary neurodegenerative diseases, the list of genes associated with early-onset dementia is not yet complete. Our study in a kindered with early onset dementia suggests that a set of genes, working together in different pathways, may contribute to the etiology of complex phenotypes. In future, the association of genetic risk factors with CSF biomarkers in AD may be accounted for in clinical practice.

БЛАГОДАРНОСТИ

Този труд е осъществен благодарение на колективна работа на екип, ръководен от чл. кор. проф. Лъчезар Трайков в центъра за невродегенеративни заболявания към УМБАЛ „Александровска“ и в сътрудничество с други български и чужди катедри и лаборатории. Специфичната невропсихологична и невропсихиатрична батерия е подбрана, разработена и приложена с активното съдействие на доц. Маргарита Райчева и д-р Катя Стоянова. Подкрепата, съветите и консултациите на чл. кор. проф. Лъчезар Трайков имаха ключова роля в успешното осъществяване на този труд.