МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ

КАТЕДРА ПО НЕВРОЛОГИЯ

Завеждащ Катедра: проф. д-р Лъчезар Трайков

Д-р Сашка Георгиева Желязкова – Главеева

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА НЯКОИ ФОРМИ НА НАСЛЕДСТВЕНА ПАРЦИАЛНА ЕПИЛЕПСИЯ И ГЕНЕТИЧНА ЕПИЛЕПСИЯ С ФЕБРИЛНИ ГЪРЧОВЕ ПЛЮС

Научна специалност: 03.01.19. Неврология

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научен ръководител:

Проф. Д-р Ивайло Търнев, д.м.н

Научен консултант:

Проф. Ж. Сандер

София

2013

Дисертационният труд е написан на 183 машинописни страници, включващи 16 таблици и 37 фигури. Библиографският списък съдържа 281 литературни източника, от които 15 български и 266 чуждестранни.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедрата по неврология при Медицински университет-София на 14.05.2013 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 07.10.2013 г. от 14.00 ч., в Аудиторията на Клиниката по нервни болести – УМБАЛ „Александровска" – София, съобразно заповед на ректора № РК 36-1283/21.06.2013 г. при научно жури в състав:

1. **Проф. д-р В. Божинова, дм (рецензия)**
2. **Проф. д-р А. Капрелян, дмн (рецензия)**
3. **Проф. д-р И. Търнев, дмн (становище)**
4. **Проф. д-р З. Захариев, дмн (становище)**
5. **Доц. д-р Г. Гозманов, дмн (становище)**

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

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

Съдържание

Въведение. 5

1. Постановка на изследването. 6

1.1 Цел, хипотези и задачи**.** 6

1.2 Контигент 7

1.3 Методи 8

2. Резултати и обсъждане. 11

2.1 Клинико-генетично проучване на фамилия от град Нова Загора 11

2.1.1 Фенотипни характеристики 11

2.1.2 Генетични изследвания 14

2.1.3 Обсъждане 14

2.2 *Клинико-генетично проучване на фамилия от село Майско* 15

2.2.1 Описание на фенотипа 16

2.2.2 Генетични изследвания 18

2.2.3 Обсъждане 19

2.3 Клинико-генетично проучване на фамилия от село Слънчево 19

2.3.1 Фенотипни характеристики 20

2.3.2 Генетични изследвания 26

2.3.3 Обсъждане 26

23.4 Клинико-генетично проучване на фамилия от село Разград 28

2.4.1 Фенотипни характеристики 28

2.4.2 Генетични изследвания 28

2.4.3 Обсъждане 33

2.5 Клинико-генетично проучване на фамилия от град София. 34

2.5.1 Описание на фенотипа 34

2.5.2 Генетични изследвания 41

2.5.3 Обсъждане 41

2.6 Клинико-генетично проучване на фамилия от град Видин 42

2.6.1 Фенотипни характеристики 43

2.6.2 Генетични изследвания 43

2.6.3 Обсъждане 49

2.7 *Клинико-генетично проучване на фамилия от село Мадара* 51

2.7.1 Описание на фенотипа 51

2.7.2 Генетични изследвания 54

2.7.3 Обсъждане 55

2.8 *Клинико-генетично проучване на фамилия от област Плодив* 55

2.8.1 Описание на фенотипа 56

2.8.2 Генетични изследвания 59

2.8.3 Обсъждане 59

3. Изводи 61

4. Приноси 62

Публикации и научни съобщения във връзка с дисертационния труд 63

Участие в научни проекти, свързани с темата на дисертационния труд 64

Summary 65

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АДНФЕ – автозомно-доминантна нощна фронтална епилепсия
ФМТЕ – фамилни мезиални темпоралнодялови епилепсии
АДЛТЕ – автозомно-доминантна латерална темпоралнодялова епилепсия
ФФЕРО/ АДПЕРО – фамилна фокална епилепсия с различни огнища/ автозомно-доминантна парциална епилепсия с различни огнища
ФПЕПО- фамилна парциална епилепсия с перицентрални острия
ГЕФГ+ - генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс
РТМЕ - ранна тежка миоклонична епилепсия (синдром на Драве)
ЕЕГ – електроенцефалография
МЛБЕ – Международна лига за борба срещу епилепсията
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
тРНК – транспортна рибонуклуинова киселина
НРЕМ сън – сън с небързи очни движения
РЕМ сън – сън с бързи очни движения
МРТ – магнитно-резонансна томография
ЕМГ - електромиография
Съавт.- съавтори
ТМ – трансмембранен домен
РЕТ – позитронна емисионна томография
SPECT - еднофотонна емисионна компютърна томография
КАТ – компютърна томография
ХС- хипокампална склероза
ФГ- фебрилни гърчове
PCR– полимеразна верижна реакция
CNVs- вариации в броя на копията
SNP- single-nucleotide polymorphism
STRs – short tandem repeats
М.с. СЕП – мозъчно-стволови слухови предизвикани потенциали
СЕП – слухови предизвикани потенциали
MMSE – Mini-Mental State Examination Test
ГТКП – генерализирани тонично-клонични пристъпи
КПП – комплексни парциални пристъпи
ППП – прости парциални пристъпи
ВГТКП – вторично-генерализирани тонично-клонични пристъпи
ЧМТ – черепно-мозъчна травма
Mb - мегабази

ВЪВЕДЕНИЕ

Епилепсията е често срещано социално значимо заболяване, което се развива при взаимодействие на няколко фактора, имащи различна тежест при отделните форми и водещи до формиране на епилептогенно огнище.

Понастоящем се приема, че генетичните фактори участват в патогенезата на около 47% от епилепсиите, като при повечето идиопатични (генетични) епилепсии, унаследяването е комплексно и различни гени оказват малък ефект в комбинация с фактори на околната среда. Малък е броя на „чистите" епилептични синдроми, които се унаследяват моногенно, като те съставляват около 2% от всички пациенти с идиопатична епилепсия.

Прогрес в разбирането на генетиката на епилепсиите и процесите на епилептогенезата е верифицирането в последните години на редица гени при генерализираните епилепсии, както и на няколко фокални епилептични синдрома унаследяващи се автозомно – доминантно, които бяха включени в предложението за нова класификация на епилептичните синдроми на Международната лига за борба срещу епилепсията. Описаните фамилни фокални епилепсии са клинично и генетично хетерогенни, и са необходими нови изследвания за по-пълното идентифициране на гените и негенетичните фактори, отговорни за развитието на даден епилептичен фенотип и за по-доброто разбиране на епилептичните синдроми.

Настоящият труд има за цел идентифицирането на фамилии с наследствена фокална епилепсия и генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс и тяхното клинично и генетично характеризиране. Въпреки че фамилните епилептични синдроми се срещат сравнително рядко, познаването им и насоченото им търсене има голямо клинично и научно значение. От една страна това подпомага поставянето на точна диагноза и води до осигуряване на по-добри грижи за пациентите и по-точна прогноза за хода на заболяването. От друга страна идентифицирането на гените, отговорни за различните епилептични синдроми ще допринесе за по-ефективно, генетично обосновано лечение на епилепсиите, а също и за по-нататъшното изясняване на нормалното функциониране на мозъка. Откриването на нови семейства с неописан до момента фенотип ще допринесе за по-пълното диференциране на клиничния спектър на наследствените епилепсии.

Актуалността на настоящото изследване е обусловена от липсата на съвременни клинико-генетични изследвания на епилепсията в България.

1. ПОСТАНОВКА НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

1.1. ЦЕЛИ, ХИПОТЕЗИ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ на настоящото проучване е клиничното и генетично характеризиране на семейства с наследствена парциална (фокална) епилепсия и генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс.

Литературният обзор и данните от предварителните клинични наблюдения дават основание да се формулират следните **ХИПОТЕЗИ**:

- Фамилните фокални епилепсии и генетичната епилепсия с фебрилни гърчове плюс са клинично хетерогенни с изразени интра и интер-фамилни вариации в протичането на заболяването
- Фамилните фокални епилептични синдроми обикновено имат доброкачествен ход на протичане.
- Епилептичните пристъпи в повечето случаи се повлияват добре от терапия с антиепилептични медикаменти.
- При проучвания върху наследствени заболявания при роми са установени различия в заболеваемостта между отделните ромски групи и субгрупи, обусловени от биологични, социални и културални фактори. Възможно е такива различия да съществуват и по отношение на отделните форми на наследствена епилепсия.
- Характеристиките на ромската популация и доказания силен ефект на родоначалника ни дава основание да очакваме по-слабо изразена генетична хетерогенност на епилепсията в тази група и ограничен брой болестни мутации в сравнение с общата популация.
- Фамилните фокални епилептични синдроми и генетичната епилепсия с фебрилни гърчове плюс се характеризират с изразена генотипна хетерогенност.
- Преобладаваща част от фамилните епилептични синдроми са с полигенно (комплексно) унаследяване. Малък е броя на чистите (моногенни) епилепсии.

ЗАДАЧИ:

1/ Събиране на семейства с наследствена епилепсия, чрез осъществяване на теренни проучвания на територията на цялата страна. Приоритет е идентифицирането на ромски фамилии с епилепсия, в които има голям брой засегнати индивиди от няколко последователни поколения.

2/ Генеалогично проучване на засегнатите семейства.

3/ Определяне типа на унаследяване на епилептичния синдром.

4/ Детайлно клинично фенотипизиране на засегнатите членове на фамилиите с помощта на клинични, лабораторни, неврофизиологични и невроизобразяващи методи на изследване.

5/ Проучване на интра- и интер-фамилните вариации в протичането на епилептичния синдром.

6/ Събиране на биологичен материал, както от засегнати, така и от здрави членове на идентифицираните фамилии, екстракция на ДНК и провеждане на молекулярно-генетично изследване.

7/ Създаване на ДНК банка на пациенти с наследствени форми на епилепсия, за бъдещи молекулярно-генетични изследвания.
8/ Оптимизиране и контролиране на лечението на засегнатите членове на фамилиите.

1.2. КОНТИНГЕНТ.

В изследването са включени пациенти с наследствена фокална епилепсия и генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс, открити главно по време на теренни проучвания на територията на цялата страна, като информация за тях е получавана чрез мрежата на здравните медиатори. По-малка част от пациентите са идентифицирани по време на хоспитализацията им в Клиниката по Нервни болести, УМБАЛ Александровска, София и в Детските неврологични клиники към СБАЛДБ и МБАЛНП "Св. Наум" София.

Идентифицирани са *общо 26 фамилии*, от които 20 са от ромски произход, а 6 от български произход. Общият брой на членовете в тези фамилии, при които са налице анамнестични данни за епилепсия е 167 души. От тях, 130 души са интервюирани, събрана е клинична и генеалогична информация, проведен е пълен неврологичен и соматичен преглед и след подписване на информирано съгласие им е взет и биологичен материал за генетично изследване. Останалите 37 души не са открити за интервю и изследване, а информация за тях е получена от останалите роднини. След преглеждане на цялата събрана клинична и генеалогична информация, като най-подходящи за провеждане на молекулярно генетични изследвания са селектирани *8 семейства с общ брой 80 засегнати* членове и тези семейства са разгледани в настоящия дисертационен труд. Останалите фамилии не са включени в дисертацията, поради трудности за по-прецизно фенотипно изясняване на епилептичния синдром, което от своя страна затруднява провеждането на молекулярно-генетични изследвания. Причините за отпадане на тези фамилии от изследването са: отказ на част от пациентите да бъдат интервюирани отново, противоречие в информацията, получена при повторно снемане на анамнеза, както и при разпитване на очевидци на пристъпите, отказ за провеждане на ЕЕГ изследване на място, отказ за хоспитализация в Клиниката по Нервни болести за провеждане на допълнителни изследвания, както и смяна на местожителството и невъзможност за проследяване на състоянието.

Събраният клиничен и генетичен материал от членовете на 18 фамилии, които не са включени в дисертацията, се съхранява в създадената ДНК банка на пациенти с наследствени форми на епилепсия и би могъл да послужи за бъдещи молекулярно-генетични изследвания.

1.3 МЕТОДИ.

1.3.1 Снемане на подробна анамнеза с помощта на въпросник.

Въпросникът е разработен предварително в сътрудничество с водещи експерти в областта на епилепсията, епидемиологията и молекулярната генетика – Проф. Ж. Сандер, проф. А Жабленски, проф. Л. Калайджиева. Включва следните основни раздели:

- Демографски данни
- Скринингова част с два скрининга – епилептичен и психиатричен
- Основна анамнестична част, изясняваща историята на епилептичните припадъци, клиничната им характеристика и класифицирането им въз основа на нея, информация за провежданото лечение и резултатите от него, провежданите изследвания, анамнеза за рисковите фактори по време на бременността и раждането, в периода на ранното детство и училищната възраст, както и анамнеза за миналите заболявания.

Анамнезата за епилепсия е събирана и потвърждавана от възможно най-много източници на информация. Интервюирани са всички болни и здравите членове на семействата, родственици с предполагаемо заболяване, както и свидетели на пристъпите. Положени са максимални усилия за събиране на стара медицинска документация, която позволява проследяване на еволюцията на заболяването. Интервютата са провеждани няколкократно (минимум двукратно) в хода на проследяване на фамилиите за търсене на несъответствия и актуализиране на информацията.

1.3.2 Генеалогичен метод – събиране на родословна информация и определяне типа на унаследяване – автозомно-доминантно, автозомно-рецесивно, Х- свързано и митохондриален тип унаследяване.

1.3.3 Обстоен неврологичен и соматичен преглед с точно отразяване на абнормностите, независимо от теоретичната възможност за съществуване или не на връзка с основното заболяване е проведено при всички пациенти от идентифицираните фамилии. Прегледани са общо 130 души с анамнестични данни за епилепсия, от които 80 са включени в дисертацията.

1.3.4 Провеждане на неврофизиологично изследване – електроенцефалография. Една част от ЕЕГ изследванията са проведени по време на теренни проучвания, като регистрацията е извършена на апарат „PL-EEG MEDTRONIC". Останалите ЕЕГ записи са осъществени в ЕЕГ кабинета на Клиниката по нервни болести по време на хоспитализацията на пациентите. Използвани са биполярни и монополярни монтажни схеми (с 25 електрода, разположени по международната система 10-20), при минимум 20 минутен ефективен запис. Като стимулационни техники са прилагани хипервентилация и интермитентна фотостимулация. В оценката на ЕЕГ са включени:

- Тип на основната ЕЕГ активност
- Дифузни промени – вид, степен на изява, латерализация
- Огнищна активност – вид, локализация, ирадиация
- Пароксизмална активност – вид, локализация, продължителност
- Реактивност на ЕЕГ
- Динамика на ЕЕГ
- Клинико – ЕЕГ корелация.

При 79 от 80 пациента, които са включени в дисертацията е проведено поне едно ЕЕГ изследване, а 42 имат повече от един запис.

Проведените ЕЕГ записи са анализирани от двама, независими един от друг неврофизиолози.

1.3.5 Невроизобразяващо изследване – магнитно-резонансна томография на главен мозък на ключови болни за изключване на симптоматична етиология на епилептичния синдром. Магнитно-резонансното изследване е проведено в болница „Токуда" на 1.5T магнитен резонанс (MR Signa, GE Healthcare, Milwaukee, WI, U.S.A.) по специален протокол за изследване на епилепсия, състоящ се от 5 серии: сагитална T1-weighted FLAIR; коронарна T1-weighted 3DFSPGR, T2 FLAIR, T2- weighted FRFSE и аксиална T2- weighted FRFSE.

МРТ на главен мозък е осъществен при 33 пациенти от осемте фамилии, включени в дисертационния труд. Проведените магнитно-резонансни томографии на главен мозък са анализирани от двама, независими един от друг неврорентгенолози.

1.3.6 Класифициране на епилептичният синдром в съгласие с Международната класификация на епилепсиите от 1989г. на Международната лига за борба с епилепсията (ILAE), както и с по-новата предложена класификация (Engel J Jr. и сътр. 2001 и Berg и сътр. 2010). Фенотипът на всяка от фамилиите включени в дисертацията е обсъден и с научния консултант – проф. Ж. Сандер.

1.3.7 Невропсихологично изследване – проведено в невропсихологичния кабинет на Клиниката по Нервни болести, УМБАЛ" Александровска", по време на хоспитализацията на ключови болни от фамилиите, за установяване на възможна асоциираност на епилептичния синдром и/или мутацията с умствена изостаналост. Подборът на методиките е съобразен максимално с необходимостта да се избегнат културните и образователните различия, както и с най-често съобщаваните невропсихологични дефицити. Такова изследване беше осъществено при 22 от пациентите включени в дисертацията.

1.3.8 Събиране на биологичен материал за екстракция на ДНК. След подписване на информирано съгласие беше взета венозна кръв или слюнка от болни и здрави членове на идентифицираните фамилии за провеждане на молекулярно-генетични изследвания. От осемте семейства включени в дисертационния труд бяха събрани общо 172 биологични проби. Изолирането на ДНК беше осъществено в Центъра по молекулна медицина, МУ София.

1.3.9 Молекулярно генетични изследвания.

- *Секвенционен анализ на известни гени, асоциирани с епилепсия в пациентите за търсене на нови или вече известни варианти, причиняващи заболяването или полиморфизми*.

След като пробандите бяха класифицирани, съобразно техните клинични и електрофизиологични характеристики, те бяха скринирани за секвенционни варианти в известни гени асоциирани с епилепсия. Набраните чрез този метод данни позволяват описването на нови мутации и доказването на връзка генотип – фенотип.

- *Анализ за скаченост и класификация на семействата и подходящите локуси.*

Изследването на целия геном и анализа за скаченост бяха проведени чрез параметричен (с всички възможни модели на унаследяване и пенетрантност на заболяването) и непараметричен модел на анализ, с цел да се пресметне вероятността за скаченост. Като генетични маркери бяха използвани SNPs и

Affimetrics SNP array, v.6.0. Анализът за скаченост е завършен при 5 от фамилиите разгледани в дисертацията и в ход при една от тях.

- *Финно картиране на идентифицираните чрез анализ за скаченост локуси*.

Идентифицираните генетични райони скачени с различни форми на епилепсия в ромските семейства бяха изследвани чрез интер- и интра-фамилен анализ за търсене на общ хаплотип. Подходът за търсене на общ хаплотип осигурява първоначалната информация за генетичната хетерогенност между спорадичните случаи и генетично изолираните родоначални популации. Анализът също така дава информация за суб-изолатите, където подобни мутации преобладават.

Асоциираните с епилепсията нови хромозомни райони или известни райони, но с все още неидентифициран ген, бяха определени на базата на критерии, при които много засегнати пациенти делят общ хаплотип и/или LOD score резултат над 3 открит в отделно семейство. По-нататък тези локуси бяха финно картирани чрез анализ на микросателитни маркери

- *Анализ на подходящите по функция и позиция кандидат-гени за идентификация на нови гени за епилепсия*

В минималния кандидат район (под 5Mb) определен чрез методите на скаченост, позиционно и функционално подходящите гени, бяха подбрани и сканирани чрез секвенционен анализ за секвенционни варианти и мутации причиняващи заболяването. С приоритет бяха изследвани гените кодиращи мозъчно-специфични белтъци, участващи в изграждането на йонни канали.

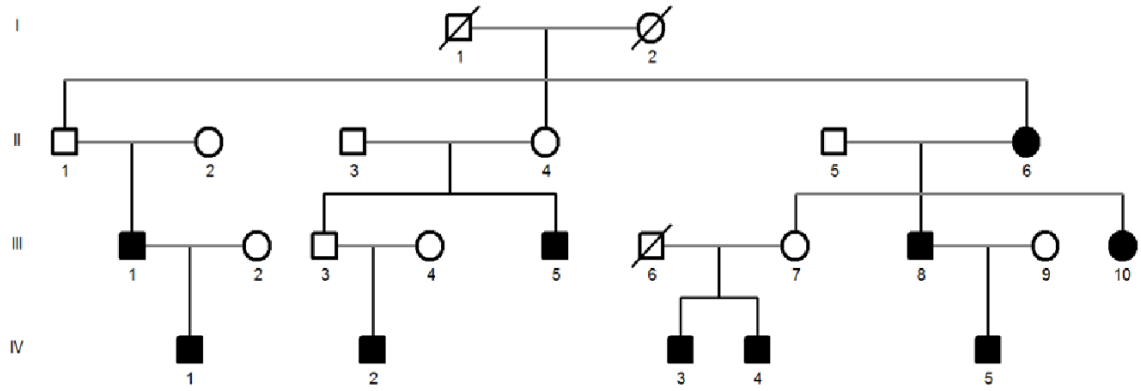
Описаните молекулярно-генетични изследвания бяха извършени в Центъра за медицински изследвания, Западно-австралийски университет, Пърт, Австралия, Университетски колеж, Лондон и Лаборатория по неврогенетика, Университет – Антверпен, Белгия.

2. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

2.1 Клинико-генетично проучване на фамилия от град Нова Загора.

Семейството принадлежи към субгрупата на турските роми (хорохане рома) и е идентифицирано в град Нова Загора. В него се открити *10 болни* (8 мъже и 2 жени) с епилепсия от три последователни поколения (**Фигура 1**).

Фигура 1. Родословие на фамилия от град Нова Загора. Засегнатите с епилепсия членове на семейството са означени с черни символи.



2.1.1 Фенотипни характеристики

На **таблица 1** са представени в обобщен вид, данните от събраната клинична информация и резултатите от проведените инструментални изследвания при засегнатите членове от фамилията.

На **фигури 2 и 3** са представени ЕЕГ записи на пациентите III-1 и IV-5, проведени съответно на 27 и 23 годишна възраст.

Фигура 2. Интериктален ЕЕГ запис на пациент III-1, проведен на 27 годишна възраст и показващ бавни вълни с остри компоненти в темпоралните отвеждания (Д>Л).

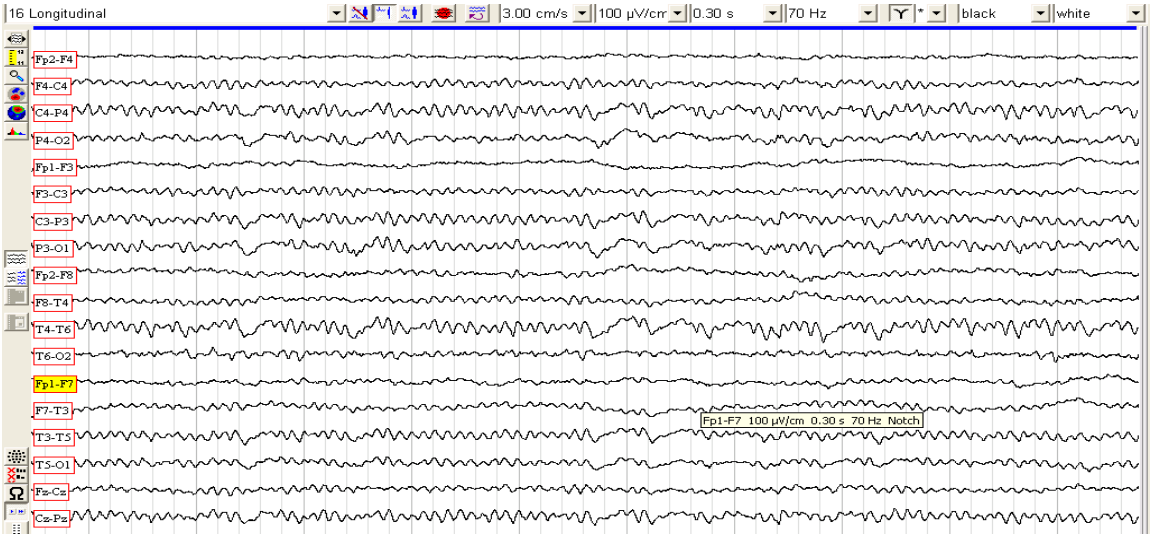


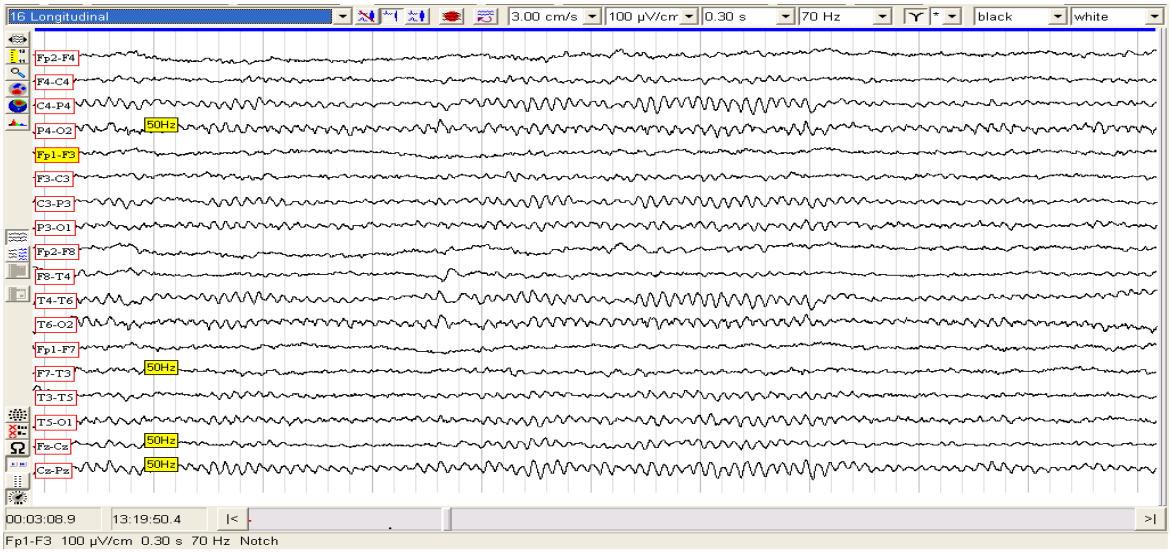
Таблица 1. Клинични, ЕЕГ и МРТ данни на пациентите от семейството от град Нова Загора.

№	Роден	Пол	ФГ	Афебрилни пристъпи начало	Видове епилептични пристъпи	Описание на епилептичните пристъпи	Честота	ЕЕГ	МРТ	Терапия
III-8	1968	М	Един на 5г.	5г.	КПП винаги с вторична генерализация	Сензорни симптоми (световъртеж, главоболие, "гореща вълна в главата"), последвани от нарушено съзнание, двигателни (мануални) автоматизми	1-2/м.	2007- нормална	Няма	CBZ
IV-5	1985	М	Няколко на 2г.	2 г.	КПП, ВГТКП	Сензорни ("гореща вълна в главата") симптоми, втренчване, оро-алиментарни и двигателни (мануални) автоматизми, агресивност;	КПП, ВГТКП – 1-3/м.	2007- нормална; 2008- тета активност Ф; 2008- тета активност Ф и Д- Т	Няма	CBZ, Diazepam
II-6	1946	Ж	Няма	20г.	КПП винаги с вторична генерализация	Епигастрална аура (гадене, неприятно чувство в стомаха), втренчване, нарушаване на съзнанието	Първоначално – 2-4/м.; Сега - 2/год.	2007- нормална; 2008- огнищност от бавни вълни Д Т-О и генерализирани пароксизми от бавни вълни	2007 - нормална	CBZ
III-1	1981	М	Няма	5г.	КПП, ВГТКП	Сензорни симптоми ('особено чувство в главата"), втренчване, двигателни (мануални) автоматизми	КПП-неизвестна ВГТКП-2-3/м.	2008-епизодични бавни вълни; единични остри вълни Д Т	Няма	Не
III-5	1971	М	Няма	9г.	КПП, ВГТКП	Епигастрални, сензорни ("дърпане отзад по врата", замъглено зрение) симптоми, двигателни автоматизми,	КПП, ВГТКП – 2-3/м.	2007- нормална 2008- нормална	2008- нормална	CBZ, CZP, сега-без лечение

						агресивност;				
III-10	1971	Ж	Няма	10г.	КПП винаги с вторична генерализация	Епигастрални симптоми (гадене издигащо се нагоре към главата), сензорни (световъртеж), втренчване, двигателни автоматизми	Първонача лно 2-3/м., Сега 3-4/г.	2007- нормална 2007- огнищни острия ЛТ; епизодични остри вълни Л Т 2008- фокус от острия ЛТ	2007 - нормална	CBZ, TPM
IV-1	2001	М	Няма	3г.	КПП	Втренчване, нарушено съзнание, двигателни и вербални автоматизми, агресивност;	1-2/м.	2008 – нормална; 2009 - нормална	Няма	Не
IV-3	1982	М	Няма	18г.	КПП	Втренчване, нарушено съзнание, двигателни автоматизми, агресивност;	1-2/м.	2007 – нормална; 2008 - нормална	Няма	CBZ
IV-4	1981	М	Няма	10г.	КПП винаги с вторична генерализация	Сензорни симптоми (световъртеж, главоболие), втренчване, нарушено съзнание	1-2/м.	2008 - нормална	Няма	CBZ
IV-2	1994	М	Няма	7г., след ЧМТ	КПП, ВГТКП	Епигастрални, сензорни (световъртеж) симптоми, втренчване, нарушено съзнание, двигателни автоматизми	КПП, ВГТКП-първонача лно 3-4/м.; Понастоящ ем -1/м.	ЕЕГ (на 9, 11, 13 и 15г.) – нормална; ЕЕГ (на 14г.) пароксизмална активност Д-Ф, след ХВ.	Няма	VPA

Г – години; м.- месец; М– мъж; Ж-жена; Д – дясно; Л- ляво; Ф – фронтално; Т – темпорално; О – окципитално; CBZ – карбамазепин; CZP – клоназепам; VPA - валпроат; TPM – топирамат; ХВ – хипервентилация; ИФС – интермитентна фотостимулация; Хц - херц

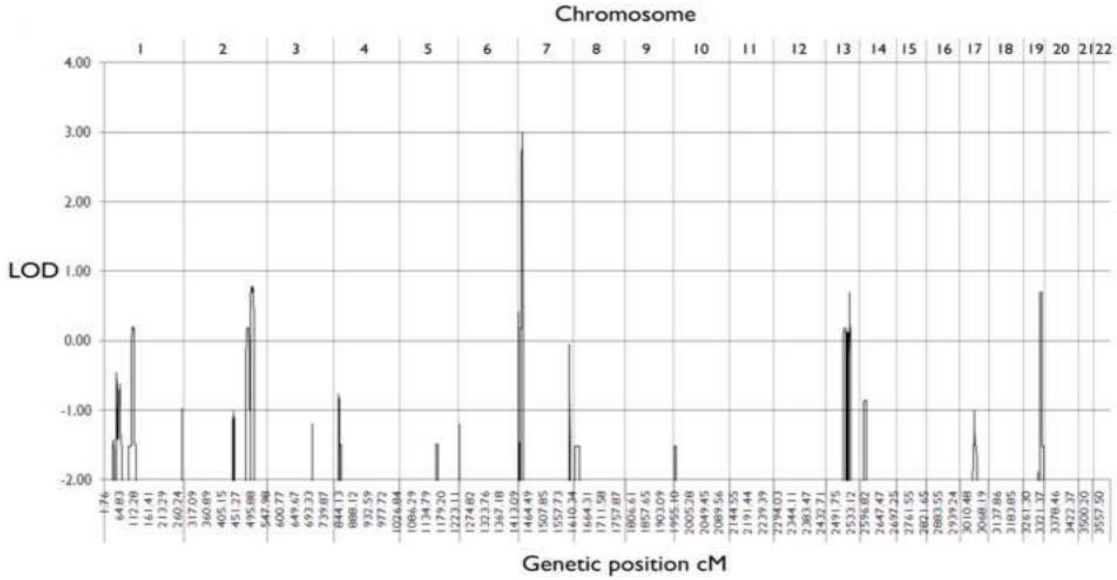
Фигура 3. Интериктален ЕЕГ запис на пациент IV-5, проведен на 23 годишна възраст. Установяват се единични остри вълни в дясно темпорално и фронтални тета вълни.



2.1.2 Генетични изследвания

Проведеният параметричен анализ за скаченост в целия геном (Merlin 1.1.1), при автозомно-доминантен модел на унаследяване, идентифицира единичен локус върху хромозома 7p21.3 **(Фигура 4).**

Фигура 4. Параметричен анализ за скаченост в семейството от град Нова Загора, при доминантен модел на унаследяване с непълна пенетранност и с помощта на панел от 16,226 SNP маркери по протежение на целия геном.



2.1.3 Обсъждане

Представеното ромско семейство има семиология на пристъпите, характерна за мезиалния темпорален дял, като преобладават епигастралната аура и стереотипиите с ръцете на фона на нарушено съзнание [Kotagal и съавт. 2003;

Rossetti&Kaplan, 2010]. Регистрираната при интерикталните ЕЕГ записи пароксизмална активност ангажира темпоралните региони. При проведените МРТ изследвания на трима от пациентите, не са установени данни за хипокампална склероза.

Клиничната картина при това ромско семейство се различава от оригиналното описание на бенигнената фамилна темпорално-дялова епилепсия [Berkovic и съавт. 1996], потвърдено по-късно и при друга фамилия със скаченост на хромозома 4q [Hedera и съавт. 2007], където началото е в по-късна възраст (не по-рано от 10 годишна възраст, най-често 25 годишна възраст), често е аурата с психични симптоми, а по-редки са комплексните парциални и вторично-генерализираните пристъпи. Фенотипът, който наблюдаваме при ромската фамилия, наподобява семействата със скаченост на хромозоми 1q, 12q и 18q, по отношение на по-ранното начало на епилепсията и липсата на МРТ данни за хипокампална склероза [Ward и съавт. 2002; Depondt и съавт. 2002; Baulac и съавт, 2001; Claes и съавт. 2004]. При това ромско семейство обаче, фебрилните гърчове са редки, а се наблюдават чести вторично-генерализирани пристъпи. В диференциално-диагностичен план, предвид съчетанието на фебрилни гърчове с парциални пристъпи бе обсъждан и синдром на генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс [Scheffer и съавт. 2007], но при ромската фамилия не са описани изолирани генерализирани тонично-клонични пристъпи, което прави тази диагноза малко вероятна.

Представената тук ромска фамилия има уникален фенотип на фамилна темпорално-дялова епилепсия, който не е описан до момента.

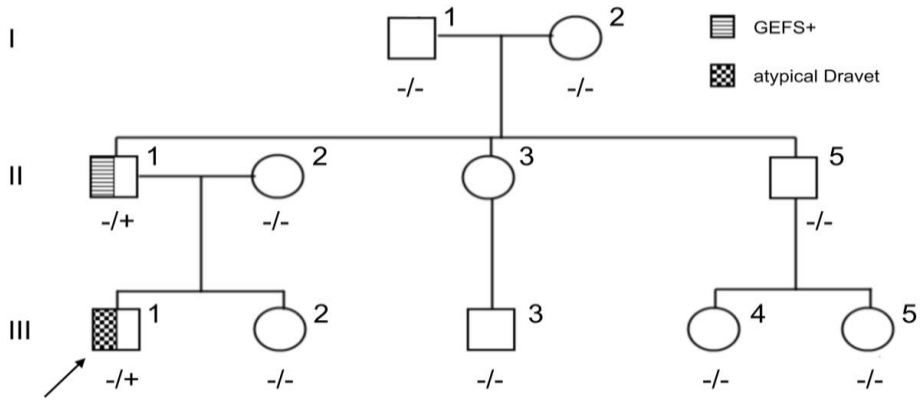
Проведените молекулярно генетични изследвания идентифицираха нов локус на хромозома 7p21.3, който изглежда специфичен за семейството. Това противоречи на първоначалната хипотеза за наличие на ефект на родоначалника по отношение на епилепсията в ромската популация.

В региона с общ хаплотип се намират три валидирани гена с експресия в мозъка-глюкокортикоид индуциран транскрипт 1 (GLCCI1), островно-клетъчен автоантиген 1 (ICA1) и неурексофилин 1 прекурсор (NXPH1), които представляват потенциални функционални кандити. На този етап обаче, точният генетичен дефект, обуславящ развитието на описания специфичен фенотип на фамилна темпорално-дялова епилепсия, все още не е идентифициран.

2.2 Клинико-генетично проучване на фамилия от село Майско.

Семейството е от ромски произход и живее в село Майско, област Велико Търново. Състои се от *двама* засегнати членове (**Фигура 5**).

Фигура 5. Родословие на фамилия от село Майско. Пробандът е посочен със стрелка. Знакът (+) показва наличието на мутация p.D194N. Легенда: ▤ ГЕФГ+; ▩ Атипичен синдром на Dravet.



2.2.1 Описание на фенотипа.

Пробандът III-1 е с изоставане в ранното нервно-психичното развитие от раждането, като проходил и проговорил на 2 годишна възраст.

Началото на епилепсията е на 4.5 месечна възраст с конвулсивен епилептичен статус, няколко часа след като му е направена редовна имунизация за дифтерия/тетанус/коклюш. В следващите месеци той започнал да получава кратки генерализирани пристъпи. На 1 годишна възраст получил усложнен фебрилен гърч с латерализация (отклонил главата и очите наляво). След това започнал да получава фебрилни и афебрилни генерализирани-тонично клонични пристъпи с честота около 1/седмично и голяма продължителност (средно 15-20 минути) и алтернираща латерализация (по отношение на адверзията на главата и очите). От една годишна възраст, към генерализираните тонично-клонични пристъпи се добавили и парциални пристъпи, понякога последвани от вторична генерализация. Аурата се изразява в неясно усещане за „ наближаване на пристъпа" и зрителни феномени („все едно го удря светлина"). През годините е лекуван с различни антиепилептични медикаменти, като моно- или политерапия с незадоволителен контрол на епилептичните пристъпи.

Неврологичният статус на пациента е нормален.

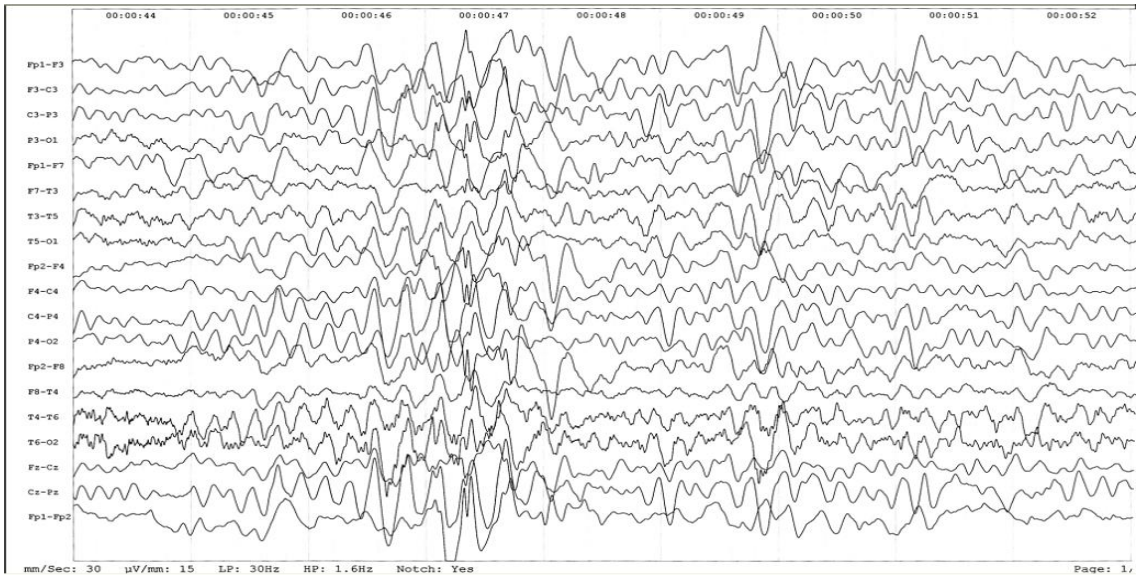
Невропсихологичното изследване е с данни за умерен интелектуален дефицит (коефицент на интелигентност~50), леко намален обхват на вниманието и концентрацията и трудности в пространствената ориентация.

Интериктални ЕЕГ записи, проведени на 6 годишна възраст показват дифузно забавена основна активност с генерализирани острия-бавна вълна при хипервентилация (**Фигура 6**), а в осъществени през следващи години - мултифокална епилептиформна активност във фронталните, темпоралните и парието-темпоралните отвеждания (**Фигура 7**). От тази възраст се наблюдава и подобрение в ЕЕГ записите в будност в сравнение с предходните такива.

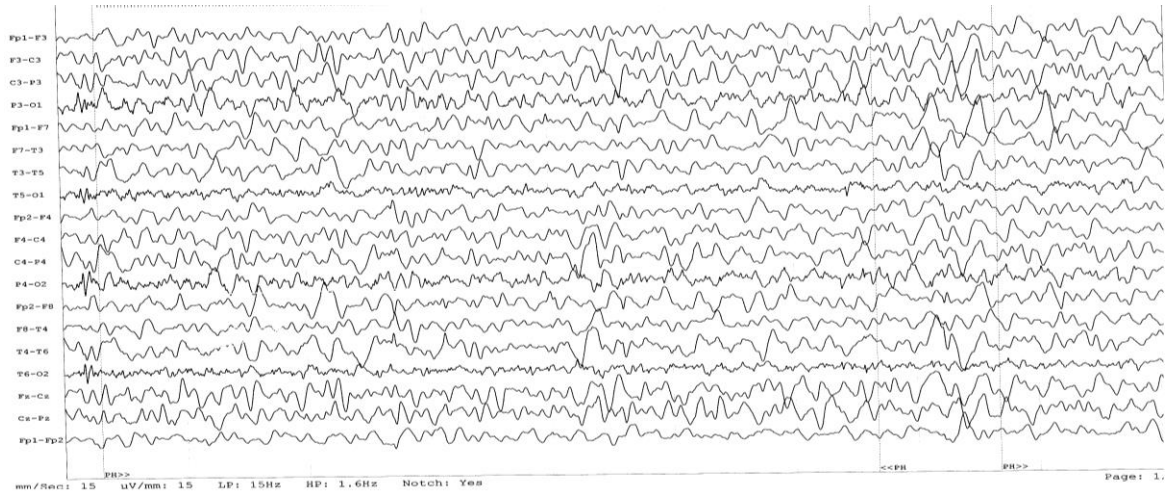
Пациентът има двукратни МРТ изследвания на главен мозък – на 6 и 12 години, които са нормални.

Фигура 6. Интериктален ЕЕГ запис на пробанда III-I на 6 годишна възраст, в будност, с данни за двустранно синхронни комплекси острие-бавна вълна, по-

изразени във фронталните и задните отвеждания на фона на дифузно забавена основна активност.



Фигура 7. Интериктален ЕЕГ запис на пробанда на 8 годишна възраст. Суспектно темпорално огнище в дясно.



Бащата на пробанда II-1 е с анамнеза за фебрилни и афебрилни гърчове от 5-6 месечна възраст. Семиологията на афебрилните пристъпи не е напълно изяснена, но по описание отговарят на парциални пристъпи с вторична генерализация и на генерализирани тонично-клонични пристъпи. Първоначално, честотата им била 1-2 месечно, като са съобщени дневни и нощни пристъпи, понякога провокирани от стрес. Пациентът никога не се е лекувал и постепенно пристъпите се разредили на 2-3 годишно, като изчезнали спонтанно към 12 годишна възраст.

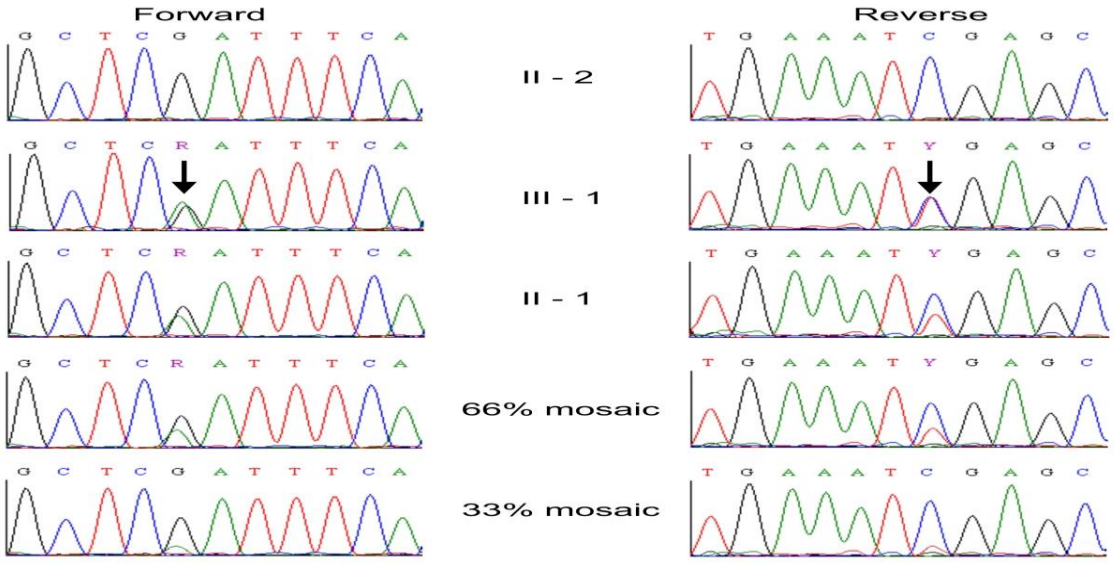
Неврологичният статус е нормален. ЕЕГ записът, осъществен на 40 годишна възраст не показва отклонение от нормата за възрастта.

2.2.2 Генетично изследване.

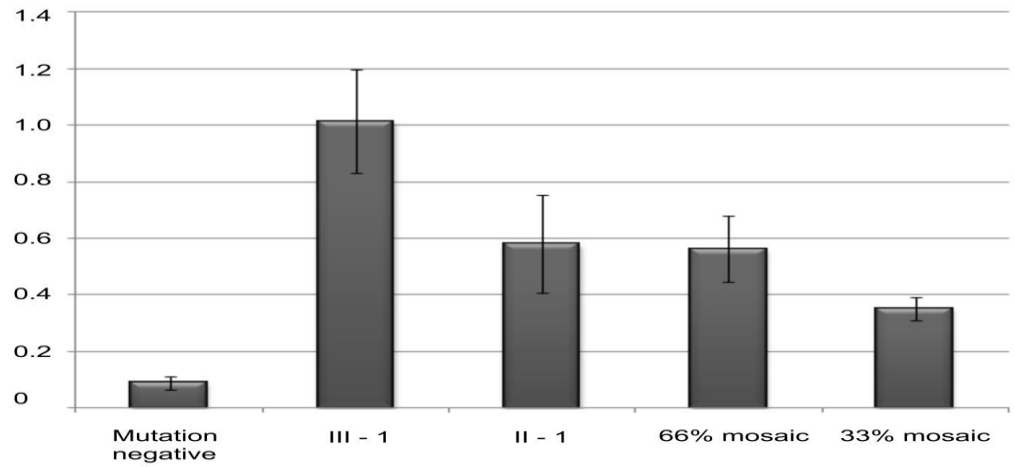
При проведените молекулярно-генетични изследвания с мутационен анализ на SCN1A гена, беше идентифицирана погрешносмислена мутация c.580G>A, водеща до замяна на консервативен аспартатен остатък с аспарагин в позиция 194 (p.D194N) в S3 сегмент на ДI протеиновия домен. Анализът за мутации при останалите членове на фамилията откри p.D194N мутацията при бащата, но не и при родителите на бащата, нито при останалите роднини (**Фигура 5**). Секвенционният анализ при бащата показа, че е възможно наличие на мозаицизъм в неговите периферни кръвни клетки (**Фигура 8**). Това беше потвърдено и от резултатите от TaqMan assay, където количеството на мутантните спрямо нормалните алели в клетките на бащата, изчислено чрез 2-delta delta C(T) метод [Livak& Schmittgen, 2001] е около 60-70% (**Фигура 9**).

Мутацията c.580G>A не беше открита при нито един пациент с епилепсия, нито при семейства с епилепсия от същия етнически произход. Същата мутация не беше открита и при скринирането на здрави контроли от ромската популация.

Фигура 8. Секвенционни хроматограми: на майката на пробанда II-2, на пробанда III-1, на бащата II-1, и контролни проби с различен процент музаицизъм. Стрелките показват мутиралия нуклеотид в кодон 194.



Фигура 9. Количествено определяне на мутантните алели чрез TaqMan assay: нивото при пробанда III-1 (мутацията е представена в 100% от клетките) е оценено, като нормалните алели са използвани като ендогенна контрола и това е представено на графиката като 1.0; ниво при бащата (II-1) и контроли, спрямо нивото на III-1.



2.2.3 Обсъждане

Представена е малка ромска фамилия, в която са идентифицирани двама членове (баща и син) с епилепсия. При пробанда, началото на епилептичния синдром е под 1 годишна възраст (4.5 месеца), с провокирани от фебрилитет и медикаментозно резистентни парциални и генерализирани тонично-клонични пристъпи, съчетан с изоставане в нервно-психичното развитие. Не се съобщават миоклонии и/или абсанси. С възрастта се наблюдава намаление на честотата на епилептичните пристъпи, като е постигнат пълен контрол на 12 годишна възраст. При бащата е налице по-лек фенотип, с начало на епилепсията на 5-6 месечна възраст с фебрилни гърчове, сравнително редки парциални и генерализирани тонично-клонични пристъпи, спонтанно спиране на пристъпите на 12 годищна възраст и нормален интелект. Тези анамнестични данни в съчетание с проведените ЕЕГ, МРТ и генетични изследвания дават основание да се приеме, че пробандът е с гранична форма на синдрома на Dravet, макар и с атипични прояви, като изоставане в нервно-психичното развитие още от раждането, а бащата е с по-лекия фенотип на синдрома на генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс.

Хипотезата, че p.D194N е мутация с ефект на родоначалника в ромската популация беше отхвърлена тъй като не бе открита при останалите членове на семейството, както и при изследването на контролен панел от здрави и засегнати от епилепсия ромски фамилии. Ограничената сегрегация в тази фамилия показа, че мутацията най-вероятно е възникнала de novo в бащата на пробанда.

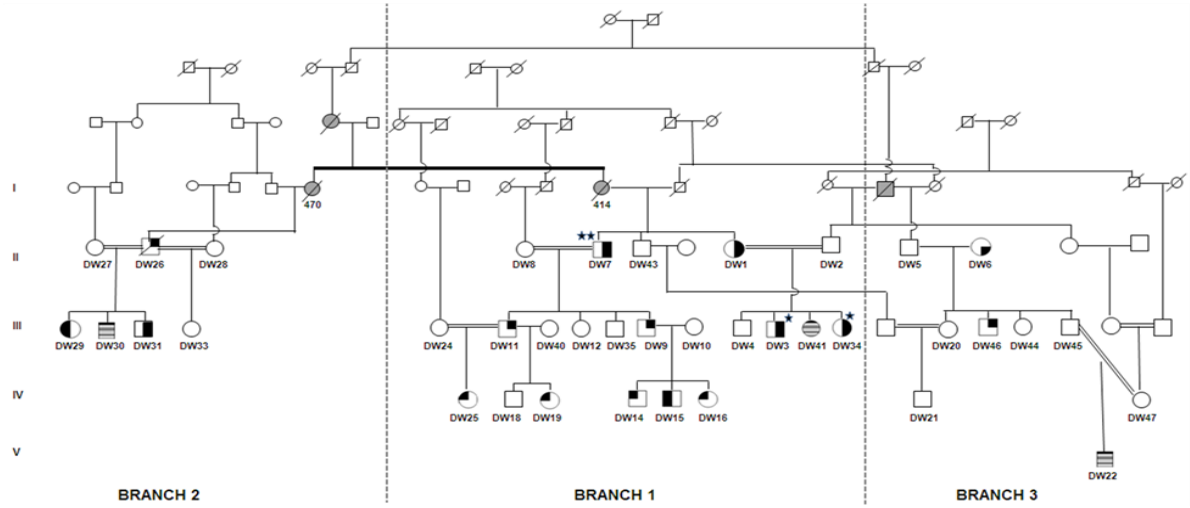
Откриването на това семейство с погрешносмислена мутация, унаследена от баща с мозаицизъм показва, че този механизъм може би е по-чест отколкото се предполага.

2.3 Клинико-генетично проучване на семейство от село Слънчево.

Това семейство е идентифицирано за първи път от Търнев и съавт. (2007г.) и представлява първото проучване на фамилните генерализирани епилепсии сред ромската общност. Като част от научната работа по настоящата дисертация, фамилията беше проследена, разширена бе генеалогичната информация и бяха идентифицирани нови 18 индивида от известен преди това клон на фамилията и нов клон на родословието. Събрани бяха нови клинични данни за пациентите.

Семейството принадлежи към субгрупата на Калдерашите, която представлява млад генетичен субизолат, част от Влашката група роми. Структурата на родословието е сложна (**Фигура 10**), с множество близкородствени бракове. В него се откриват *19 болни* (11 мъже и 8 жени) с епилепсия.

Фигура 10. Структура на семейството. Легенда: ФГ; ФГ плюс; ГТКП; Парциални пристъпи; * Парциални пристъпи с късно начало; ** Парциални пристъпи след ЧМТ; Некласифицирани пристъпи



2.3.1Фенотипни характеристики

Събраната клинична информация за 19 пациента с епилепсия е обобщена в **таблица 2.** При трима от тях, принадлежащи към различни клонове на семейството, се наблюдават разлики във фенотипа в сравнение с останалите 16 индивида. Това са пациентите DW41 (от клон 1), DW30 (клон 2) и DW6 **(**клон 3).

При всички останали 16 пациента от семейството, ранното нервнопсихично развитие и неврологичния статус са в норма. При DW11 е налице леко когнитивно нарушение. Фебрилни гърчове с начало между 5 месечна и 3 годишна възраст и край до 6 годишна възраст се съобщават при 4/16, а при 3/16 индивида, те могат да се класифицират като фебрилни гърчове плюс. При по-възрастните членове на семейството липсва надеждна информация за наличието на фебрилни гърчове в детска възраст. При тези пациенти епилептичните пристъпи започват в ранното детство и продължават до късна възраст. Освен ГТКП при тях се описват и КПП с късно начало, характеризиращи се с оро-алиментарни и двигателни автоматизми и честа вторична генерализация.

Интерикталните ЕЕГ записи са абнормни почти във всички случаи (**фигури 11 и 12).** МРТ изследване на главен мозък беше проведено при 7/19 пациента- в норма при четирима (DW11, DW 29, DW31 и DW 41), с данни за посттравматични енцефаломалатични огнища при двама (DW 3 и DW7) и с данни за мезиална темпорална склероза при един (DW30) **(Фигура 13**).

Таблица 2. Клинични, ЕЕГ и МРТ данни от изследването на засегнатите членове на фамилията от село Слънчево.

№	Роден	Пол	ФГ	Начало/ Край на ФГ	ГТКП-начало, честота	Аура	КПП-начало, честота	КПП-описание	EEG	MPT	АЕМ	Фенотип
DW14	1984	М	Да	5м./3г.					2001 пароксизмален фокус Д Ф-Т 2008 двустранни Ф-Т остри вълни			ФГ
DW16	1990	М	Да	1г.6м./5-6г.					2001 генерализирани бавни вълни 2008 двустранно Ф и генерализирани (ХВ) остри и бавни вълни			ФГ
DW19	1995	Ж	Един	3г.					2001 генерализирани острия и бавни вълни 2008 нормално			ФГ
DW25	1981	Ж	Да	6м. /12м.					2007 нормално			ФГ
DW15	1987	Ж	Един	1г.	2г, един единствен				2007 генерализирани комплекси острие-бавна вълни			ФГ+
DW29	1973	Ж	Да	1м./7г.	5г, първоначално 1/м.; сега 1-2/г.				2001 генерализирани остри вълни 2007 нормално 2010 два нормални записа и един с генерализирана пароксизмална активност	2001 и 2010-нормални	CBZ	ФГ+
DW22	1986	М	Да	2.5г./ ??	Ранно детство, първоначално 2-3 г./спрели	Не	Начало на 3-4г.; Честота 3-4 дневно. Спрели на 10 г. възраст	Внезапно се втренчва, гледа си ръцете и ги движи, изглежда	2008 – огнищни остри и бавни вълни Д-Ф и билатерално Ф-Т при ХВ		VPA, Сега е без лечение	ФГ+, КПП

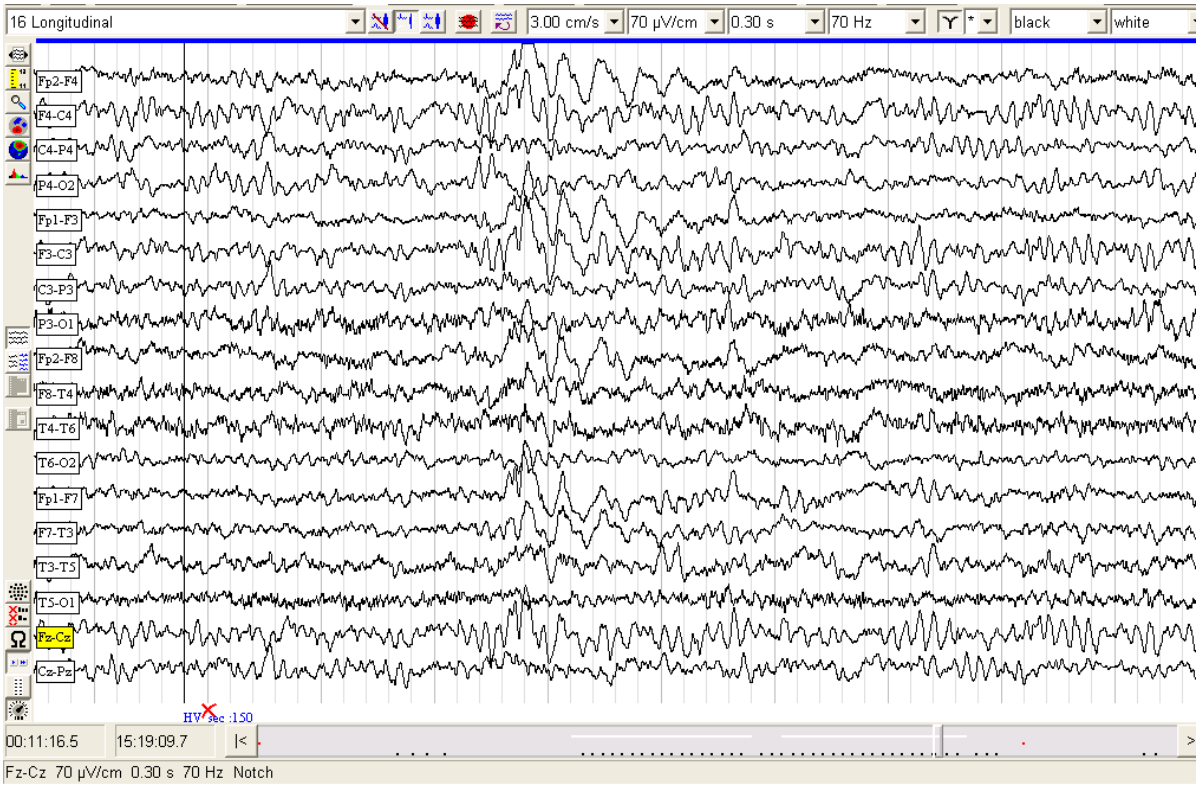
					на 17г. възраст			объркан, не отговаря при повикване				
DW1	1936	Ж	??		Ранно детство, първонача лно1/седм .-1/м, сега-4/г.	Има неприятни усещания в стомаха, издигащи се към гърлото, чувства главата си „объркана”	Начало ~ на 66г./ неизвестна честота	Говори несвързано за около 1-2 мин, изглежда объркана	2001 генерализирани острия и остри вълни 2008 огнищни бавни вълни в Д Ф (2Hz).		CBZ, Сега е без лечени е	ГТКП с ранно начало, КПП
DW7	1944	М	??		Ранно детство, 5-6/м., почти ежедневн и след ЧМТ		Започват след ЧМТ, 2-3/м.	Става агресивен, обръща си очите нагоре, главата наляво, примляква, объркан е, говори несвързано, дърпа си дрехите	2001 фокални и генерализирани бавни вълни 2007 генерализирани комплекси острие-бавна вълна 2008 нормално	2001- данни за ПТЕ ляво, фронтално	CBZ, VPA	ГТКП с ранно начало, КПП след ЧМТ
DW3	1959	М	Не		2г., първонача лно 1-2/м, сега 1-2/г.		??; 1/м.	Втренчен поглед, облизва си устата, пипа си дрехите	2001 генерализирани комплекси острие-бавна вълна 2007 фокус в Д-О; 2008 норма 2009 норма	2009 - ПТЕ в периферията на ляв gyrus supramarginal и superior temporal	ОХС, понаст оящем – без лечени е	ГТКП с ранно начало, КПП в късна възраст
DW34	1962	Ж	Не		Ранно детство, без пристъпи от 44 г. възраст;		~40г., винаги с вторична генерализаци я, неизвестна честота	Променя се цветът на лицето, изглежда уплашена, говори	2001 нормално 2008 дискретни, огнищни тета и остри вълни Д-Т		CBZ, понаст оящем – без лечени е	ГТКП с ранно начало, КПП в късна възраст

					1/м.			несвързано				
DW11	1965	M	Не		1г., първонача лно 1/ годишно, след това 1/1-2дни, сега 1/м.				2001 генерализирани остри и бавни вълни 2008 две нормални	2002 и 2008 в норма	VPA	ГТКП с ранно начало
DW26	1946	M	??		Ранно детство, 1-2/м.				2001 генерализирани, пароксизмални остри вълни		CBZ	ГТКП с ранно начало
DW9	1967	M	Не		Един на 26г.				2001 генерализирани остри вълни 2008 нормално		CBZ за 2 седмици	Един ГТКП
DW31	1962	M	Не		Ранно детство/ без пристъпи от 20г. възраст; първонача лно 1/м; след това 3-4/г.				2010-нормално	2010-норма	CBZ, понастоящем – без лечение	ГТКП с ранно начало
DW46	1977	M	??		Два непровоки рани на 4 и 5г.				2008 – огнищни остри вълни Д-Т след ХВ		Не	ГТКП с ранно начало
DW30	1971	M	Не			Усеща, че пристъпът идва, все едно, че го удря	3г./ КПП винаги с вторична генерализаци	Движи се безцелно из стаята, премества	2001 генерализирани комплекси острие-бавна вълна 2010 огнищни острия	2010-мезиална темпорална склероза в	CBZ, VPA, LTG	КПП с вторична генерализация,

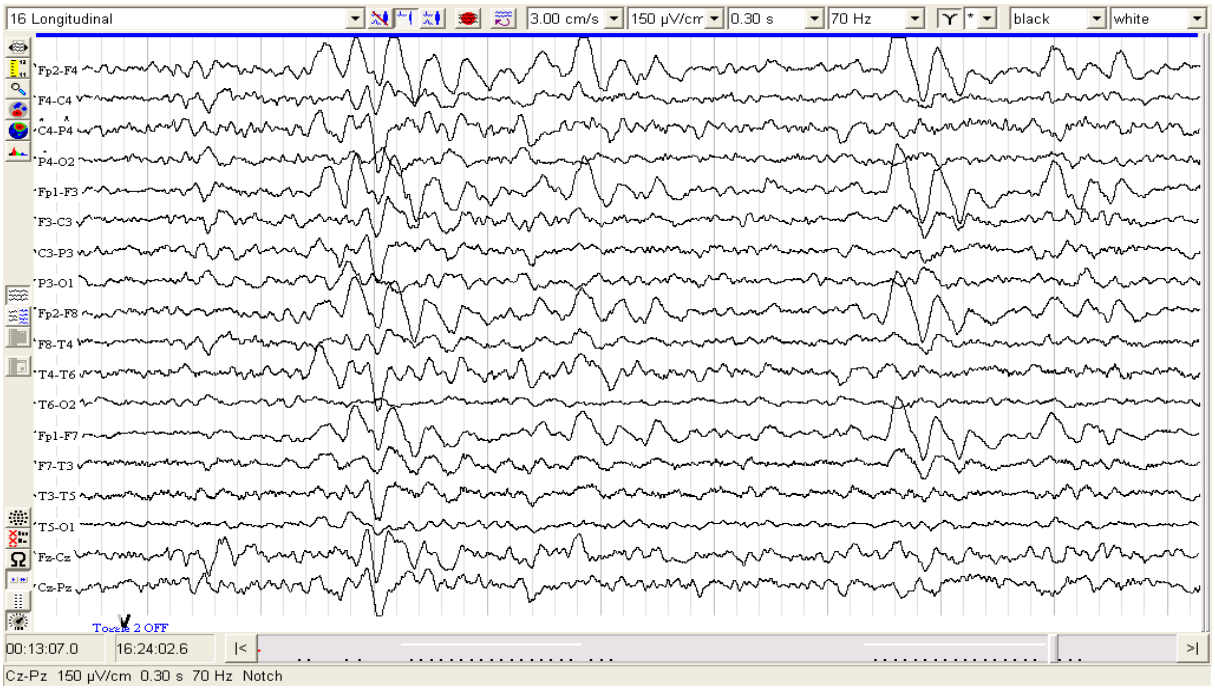
						слънцето, има болка в стомаха, сърбеж в главата и крайниците	я; първоначално 3-4/м., сега 8-9м.	предмети, неконтактен, примляква	и бавни вълни Д Т, Л-Ф с генерализация при ХВ	дясно		фенокопие ?
DW41	1964	Ж	Не			Чувства се зле, нервна, търси място да седне	15г., КПП с вторична генерализация; 1-2/м., няма пристъпи от 45 г. възраст	Става нервна, агресивна, говори несвързано за около 30 мин., дърпа си косата, хвърля предмети, тялото й трепери или стои тихо за 5-10 мин.	2009 норма	2009 - норма	??	КПП или псевдоепилептични пристъпи
DW6	1949	Ж	Не			Неприятно чувство в стомаха, което се издига към гърлото	От 15г. до 30г. възраст КПП, винаги с вторична генерализация; 2-3 дневно до 1-2/м	Гледа объркано ръцете си, дърпа си косата, върти си главата, изпъва си краката	2008-норма		??	КПП

М-мъж; Ж-жена; М-месец; Г-година; Мин-минути; ЧМТ – черепно-мозъчна травма; Д – дясно; Л- ляво; Ф – фронтално; Т – темпорално; О – окципитално; CBZ – карбамазепин; VPA - валпроат; LTG - ламотрижин; ХВ – хипервентилация; ИФС – интермитентна фотостимулация; Хц – херц; ПТЕ – посттравматично енцефаломалатично огнище; № -номер на пациента в родословието; ?? – няма информация

Фигура 11. Интериктален ЕЕГ запис на пациент DW 22, проведен на 22 годишна възраст с данни за остри и бавни вълни двустранно фронто-централно и темпорално.

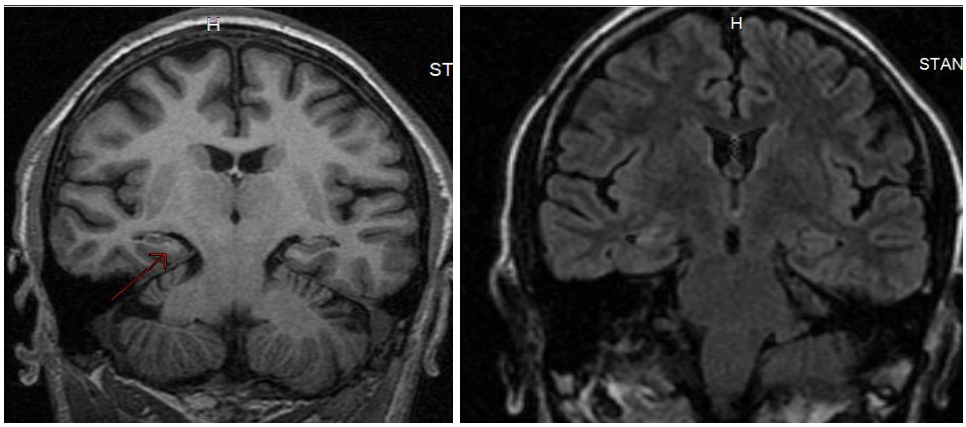


Фигура 12. Пациент DW 16. Интериктален ЕЕГ запис на 18 годишна възраст, с данни за бифронтални остри и бавни вълни.



Фигура 13. МРТ на главен мозък на пациент DW30 на коронарни T1 (а) и коронарни T2 FLAIR (б) изображения, демонстриращи мезиална темпорална склероза в дясно.

(а) (б)

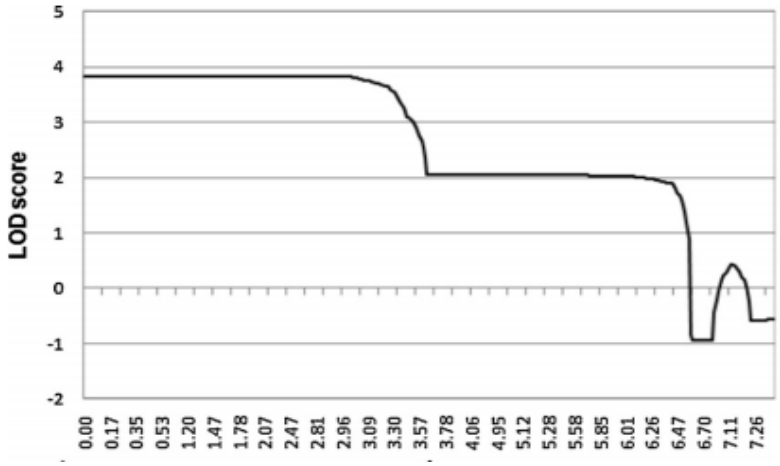


2.3.2 Генетични изследвания.

Проведеният анализ за скаченост при автозомно-доминантен модел на унаследяване идентифицира нов локус на хромозома 12p13.33 с LOD score 3.84 (**Фигура 14**).

Регионът 12p13.33 не съдържа гени кодиращи йонните канали, но обхваща гени свързани с рецептора за гама-аминомаслена киселина. SLC6A12 (BGT-1) и SLC6A13 (GAT2) кодират транспортни молекули, участващи в обратното захващане на гама-аминомаслената киселина. ERC1 (RAB6-interacting protein 2 isoform beta) кодира член на Rab3-interacting molecule (RIM)-свързващите протеини. Секвенирането на тези три функционални кандидати идентифицира 57 полиморфизма, от които 15 са нови. Никой от тези варианти не сегрегира с фенотипа при това семейство.

Фигура 14. Параметричен анализ за скаченост на хромозома 12p13.33, включващ 1 и 2 клон на семейството от село Слънчево. Резултатът е получен, като е приет автозомно-доминантен модел на унаследяване с намалена пенетранност (0.7) и 1% на фенокопията.



2.3.3 Обсъждане:

Представена е голяма ромска фамилия със сложна структура и множество членове и епилептичен синдром, който се унаследява автозомно-доминантно с

непълна пенетранност. Част от това семейство бе докладвано от Tournev и съавт. (2007), като с помощта на многобройни повторни интервюта и нови клинични изследвания, генеалогичната информация беше разширена, откриха са нови членове от известен клон на фамилията и се включиха такива от нов клон на фамилията.

Също така бяха направени някои промени във фенотипа на част от изследваните преди това пациенти, като най-важната от тях е при DW30, при който подробната анамнеза, ЕЕГ и МРТ изследванията спомогнаха за фенотипното му отдиференциране от неговите роднини от първа степен и останалата фамилия.

Епилептичният синдром при това семейство отговаря в най-голяма степен на синдрома на генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс, тъй като е налице съчетание на фебрилни гърчове, фебрилни гърчове плюс, генерализирани и парциални пристъпи. Характерна клинична проява при нашата фамилия е високата честота на парциални пристъпи в сравнение с честотата на фебрилни гърчове/фебрилни гърчове плюс. Такива парциални пристъпи, без предшестващи фебрилни гърчове са добре описани и при други ГЕФГ+ фамилии с мутации в гени кодиращи субединици на натриевия канал [Scheffer и съавт. 2007], но толкова висока честота е малко необичайна (пет пациента с КПП, спрямо шест пациента с фебрилни гърчове/ фебрилни гърчове плюс). Трябва да се има предвид и факта, че при по-възрастните членове от семейството липсва надеждна информация за фебрилни гърчове/фебрилни гърчове плюс в детска възраст, така, че това сравнение може да не е съвсем точно. При някои от пациентите, преживяна тежка черепно-мозъчна травма най-вероятно обуславя появата на парциални пристъпи, на фона на наследствен генетичен епилептичен синдром с характерни ЕЕГ промени от генерализирана активност от комплекси острие-бавна вълна.

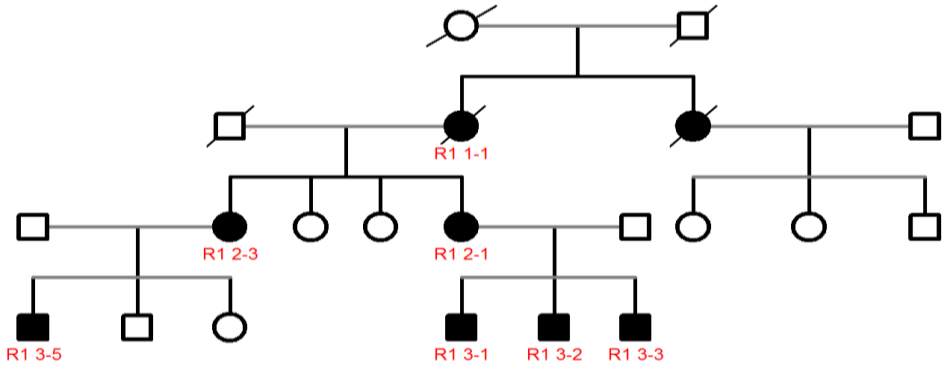
Интересно наблюдение при това семейство е и тенденцията, фенотипът да бъде по-тежък при по-възрастните индивиди, в сравнение с по-младите поколения, но най-вероятно ко-морбидността играе роля и за това. Като цяло епилепсията не представлява сериозен медицински проблем за членовете на фамилията и за това по-голяма част от тях не са приемали редовно антиепилептични медикаменти.

При фамилията беше проведен нов геномен скан с висока гъстота на SNP маркерите и повторен анализ за скаченост, въз основа на новата структура на родословието. Така беше идентифициран най-подходящият кандидат локус в това семейство, картиран върху късото рамо на хромозома 12 (12p13.33). Първоначалният LOD score се повиши на 3.84, когато беше изключен 3 клон от фамилията, където изглежда, че билинеалността е довела до включване на друг ген за болестта. Резултатът е показателен за генетична хетерогенност, въпреки инбредния и ендогамен характер на семейството и популацията от която то произлиза. Тези данни са допълнително доказателство за липсата на ефект на родоначалника и значителната генетична хетерогенност при епилепсията в ромската популация.

2.4. Клинично и генетично проучване на фамилия от село Разград.

Семейството принадлежи към субгрупата на българските роми християни (дасикане рома) и се състои от два клона, като единия клон на семейството живее в село Разград, област Монтана, а другия в Софийска област. Идентифицирани са *6 болни (2 жени и 4 мъже)* с епилепсия в две последователни поколения **(Фигура 15)**. В това семейство няма данни за кръвнородствени бракове.

Фигура 15. Родословие на фамилия от село Разград. Пациентите с епилепсия са означени с черни символи.



2.4.1 Фенотипни характеристики

Клиничните данни от изследването на шестимата засегнати индивиди са обобщени в **таблица 3.**

На **фигури 16 и 17** са представени ЕЕГ записи на пациенти R1-2-1 и R1-3-1.

2.4.2 Генетични изследвания

Осъществен беше многоточков анализ за скаченост с 16K SNP карта и изчисления на Merlin 1.1.1, при автозомно-доминантен модел на унаследяване (70% пенетранност), 0.001 честота на болестните алели и 1% честота на фенокопията, както и екзомно секвениране на целия геном на трима от болните и един здрав член на родословието (R1 2-2, 2-3, 3-1 и 3-2). Така беше идентифициран само един вариант -погрешносмислена мутация в NCKAP5 гена с две алтернативни форми-M_207481.3:c.1148C>T (p.(Ser383Phe)) и NM_207363.2:c.5105C>T (p.Ser1702Phe). Позицията на варианта в човешкия геном 19 е хромозома 5:133,531,412G>A. Един от здравите родственици (R1 2-6) на фамилията е носител, което съответства на унаследяване с непълна пенетранност.

Таблица 3. Данни от проведените клинични и инструментални изследвания при пациентите от фамилията от село Разград.

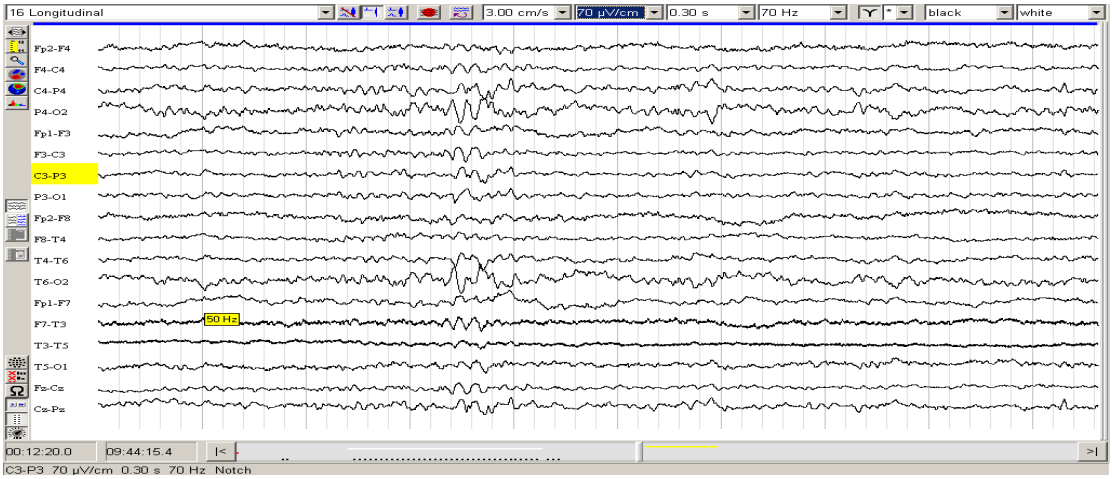
№	Роден	Пол	ФГ, начало/ край	Афебрилни пристъпи начало/край	Вид на пристъпите	Семиология на пристъпите	Честота	ЕЕГ	МРТ, СЕП, ЕКГ	Невропсихологично изследване	Тера-пия	Фено тип
R1-2-1	1975	Ж	Не	2г./ ВГТКП – няма от 29г.възраст; ППП- продължават	ППП, ВГТКП	Прости слухови (бучене в ушите) халюцинации и автономни симптоми (изпотяване, сърцебиене), понякога с вторична генерализация	ППП и ВКТКП: първоначално 1-2дневно; По-късно – 1-2/г.; ВГТКП – няма от 29г. възраст; ППП 2-3/г.	2007: фокус от комплекси острие-бавна вълна в Д Т-О; 2011: пароксизмална активност двустранно Т; 2012-остри и тета вълни двустранно центро-темпорално	МсСЕП 2012– леко смутена слухова аферентация на средно стволово ниво в ляво, по-изразено при ипсилатерална стимулация; СЕП – в норма ЕКГ (2011 и 2012) – в норма	2011 и 2012- леко когнитивно нарушение с изразен паметов дефицит	VPA	ППП, ВГТКП
R1-3-1	1995	М	10м/5-6г	2-3г /ВГТКП няма от 12г. възраст; ППП- продължават	ППП, ВГТКП	Прости слухови халюцинации (бучене в ушите) и автономни симптоми (сърцебиене, изпотяване, пребледняване, повишено артериално налягане), понякога с вторична генерализация	ВГТКП –от 3-4/седм. до 1/м., няма от 12г ППП- първоначално2-3/м, сега 1/м.	2007: суспектен фокус в Л Ф при ИФС; 2008: суспектен фокус от остри вълни в Л Ф; 2009: пароксизмална активност от остри вълни, двустранно Т, Д>Л; 2009: генерализирана пароксизмална активност при ХВ и ИФС; 2010: Пароксизмална активност двустранно Ф-С и Т Л>Д, спонтанно и при ИФС (4Hz); 2011-пароксизмална активност след ХВ двустранно Р-О; 2012-слабо проявен фокус от остри вълни Л П;	МРТ 2011-в норма МСЕП 2012-двустранно леко смутена слухова аферентация на високо стволово ниво при стимулация на ЛУ, повече контралатерално; СЕП – смутена слухова аферентация на корово ниво при стимулация на ЛУ, повече ипсилатерално ЕКГ (2011 и 2012) в норма	2009 – в норма	VPA	ФГ, ППП, ВГТКП
R1-3-2	1991	М	7-8м/3г	1г/ВГТКП	ППП,	Прости слухови	ВГТКП –	2007: пароксизмална	ЕКГ 2011 – в норма		Не	ФГ,

№	Роден	Пол	ФГ, начало/ край	Афебрилни пристъпи начало/край	Вид на пристъпите	Семиология на пристъпите	Честота	ЕЕГ	МРТ, СЕП, ЕКГ	Невропсихологично изследване	Тера-пия	Фено тип
				спрели на 16г; ППП - продължават	ВГТКП	халюцинации (бучене) и автономни симптоми (изпотяване, прилошаване), понякога с вторична генерализация	първоначално 3-4/м.; няма от 16г. възраст; ППП–3-4/г ;	активност от остри и бавни вълни Т-О.				ППП, ВГТКП
R1-3-3	1997	М	Не	2-3г./ ВГТКП спрели на 16г; ППП - продължават	ППП, ВГТКП	Прости слухови халюцинации (бучене в ушите), автономни (изпотяване, пребледняване, сърцебиене) и зрителни (замъглено зрение) симптоми, понякога с вторична генерализация	ВГТКП – Първоначално 1-2/м; няма от 10г. възраст; ППП преди-1-2/м; сега 3-4/ г.	2007: фокус от комплекси острие-бавна вълна Л Т-О; генерализирана пароксизмална активност при ХВ с максимум Ф и Т-О; 2008: фокус от комплекси острие-бавна вълна Л Т-О; 2009: генерализирана пароксизмална активност; 2009: фокус от бавни вълни Д Т; пароксизмални разряди от остри вълни в Д Т при ХВ; 2010: пароксизмална активност двустранно Р-О, Д>Л с еднократна генерализация; 2011 – пароксизмална активност П-О Д>Л с периодична генерализация; 2012-фокус от остри и от високоамплитудни бавни вълни (абортивни комплекси?) в Д С-Т с контралатерална ирадиация.	МРТ 2011-в норма СЕП 2012- в норма ЕКГ (2011 и 2012) – в норма	2009 – норма 2012 –коефицент на интелигентност в диапазона на гранична интелигентност	VPA	ППП, ВГТКП
R1-2-3	1968	Ж	Не	7-8г/	КПП,	Прости слухови	ВГТКП -1-2/м	2009 : разряди от остри и			Не	КПП,

№	Роден	Пол	ФГ, начало/ край	Афебрилни пристъпи начало/край	Вид на пристъпите	Семиология на пристъпите	Честота	ЕЕГ	МРТ, СЕП, ЕКГ	Невропсихологично изследване	Тера-пия	Фено тип
				продължават	ВГТКП	халюцинации (бучене), автономни (изпотяване, прилошаване, неприятно чувство в стомаха отиващо към гърлото) и зрителни (замъглено виждане) симптоми, нарушаване на съзнанието, понякога с вторична генерализация	КПП -3-4/седм	високоамплитудни бавни вълни 2-3 Hz бифронтално с генерализация по време на ХВ.				ВГТКП
R1-3-5	1992	М	Не	Ранно детство /13-14г	ВГТКП	Автономна (прилошаване, пребледняване) аура	ВГТКП от 4/седмично, през 1/м; няма от 13-14г. възраст	2011- в норма			Не	ВГТКП

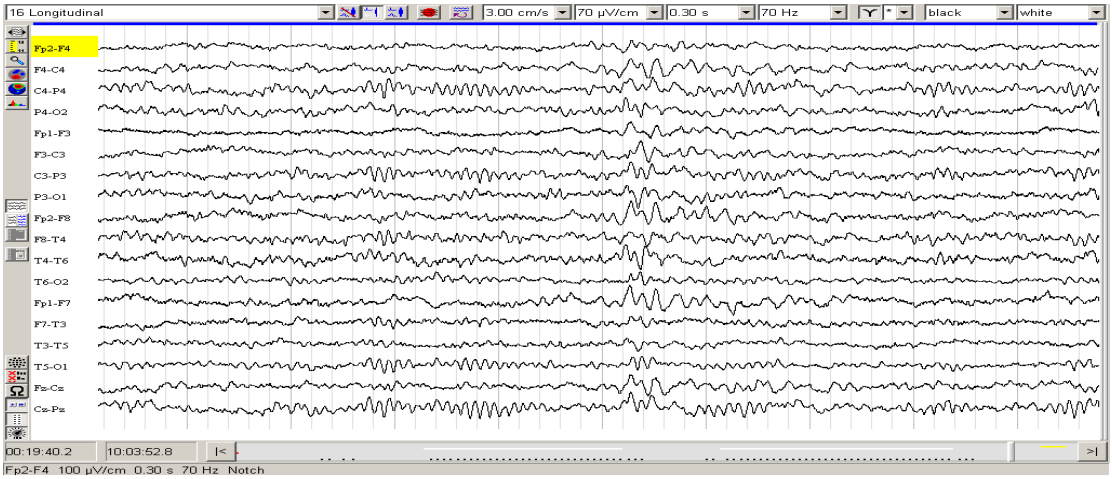
М-мъж; Ж-жена; М-месец; Г-година; Седм-седмично; Д – дясно; Л- ляво; Ф – фронтално; Т – темпорално; О – окципитално; Р- париетално; VPA - валпроат; ХВ – хипервентилация; ИФС – интермитентна фотостимулация; Хц – херц; № -номер на пациента в родословието; ЛУ – ляво ухо

Фигура 16. Интериктален ЕЕГ запис на пациент R1-2-1, проведен на 32 годишна възраст, показващ фокус от остри и бавни вълни в дясно темпорално.

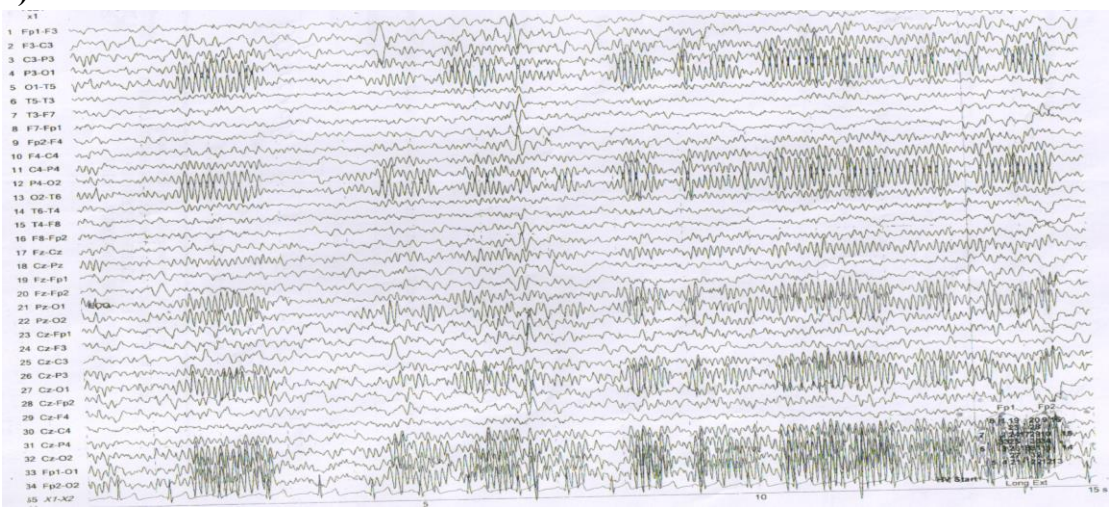


Фигура 17 а) Интериктален ЕЕГ запис на пациент R1-3-1 на 14 годишна възраст. Почти генерализиран залп от остри вълни; **б)** Интериктален ЕЕГ запис на същия пациент на 15 годишна възраст, показващ остри вълни в ляво фронтално с широка ипси- и контралатерална ирадиация.

а)



б)



2.4.3 Обсъждане

Представеното ромско семейство се характеризира с епилептичен синдром с начало в ранна детска възраст и парциални (предимно прости) и вторично-генерализирани епилептични пристъпи и структура на родословието, предполагаща автозомно-доминантен модел на унаследяване. Характерна проява на парциалните пристъпи в това семейство са простите слуховите халюцинации. Аурата е автономна (прилошаване, отмаляване, замайване, сърцебиене) при един пациент, а при останалите пет автономните симптоми се появяват непосредствено след слуховите халюцинации. Епигастралната аура е изключение. Комплексни парциални пристъпи са описани само при един пациент и те протичат с нарушено съзнание, без оро-алиментарни и/или двигателни автоматизми. Зрителни симптоми са налице при двама от пациентите, като те следват слуховите халюцинации. Фебрилни гърчове са съобщени при двама от пациентите. Интериктални ЕЕГ абнормности бяха установявени основно в темпоралните области с разпространение и в съседни области (фронтална, окципитална и париетална). Невропсихологични изследвания бяха проведени при трима пациенти, като при един от тях се установи леко когнитивно нарушение с по-изразен паметов дефицит. Тази пациентка е с по-дълга еволюция на епилепсията в сравнение с останалите членове на фамилията и е възможно това да е причина за установените когнитивни нарушения. МРТ на главен мозък, проведен при двама от болните, е без данни за структурни абнормности. Заболяването показва сравнително доброкачествен ход на протичане. В случаите, когато пациентите са приемали редовно антиепилептичната си терапия (монотерапия с валпроат) е постиган добър контрол върху пристъпите. Като цяло епилепсията не се възприема като сериозен здравен проблем от членовете на фамилията и за това по-голяма част от тях не се лекуват системно.

Въз основа на направеното по-горе обобщение на данните, най-вероятната диагноза при тази фамилия е фамилна темпорално-дялова епилепсия. Клиничните прояви при това семейство приличат на описаните преди това в литературата фамилии с автозомно-доминантна латерална темпорално-дялова епилепсия [Ottman и съавт. 1995; Poza и съавт. 1999; Michelucci и съавт. 2009] по наличието на парциални (основно прости парциални и вторично-генерализирани) пристъпи с типични слухови халюцинации, контрол на пристъпите от медикаментозна терапия, нормален неврологичен статус, нормално МРТ изследване и автозомно-доминантен модел на унаследяване. Това, което отличава нашето семейство е по-ранното начало на епилептичния синдром (около 2-3 годишна възраст) и високия процент абнормни ЕЕГ записи.

При проведените молекулярно-генетични изследвания в тази фамилия не бяха идентифицирани мутации в LGI1 гена. Това не противоречи на диагнозата, тъй като такива мутации се установяват при около 50% от фамилиите с АДЛТЕ [Ottman и съавт. 1995; Berkovic и съавт. 2004/б/; Michelucci и съавт. 2003].

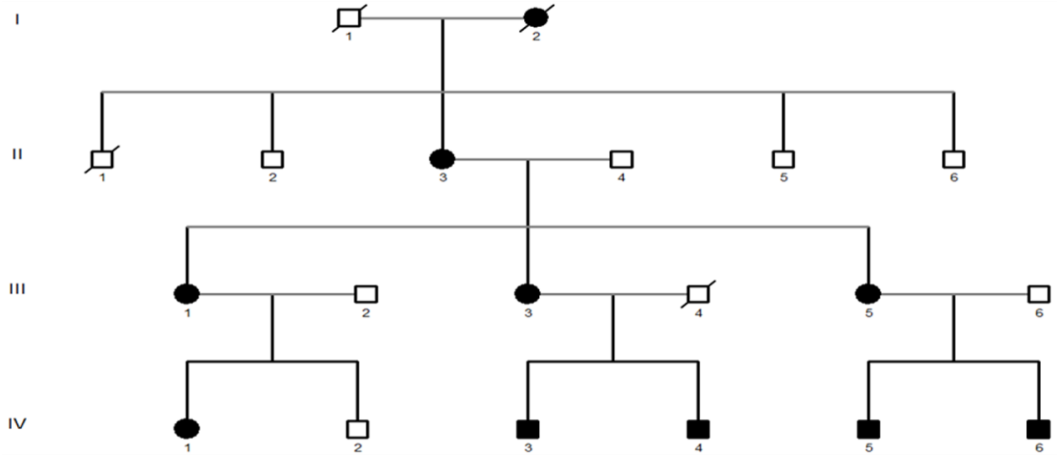
При проведения анализ за скаченост не беше установен локус, който би могъл да бъде свързан с фенотипа при това семейство.Осъщественото на следващ етап екзомно секвениране на целия геном на трима от болните и един здрав член на

родословието, идентифицира погрешносмислена мутация в NCKAP5 гена с две алтернативни форми -M_207481.3:c.1148C>T (p.(Ser383Phe)) и NM_207363.2:c.5105C>T (p.Ser1702Phe). Информацията за функцията на този ген в литуратурата е оскъдна, като единствено се знае, че генът се експресира в човешкия мозък [Matuoka и съавт., 1997].

2.5 Клинико-генетично проучване на фамилия от град София.

Семейството е от български произход и всички негови членове живеят в град София. В него бяха идентифицирани *девет пациента с епилепсия* (пет жени и четирима мъже) от три последователни поколения. Структурата на фамилията е представена на **фигура 18**.

Фигура 18. Родословие на фамилия от град София. Пациентите с епилепсия са представени с черни символи.



2.5.1. Фенотиптни характеристики

Събраната до момента клинична информация за деветте членове на фамилията, при които има данни за епилепсия е обобщена в **таблица 4**.

На **фигури 19 а и б** са представени ЕЕГ записи на пациент IV-1 на 17 годишна възраст с данни за генерализирана пароксизмална активност от остри и високоамплитудни бавни вълни с фронтален максимум.

На **фигура 20** е представено МРТ изследване на главен мозък на пациентка III-3 на 36 годишна възраст с данни за малкомозъчна атрофия и два малки хиперинтензни фокуса, съответно в дълбокото и подкоровото бяло мозъчно вещество в ляво фронтално.

Таблица 4. Данни от проведените клинични и инструментални изследвания при семейството от град София.

№	Роден	Пол	ЕП начало/ край	Видове ЕП	Честота	Описание на ЕП	ЕЕГ	МРТ	Други изследвания	Лечение на ЕП	Придружаващи заболявания
II-3	1947	Ж	37г./ продължават	КПП	Първоначално 1/ м., сега 1/ 3-4м.	Феномени на jamais vu	(2006): Бавновълнова активност - предимно тета вълни с би Ф максимум; (2011): пароксизмална активност Ф и Т (2012): Пароксизмална активност двустранно Ф и в Д предно- Т	2011 - Единични левкопатични фокуси в Л-Ф и двустранно в базалните ганглии. Мезиална глиоза в Д предно-Т и хипокампално. Дурална АВ фистула в Д-Т	Лактат в серум (2011г) **3.73mmol/l;** Аудиограма(2011): двустранно невросензорно намаление на слуха; ЕМГ(2011): От м.делтоидеус и бицепс брахии единични миогенни АП. Периферно-стволова увреда на сетивни влакна на долни крайници от аксонален тип; ЕхоКГ (2011): ЛК хипертрофия, дегенеративни промени на клапния апарат, малка митрална и трикуспидална инсуфициенция; Невропсихолог (2011): ЛКН (MMCE= 26-27/30);	VPA+LTG до 2007; Сега OXC+LTG	Макулна дегенерация; Глаукома; ЗД тип II; Автоимунен тиреоидит; АХ; Фиброкистична болест на дясна млечна жлеза; Бронхиална астма
III-1	1966	Ж	16г./ продължават	ППП (сензо-моторни), КПП, ВГТКП (предимно нощни)	Първоначално: ВГТКП 2-3 /м, ППП-неколкократно дневно и КПП 4-5/седм.; Сега 1 ВГТКП/ г., 2-3 КПП /м, 1 ППП/седм.	ППП: стягане и изтръпване в леви крайници, потрепване и изпъване на пръстите на лявата ръка. КПП-изключване за 1-2 мин, по време на които продължава извършваната дейност (без спомен), или спира с втренчен поглед и	(1990): Леко изразени иритативни промени от остри и тета вълни, рядко комплекси остра-бавна вълна, зачестяващи и синхронизиращи се по време на ХВ, когато са във вид на залпове. (1995): пароксизмална активност от остри вълни двустранно Ф-С и Т с променлив превес в Л и Д по време на ХВ. (2004): Пароксизмална активност	(2005, 2007, 2011)- в норма	Лактат в серум (2011г): **2.7mmol/l**; Аудиограма (2011)-норма; Невропсихолог (2011) – норма; ЕМГ (2011): леко изразена миогенна увреда в горни крайници. Периферно-стволова увреда от аксонален тип на сетивни влакна на долни крайници	В миналото PB, VPA, CZP, CBZ; Сега: OXC+Lacosamide	Мигрена; Автоимунен тиреоидит; Паническо разстройство

						примляска;	от остри вълни О двустранно. (2007): Краткотрайна пароксизмална активност по време на ХВ в Д-Т от остри вълни; (2011). Пароксизмална активност двустранно Ф-Т Л>Д				
III-3	1975	Ж	От 28г./ продължават	КПП, ППП (моторни)	Първоначално 1-2/г; От 2011 - 1/седм.; 2012-1/м	КПП -втренчване, примляскване, нарушено съзнание; ППП- периодични потрепвания на IV и V пръст на Д ръка	(2007) - Слабо проявен фокус от остри и тета вълни в Д П-Т. Генерализирана пароксизмална активност при ХВ; (2008г): пароксизмална активност при ХВ бифронтално с тенденция към генерализация. (2011г) : норма; (2011г): Пароксизмална активност двустранно Ф-С Л>Д при ИФ	(2011): Супратенториално в Л-Ф в дълбокото мозъчно вещество-единични пунктиформени хиперинтензни в Т2 фокуси. Закл. Находката се интерпретира като болест на малките съдове. Лекостепенна малкомозъчна атрофия.	Лактат в серум (2011г)- **2.38 mmol/l**; ЕМГ (2012)- леко изразена миогенна увреда в горни и долни крайници.; Аудиограма (2011)-норма; Невропсихолог (2011) – норма; ЕхоКГ (2012) – в норма	Преди VPA; Сега LTG	Макулна дегенерация; Глаукома; Автоимунен тиреоидит; Главоболие (смесен мигренозен и тензионен тип); Фиброаденом на дясна млечна жлеза; Рецидивиращо депресивно разстройство
III-5	1968	Ж	35г./ продължават	КПП	Първоначално ежедневно, сега - 2-3/г.	КПП- по типа deja-vu (места, ситуации, разговори й се струват познати), както и пристъпи, при които й се губят моменти и не си	(2008): нормална; (2008): дифузно пръснати тета и остри вълни; (2010): Слабо проявен фокус от остри и тета вълни в Л-Т при ХВ.	2010 – в норма.	Не са провеждани	Преди VPA; Сега LTG	Нарушен въглехидратен толеранс; Автоимунен тиреоидит;

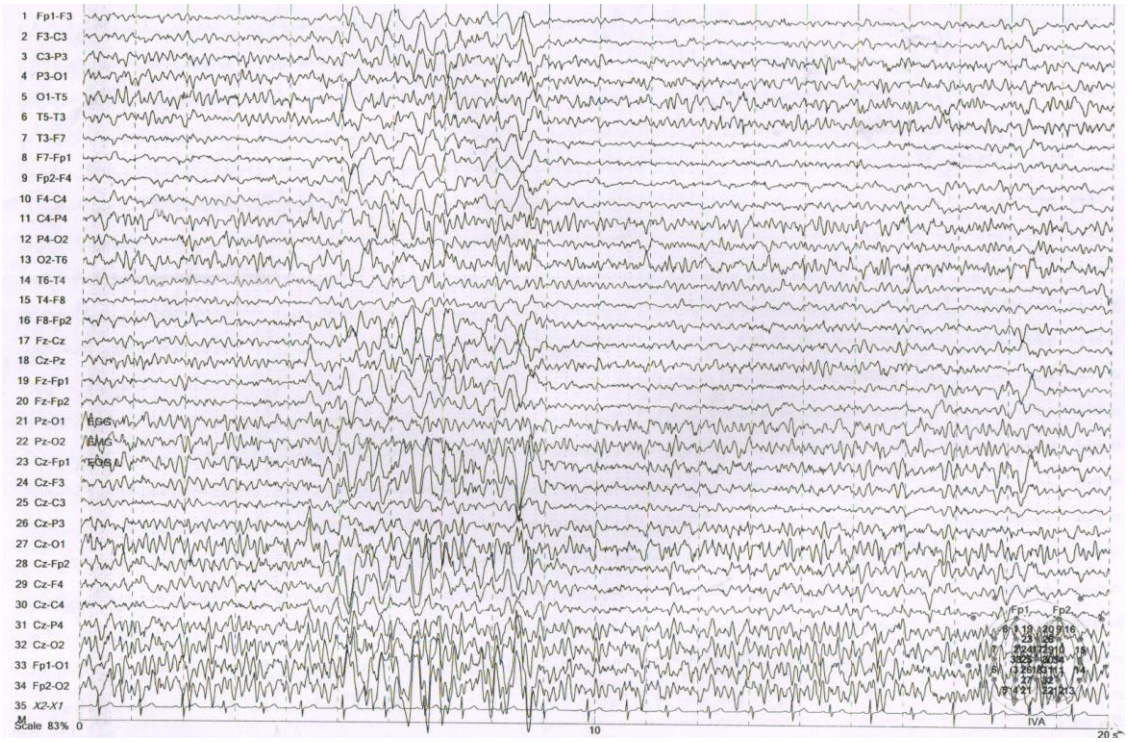
						спомня какво е правила, както и краткотрайни (за сек.) епизоди по време на които иска да каже нещо но не може.					Мигрена; Рецидивиращо депресивно разстройство;
IV-1	1988	Ж	2г./ продължават	КПП, ППП (моторни), ВГТКП	ВГТКП- от 1/м до 1г.; В миналото КПП и ППП ежедневни; Сега 1-2/м	КПП – спира да говори, неадекватна за няколко минути. ВГТКП- усещане за затопляне, стискане в гърдите, болка в стомаха, мъгляво виждане, последвани от падане на земята, с потрепване на крайниците. Нощните ВГТКП протичат с вокализация, предимно тонични са и са последвани от кратък клонус. ППП- потрепване на пръстите на ръцете и на крака.	(2001г): Пароксизмална активност Ф-Т при ХВ. (2006г): Пароксизмална активност от остри вълни в предно Т; (2007г): Пароксизмална активност двустранно Т Л>Д от остри вълни при и след ХВ. (2009): генерализирана пароксизмална активност с амплитуден максимум Ф-Т от високо амплитудни полиспайк – бавна вълна комплекси. (2011): Иритационни прояви в предните отвеждания	2001, 2007 и 2011: норма	Лактат в серум (2011г): 2.03 mmol/l; ЕМГ(2011): данни за миогенна увреда в горни и долни крайници; Невропсихолог (2011): норма	През годините: VPA, LTG, CBZ, LEV, GBP, CZP. Сега: LEV	Мигрена
IV-3	1997	М	7г./ продължават	ППП (моторни); КПП	КПП и ППП: първоначално ежедневни, понастоящем 1/ месечно;	ППП – потрепване на пръстите на ръката; КПП- краткотрайно (до 1 мин.) втренчване на погледа по време на което е неконтактен и неподвижен, но се случва понякога да	(2007): огнищна абнормност от остри, бавни вълни в дясно С-Р; (2007): пароксизмална активност от острия бифронтално с генерализация при ХВ и ИФС (2011) Пароксизмална активност	2011 – в норма	Невропсихолог (2011) – нормален интелект, синдром на нарушено внимание и хиперактивност, който персистира по тежест от по-ранна възраст.	Преди VPA; Сега LTG	Мигрена; Синдром на нарушено внимание и хиперактивност

						се движи безцелно из стаята.	с максимум двустранно Р-О.				
IV- 4	1995	М	2-3г./ продължават	Миоклонии ?	Неизвестна (по-често по време на сън)	Потрепване на единични мускули на ръцете и краката	(2007г): остри вълни с Ф максимум при ХВ; (2007г) огнищна абнормност от остри, бавни, високи вълни в Л Ф и задно-Т, с активация при ХВ. (2009г): норма (2010г)- норма (2011г): Иритационни прояви в Л Ф-С при ХВ.	2009 и 2011 – в норма	Невропсихолог (2011) – нормален интелект	CZP до 2009	Мигрена. ЗД тип 1
IV-5	1998		Ранна детска възраст/ продължават	Миоклонии ?	Неизвестна (по-често по време на сън)	Потрепване на единични мускули на ръцете и краката	(2007): леки дифузни промени от тета и остри вълни, увеличаващи се при ХВ с Ф максимум. Пароксизмална активност от остри вълни бифронтално при ХВ. (2007): в будност и естествен сън - изразена огнищна абнормност от остри, бавни високи вълни, с по-висока амплитуда в Д, честа синхронизация. Активация при ХВ и ФС. (2011): Фокус от остри вълни в Д-Т (рядка изява). Генерализирана пароксизмална активност от остри вълни при активационните проби.	2012г – в норма	Аудиограма (2011) - Липса на слух в лявото ухо. Закл. Неврит на н. статоакустикус в ляво. МсСЕП (2011): при стимулация на ляво ухо се регистрира подчертано смутена слухова аферентация (ограничен обем и с удължено проводно време на предимно периферно ниво (кохлеа, слухов нерв в екстракраниалната му част). На средно и високо стволово ниво, слуховата аферентация е в норма.	Не е провеждал	Мигрена
IV-6	2006	М	2г./??	Миоклонии ?	Неизвестна (по-често по време на сън)	Потрепване на единични мускули на ръцете и краката	(2008): в будност и по време на естествен сън - еднократен пароксизъм от остри, бавни, високи	Не е провеждан	Психолог (2009): Задръжка в експресивната реч на фона на съхранен интелект (когнитивни способности).	Не е провеждал	Не

							вълни.		Контактен, разбира и изпълнява поръчки. Играе по подражание. Приема и търси помощ. Общува със звукоподражания. Много собствено словотворчество.		

№- номер на пациента в родословието; М-мъж; Ж-жена; ЕП – епилептични пристъпи; м-месец; г-година; седм.-седмично; сек.-секунди; Ф- фронтално; Т-темпорално; С- централно; Р-париетално; ХВ – хипервентилация; ИФС – интермитентна фотостимулация; Д-дясно; Л-ляво; АВ – артерио- венозна; АП – акционен потенциал; ЕхоКГ – ехокардиография; ЛК – лява камера; ЛКН – леко когнитивно нарушение; VPA-валпроева киселина; LTG- Lamotrigine; OXC-Oxcarbazepine; LEV – Levetiracetam; CZP- Clonazepam; GBP – Gabapentine; ЗД – захарен диабет; АХ – артериална хипертония; ?? – липсва сигурна информация; Закл. - заключение

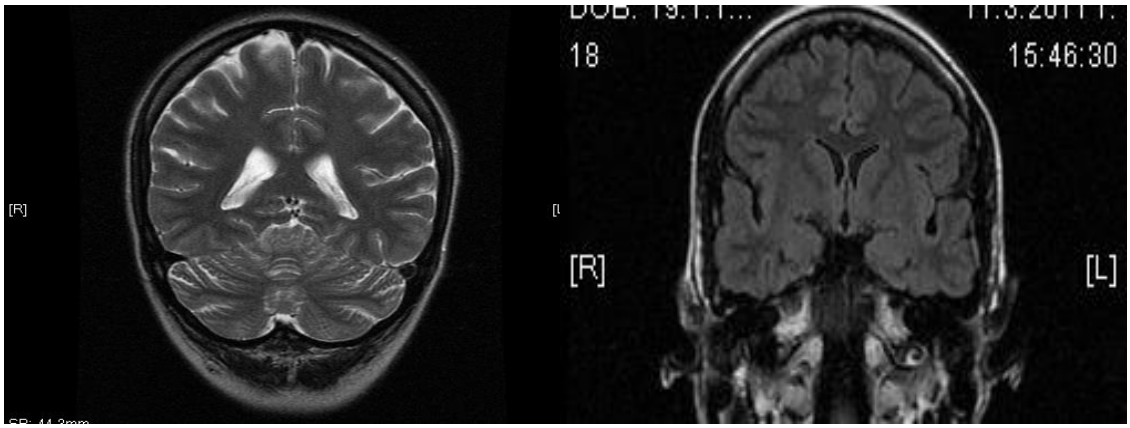
Фигури 19 а и б. Интериктален ЕЕГ запис на пациент IV-1 на 17 годишна възраст с данни за генерализирана пароксизмална активност от остри и високоамплитудни бавни вълни с фронтален максимум.



(а)

(б)

Фигура 20. МРТ на главен мозък на пациентка III-3 на 36 годишна възраст. **а)** Коронарен Т2 образ, демонстриращ малкомозъчна атрофия с дилатация на интерфолиарните цистерни двустранно симетрично; **б)** Коронарен FLAIR образ с данни за два малки хиперинтензни фокуса, съответно в дълбокото и подкоровото бяло мозъчно вещество в ляво фронтално.



а) б)

2.5.2 Генетични изследвания.

Унаследяването на синдрома в това семейство, предвид структурата на родословието изглежда автозомно-доминантно или митохондриално.

Осъществи се молекулярно-генетично изследване на целия митохондриален геном, като не бяха открити мутации в митохондриалната ДНК. Култивирани бяха кожни фибробласти, взети чрез кожна биопсия на пациентката III-3 за спектрофотометричен анализ на активността на отделните комплекси на митохондриалната дихателна верига, като беше установен недостиг на комплекс IV на дихателната верига. В ход е екзомно секвениране, с цел идентифициране на мутации в ядрени гени, кодиращи протеини на митохондриалната дихателна верига.

2.5.3 Обсъждане

Представена е българска фамилия с полиморфен епилептичен синдром с изразени интрафамилни вариации по отношение на възраст на начало на епилепсията (от 2 до 37 години), вид на епилептичните пристъпи (прости и комплексни парциални с или без вторична генерализация и миоклонии) и начин на протичане на заболяването (бенигнено или с чести и медикаментозно резистентни пристъпи) и структура на родословието предполагаща автозомно-доминантен или митохондриален тип на унаследяване. Освен наличието на епилептични пристъпи, които са първа фенотипна изява на заболяването в тази фамилия прави впечатление и съчетанието с други не-епилептични неврологични прояви: мигренозен тип главоболие (при 7/9 пациента); ЕМГ данни за миогенна увреда в изследвани проксимални и дистални мускули в горни и долни крайници при 4/9 пациента (и при един член на фамилията без данни за епилепсия); ЕНГ данни за аксонална полиневропатия със засягане на сетивните нервни влакна при двама пациенти; двустранно невросензорно намаление на слуха при една от пациентките, при която има и едностранна птоза на клепача; левостранна глухота при един пациент; леко когнитивно нарушение при една пациентка и задръжка в експресивната реч при един пациент. Други придружаващи заболявания, които бяха съобщени при членовете на фамилията са: захарен диабет (при двама пациенти), нарушен въглехидратен толеранс (една пациентка), автоимунен тиреоидит (при 4/9 индивида), рецидивиращо депресивно разстройство (2/9 пациента) и макулна дегенерация (2/9 пациента).

След детайлното фенотипно характеризиране на пациентите и въз основа на съчетанието на полиморфен епилептичен синдром с други неврологични и системни заболявания, като най-вероятна беше приета диагнозата митохондриална цитопатия. Изследван бе серумен лактат при четирима пациенти, като повишени стойности се регистрираха при трима от тях. МРТ изследването на главен мозък показа абнормности при двама от осем изследвани пациенти – малкомозъчна атрофия и единични хиперинтензни фокуси фронтално при едната пациентка и левкопатични фокуси фронтално и двустранно в базалните ганглии, мезиална глиоза в дясно темпорално и хипокампално и дурална артерио-венозна фистула в дясно темпорално при втората пациентка. Спектрофотометричният анализ на активността на отделните комплексии на митохондриалната дихателна верига в култивирани кожни фибробласти, взети след кожна биопсия на една от пациентките, установи намалена активност на комплекс IV на дихателната верига. При проведените молекулярно-генетични изследвания, не бяха идентифицирани мутации в гени кодиращи митохондриалната ДНК. В ход е екзомно секвениране, с цел идентифициране на мутации в ядрени гени, кодиращи протеини на митохондрилната дихателна верига.

Диагнозата при това семейство се основава на наличието на 1 главен (намалена активност на комплекс IV на митохондриалната верига) и 1 малък (клинични симптоми, съответстващи на митохондриално заболяване) диагностичен критерий, съгласно предложените от Bernier и съавт., (2002г.) диагностични критерии за митохондриално заболяване.

Фенотипът на разгледаната по-горе българска фамилия, не отговаря напълно на диагностичните критерии на нито една от описаните преди това в литературата синдромни митохондриални заболявания с чести епилептични пристъпи, каквито са синдрома на Alpers-Huttenlocher, ataxia-neuropathy spectrum, който обхваща синдрома на рецесивна митохондриална атаксия и синдрома на сензорна атаксия с невропатия, дизартрия и офталмопареза; синдромът на Leigh; митохондриална енцефалопатия, лактатна ацидоза и инсултоподобни епизоди; спиноцеребеларна атаксия и епилепсия и миоклонична епилепсия с парцаливи мускулни влакна [Castro-Gago и съавт. 1999; Tsao и съавт. 2001; Cohen и съавт. 2010]. На този етап фенотипът при българската фамилия може да бъде отнесен към несиндромните митохондриални заболявания, протичащи с епилепсия [Kang и съавт. 2007; Finsterer&Mahjoub, 2012]. Точното класифициране на синдрома е затруднено от невъзможността да бъде осъществена мускулна биопсия, както и все още незавършилите молекулярно-генетични изследвания.

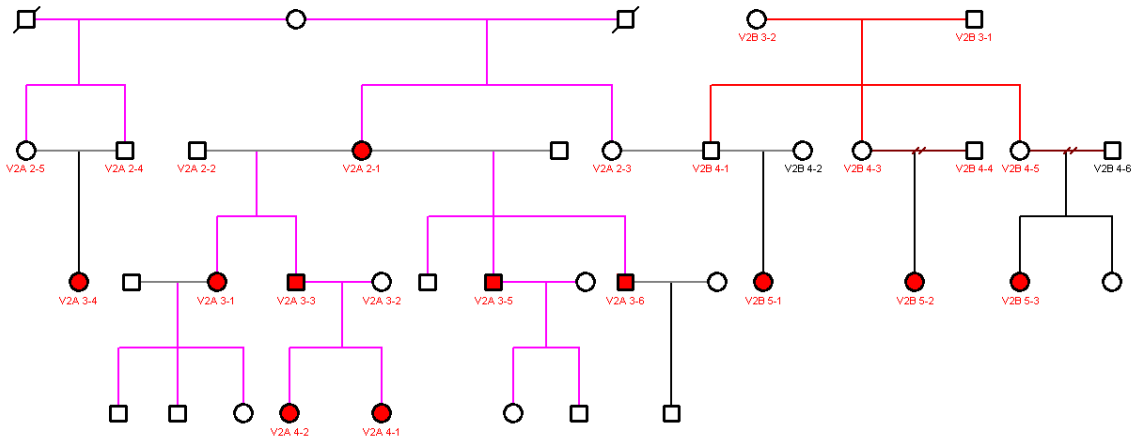
2.6 Клинико-генетично проучване на фамилия от град Видин.

Фамилията е от ромски произход и принадлежи към субгрупата на българските роми християни (дасикане рома), като всички членове живеят в град Видин. Структурата на семейството е сложна, като бяха идентифициарни няколко отделни под-фамили, свързани по между си с множество интерфамилни бракове. В настоящото изложение са разгледани две от тези под-фамилии Видин 2А и 2В, свързани по между си посредством брак между пациенти V2A 2-3 и V2B 4-1

(**фигура 21**). Идентифицирани бяха общо *единадесет индивида* с епилепсия – осем (трима мъже и четири жени) във Видин 2А и трима (три жени) във Видин 2В от три последователни поколения. Структурата на двете под-фамилии е представена на **фигура 21.**

Фигура 21. Структура на семейство от град Видин 2А и 2В. Засегнатите членове са представени с червени символи.

Видин 2А **Видин 2В**



2.6.1 Фенотипни характеристики.

Събраната до момента клинична информация за засегнатите членове на двете семейства е обобщена в **таблица 5**.
На **фигури 22, 23 и 24** са представени ЕЕГ записи съответно на пациенти V2A 4-1, V2A 4-2 и V2B 5-2.

2.6.2 *Генетични изследвания*.

При фамилията от град Видин (2А и 2В) е извършен параметричен анализ за скаченост при автозомно-доминантен и автозомно рецесивен модел на унаследяване. Нито един от установените локуси не достига очаквания максимум в това семейство.

Таблица 5. Данни от проведените клинични и инструментални изследвания при пациентите от фамилията от град Видин.

Пациент	Роден	Пол	ФГ	Афебрилни пристъпи начало/край	Вид на пристъпите	Описание	Честота	ЕЕГ	МРТ	Терапия	Фенотип
Видин 2А											
V2A 3-4	1990	Ж	-	6г./ продължават	КПП, ВГТКП	Епигастрални симптоми (дискомфорт в стомаха, отиващ към гърлото), шум в ушите, изтръпване на десните крйници, феномени на déjà-vu, нарушено съзнание, безцелно движение, дърпане на дрехите или косата, понякога с падане на земята, потрепване на крайниците, инконтиненция на урина	КПП: Първоначално 2-3/седм.; сега 1/м. ВГТКП: Първоначално 1-2/м; сега 1/ 2-3м.	2005 - фокус в Л Т-О с генерализация при ХВ ; 2007 – фокус в Д Ф-Т с генерализация при ХВ. 2008: нормална; 2008 – умерено изразени дифузни бавновълнови промени с Ф-максимум	2008 – в норма	VPA, CBZ, LTG	КПП, ВГТКП
V2A 2-1	1963	Ж	-	7г./ продължават	КПП, ВГТКП	Главоболие, напрежение, след това става неконтактна, пипа си дрехите, говори несвързано, понякога пада на земята, има конвулсии на крайниците, нконтиненция на урина	КПП: Първоначално 1-2/м; Сега 1/3-4м. ВГТКП: Първоначално 1/м. Сега: 2-3/г	2008-пароксизмална активност Ф-С двустранно; 2008– суспектен фокус от остри и бавни вълни Д С-Т с контралатерална ирадиация; 2009 – фокус от бавни вълни и пароксизмална активност Л Ф-Т с ипсилатерална ирадиация при ХВ	2008 – в норма	CBZ	КПП, ВГТКП
V2A 3-1	1979	Ж	-	13г./ спрели на 25г. възраст	КПП, ВГТКП	Внезапно започва да говори несвързано, изглежда изплашена и объркана, понякога пада на земята, с	КПП, ВГТКП Първоначално 1/м; спрели на 25г. възраст	2008 и 2009 - норма	2009 – в норма	CBZ	КПП, ВГТКП

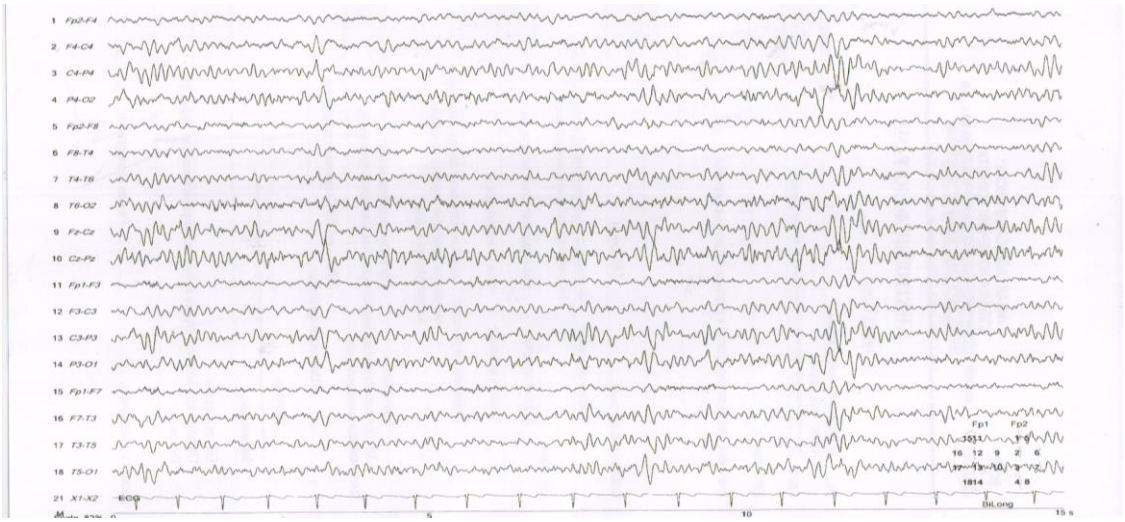
						посиняване около устата, потрепване на крайниците, инконтиненция на урина					
V2A 3-3	1980	М	-	3г./ спрели на 20г. възраст	КПП, ВГТКП	Дискомфорт в стомаха, гадене, несвързана реч, изглежда объркан, движи се безцелно из стаята, понякога пада на земята, има потрепване на крайниците, инконтиненция на урина	КПП, ВГТКП Първоначално 1-2/м; спрели на 20г. възраст	2012-норма	2008-норма	-	КПП, ВГТКП
V2A 3-5	1985	М	-	1г.7м/ спрели на 23г. възраст	КПП, ВГТКП	Замайване, притъмняване пред очите, става неконтактен, движи се безцелно из стаята, премества предмети, понякога пада на земята, има потрепване на крайниците, инконтиненция на урина	КПП, Първоначално 3-4/седм;след това 1-2/м; ВГТКП 1/м; И двата вида пристъпи спрели около 23г. възраст	2008 - норма	-	-	КПП, ВГТКП
V2A 3-6	1987	М	-	1г./ спрели на 20 г. възраст	КПП, ВГТКП	Съобщава за главоболие, изглежда изплашен, неконтактен, понякога пада на земята, има потрепване на крайниците, инконтиненция на урина	КПП, ВГТКП Първоначално 2-3/седм;след това 1/м; спрели на 23г. възраст	2008-норма	-	-	КПП, ВГТКП
V2A 4-1	1998	Ж	-	3г./ продължават	КПП, ВГТКП	Втренчва се, примляскva, пипа си дрехите, не е контактна, понякога пада на земята, има потрепване на крайниците,инконтиненция на урина	Първоначално КПП –3-4/м; ВГТКП 1-2/м; Сега 1-2/г.	2006 – нормална; 2008-нормална; 2012 - Пароксизмална активност от остри вълни Д>Л при ХВ.	2008-норма	VPA + LTG	КПП, ВГТКП
V2A 4-2	2001	Ж	-	1.5г./ продължават	КПП, ВГТКП	Изглежда уплашена, объркана, пипа си дрехите и	Първоначално КПП–2-3/м;	2008- пароксизмална активност от остри,	2008-норма	OXC VPA	КПП, ВГТКП

						косата, не е реагира при повикване, понякога пада на земята, има потрепване на крайниците, инконтиненция на урина	ВГТКП-1-2/м; Сега: ВГТКП 1/1г.; КПП – 4-5/г.	високоамплитудни тета вълни П-Т Л>Д; 2012-норма; 2012-слабо проявен фокус от остри вълни в Д-С			
Видин 2В											
V2B 5-1	1990	Ж	-	1м./ продължават	КПП, ВГТКП	Гадене, гореща вълна тръгваща от стомаха нагоре към главата, изглежда объркана, движи се безцелно, пипа си дрехите и косата, повдига си дясната ръка нагоре, не отговаря на повикване, понякога пада на земята, има потрепване на крайниците, прехапване на езика, инконтиненция на урина.	ВГТКП – първоначално 4-5/м, от 7 до 10 г. възраст не е имала, след това 3-4 годишо; КПП - започнали от 3-4 г. възраст – 1/м;	2005 – норма; 2006г – фокална проява на комплекси острия-бавна вълна и спайкове бавна вълна широко в Д Ф-Т-П с тенденция за генерализация; 2008 - норма	2008 - норма	РВ, VPA, CZP, LTG	КПП, ВГТКП
V2B 5-2	1991	Ж	Да; един на11м	2г./ продължават	КПП, ВГТКП	Гадене, гореща вълна тръгваща от стомаха нагоре към главата, застива, примляква, повдига дясната ръка, изглежда объркана, понякога пада на земята, има потрепване на крайниците, прехапване на езика, пяна на устата	ВГТКП – Първоначално 2-3/седм.; сега 1/ 2-3 месеца; КПП – 1/ седмично	2004 – дифузни промени от острия и тета вълни двустранно Ф; 2006 – фокус в Л-Т с генерализация при ХВ; 2008 –фокус от остри и бавни вълни Л Ф-Т с контаралатерална ирадиация. Дискретен фокус – тета и единични остри вълни в Д-Т.	2008 - норма	РВ, VPA, CZP, LTG	ФГ, КПП, ВГТКП
V2B 5-3	1990	Ж	Да; на	2г./ спрели на	ВГТКП	Гадене, прилошаване, застива,	ВГТКП -	2008 – единични	-	Не	ФГ,

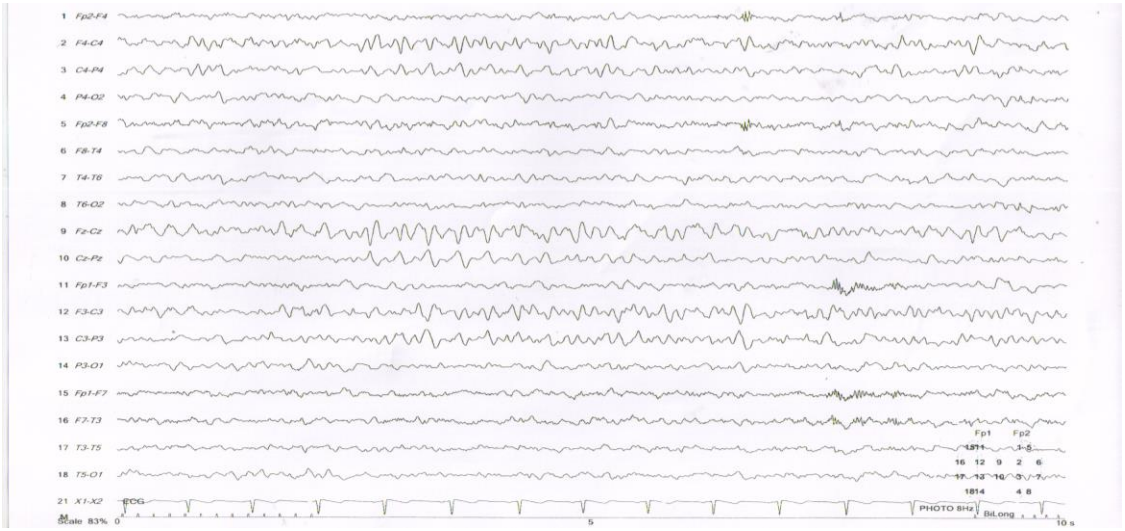
			2г.	14г. възраст		не реагира при повикване, след това пада на земята, има потрепване на крайниците, прехапване на езика, пяна на устата	Първоначално 2-3/м, след което се разредили спонтанно и спрели около 14 год. възраст	остри вълни Ф-С при ХВ			ВГТКП

М-мъж; Ж-жена; М-месец; Г-година; Седм-седмично; Д – дясно; Л- ляво; Ф – фронтално; Т – темпорално; О – окципитално; Р- париетално; С – централно; ХВ – хипервентилация; OXC- Oxcarbamazepine; PB – Phenobarbital; CBZ – Carbamazepine; VPA – valproic acid; LTG – Lamotrigine; CZP - Clonazepa

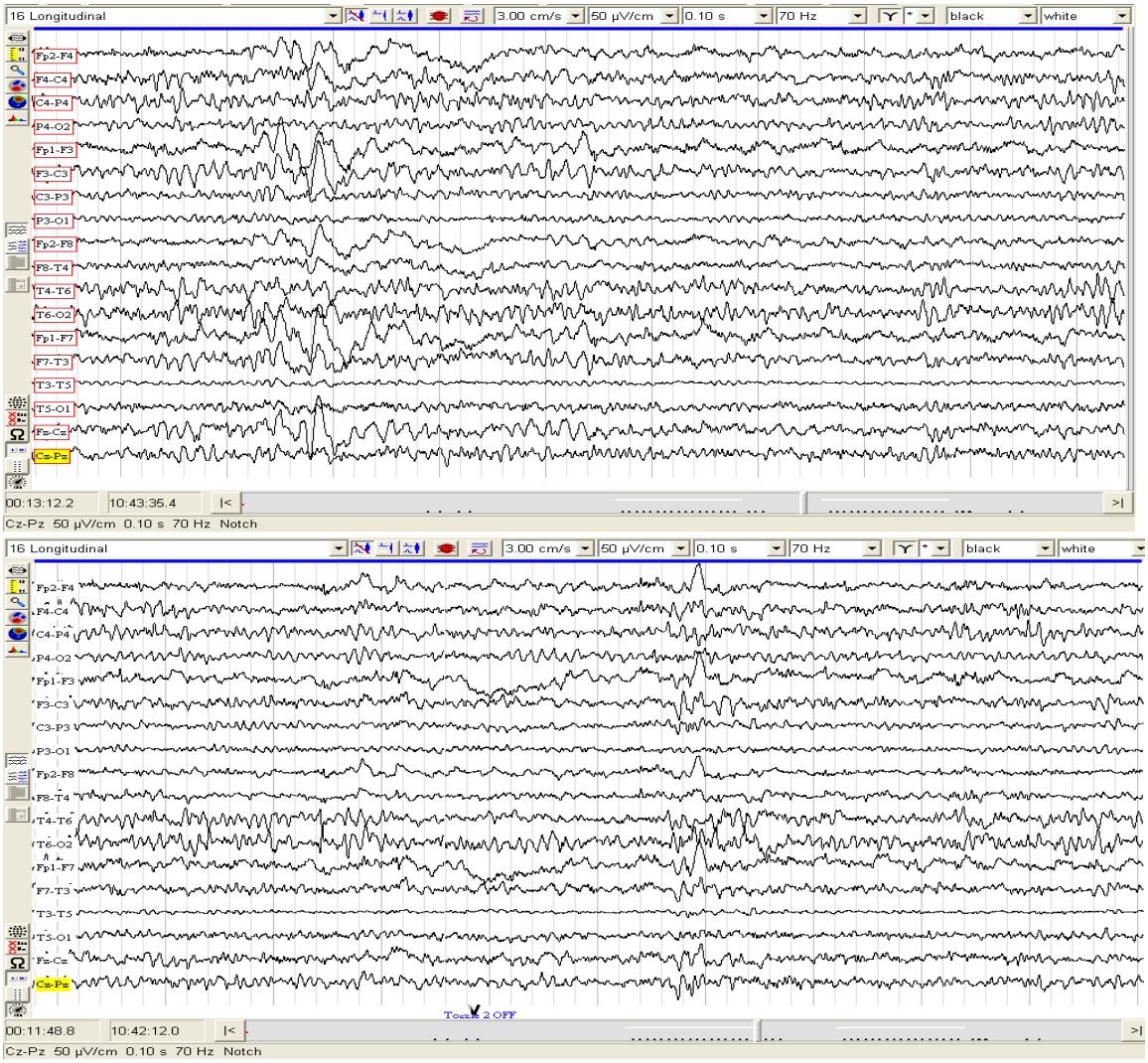
Фигура 22. Интериктален ЕЕГ запис на V2A 4-1 на 14 годишна възраст с данни за пароксизмална активност от остри вълни с превес в дясно при ХВ.



Фигура 23. Интериктален ЕЕГ запис на пациент V2A 4-2 на 11 годишна възраст с данни за фокус от остри вълни в дясно централно.



Фигура 24. Интериктален ЕЕГ запис на пациентката V2B 5-2 на 17 годишна възраст с данни за фокус от остри и неравномерни бавни вълни в ляво фронто-темпорално. Пароксизмална активност от остри вълни фронто-централно и предно темпорално с превес в ляво.



2.6.3 Обсъждане

Първото семейство 2А се характеризира с епилептичен синдром с вероятно автозомно-доминантно унаследяване и относително хомогенен фенотип с комплексни парциални пристъпи и честа вторична генерализация. Съществуват известни интрафамилни вариации по отношение на началото на заболяването и неговия ход при отделните индивиди, но като цяло началото е в първото десетилетие на живота и епилепсията е с относително бенигнено протичане, като се наблюдава спонтанно затихване на пристъпите при четирима от пациентите, а при останалите четирима е постигнат добър контрол на пристъпите при монотерапия с антиепилептични медикаменти. При фамилията липсват анамнестични данни за фебрилни гърчове. Комплексните парциални пристъпи най-често започват с епигастрален дискомфорт, главоболие или замайване и протичат с несвързан говор, стереотипии с ръцете и безцелни движения. Феномени на déjà vu се описват при един пациент. Характерна е постпристъпната объркаността и сънливост. Пристъпите са дневни и често се провокират от стресови ситуации. Вторичната генерализация също е честа и се съобщава при всички пациенти. Интериктални ЕЕГ абнормности са установени основно в темпоралните

области с разпространение и в съседни области (окципитална, париетална). На проведените МРТ изследвания на главен мозък не се установяват данни за хипокампална склероза.

Описаните епилептични пристъпи и ЕЕГ промени в това семейство предполагат в най-голяма степен произход от мезиалния темпорален дял.

Семейство 2В се представя с епилептичен синдром с начало в първото десетилетие на живота, чести комплексни парциални и вторично-генерализирани пристъпи и интрафамилна вариабилност по отношение начина на протичане на заболяването. Структурата на родословието предполага автозомно-рецесивно унаследяване. За разлика от фамилия 2А, тук и трите пациентки с епилепсия имат лека степен на умствена изостаналост. Фебрилни гърчове с начало в ранна детска възраст се съобщават при две от пациентките. Комплексните парциални пристъпи най-често започват с епигастрален дискомфорт и неясно чувство за прилошаване и протичат със стереотипии с ръцете и безцелни движения. Не се описват феномени на déjà vu или други психични симптоми. Характерна е постпристъпната объркаост и сънливост. Епизод на епилептичен статус е регистриран при една от пациентките. Пристъпите са дневни и често се провокират от стресови ситуации и безсъние. Интериктални ЕЕГ абнормности по подобие на фамилия 2А, са установени основно в темпоралните области с разпространение и в съседни области (фронтална, париетална). На проведените МРТ изследвания на главен мозък не са установени данни за хипокампална склероза. Заболяването има доброкачествен ход на протичане при една от пациентките, като е налице спонтанно разреждане и спиране на пристъпите през второто десетилетие на живота. При останалите две пациентки пристъпите продължават, като трябва да се има предвид несистемно провежданото лечение с антиепилептични медикаменти и добрия контрол върху пристъпите в случаите, когато лекарствата са приемани редовно.

Описаните епилептични пристъпи и ЕЕГ промени в това подсемейство, по подобие на 2А също предполагат в най-голяма степен произход от мезиалния темпорален дял. Фенотипът на семейство 2В обаче, в най-голяма степен наподобява на описаното от Baulac и съавт. (2001) френско семейство с девет засегнати членове с мезиална темпорално-дялова епилепсия асоциирана с фебрилни гърчове, без хипокампална склероза. Разликата е в по-ранната възраст на начало на афебрилните пристъпи при фамилията от град Видин 2В (от 1 месец до 2 години) в сравнение с френската фамилия (от 4 до 13 годишна възраст).

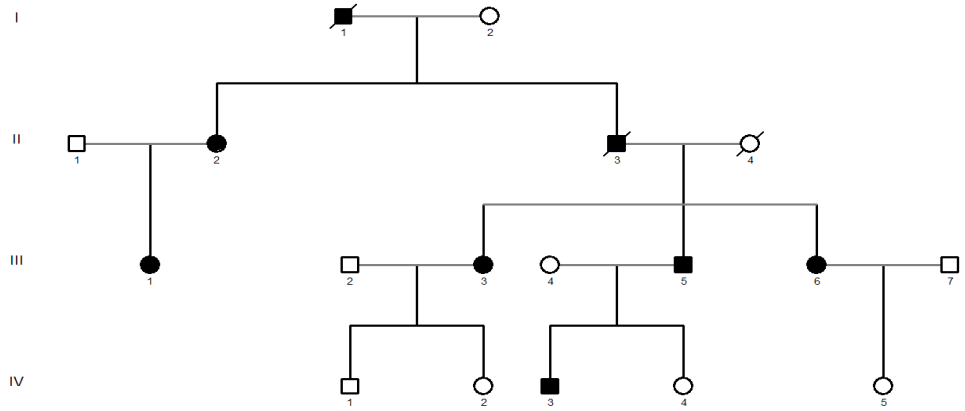
На този етап при проведения анализ за скаченост в семейството от град Видин (2А и 2В) не беше получен сигнификантен LOD score за нито един от досега съобщените в литературата локуси за мезиална темпорално-дялова епилепсия, въпреки описаните по-горе сходства във фенотипа, нито беше идентифициран нов локус. Това не е в противоречие с диагнозата, защото от една страна скаченост с определени локуси е описана само в единични семейства [Baulac и съавт. 2001; Hedera и съавт. 2007; Angelicheva и съавт. 2009; Azmanov и съавт. 2011], а от друга се подкрепя тезата, че ФМТЕ се унаследяват предимно полигенно, по

подобие на идиопатичните генерализирани епилепсии, а моногенното унаследяване е по-скоро изключение отколкото правило [Crompton и съавт. 2010].

2.7 Клинико-генетично проучване на фамилия от село Мадара.

Фамилията е от български произход, като основна част от членовете на семейството живее в село Мадара, а останалите са в съседни села на област Шумен. Изследвани са *шест болни* с епилепсия (четири жени и двама мъже) от три последователни поколения (**Фигура 25**).

Фигура 25. Родословие на фамилия от село Мадара. Засегнатите членове на семейството са представени с черни символи.



2.7.1 Описание на фенотипа.

Клиничната информация получена при изследването на шестимата болни членове на семейството е обобщена в **таблица 6**.

Пробандът IV-3 е момче на 8 години, с нормално моторно и забавено речево развитие. На 6 годишна възраст по време на сън получил генерализиран-тонично клоничен припадък. Веднага след това е започната терапия с валпроат и от тогава не е имал повече пристъпи. При проведените интериктални ЕЕГ записи по време на будност и сън на 6 и 7 годишна възраст, са регистрирани генерализирани пароксизми от комплекси острие-бавна вълна, както и асинхронни фокуси в ляво и дясно темпорално със съответна ипсилатерална латерализация (**Фигура 26**). Невропсихологичното изследване на 7 годишна възраст е с данни за алалия и изоставане в невропсихическото развитие в рамките на умерена умствена изостаналост. МРТ на главен мозък е осъществен на 7 годишна възраст и също в норма.

При останалите членове на семейството, епилептичният синдром е с начало около 4-6 годишна възраст (4/5) и на 14 годишна възраст при един от болните. Описани са само вторично генерализирани тонично-клонични пристъпи (5/5 болни) в будност и по време на сън, които спират спонтанно около пубертета.

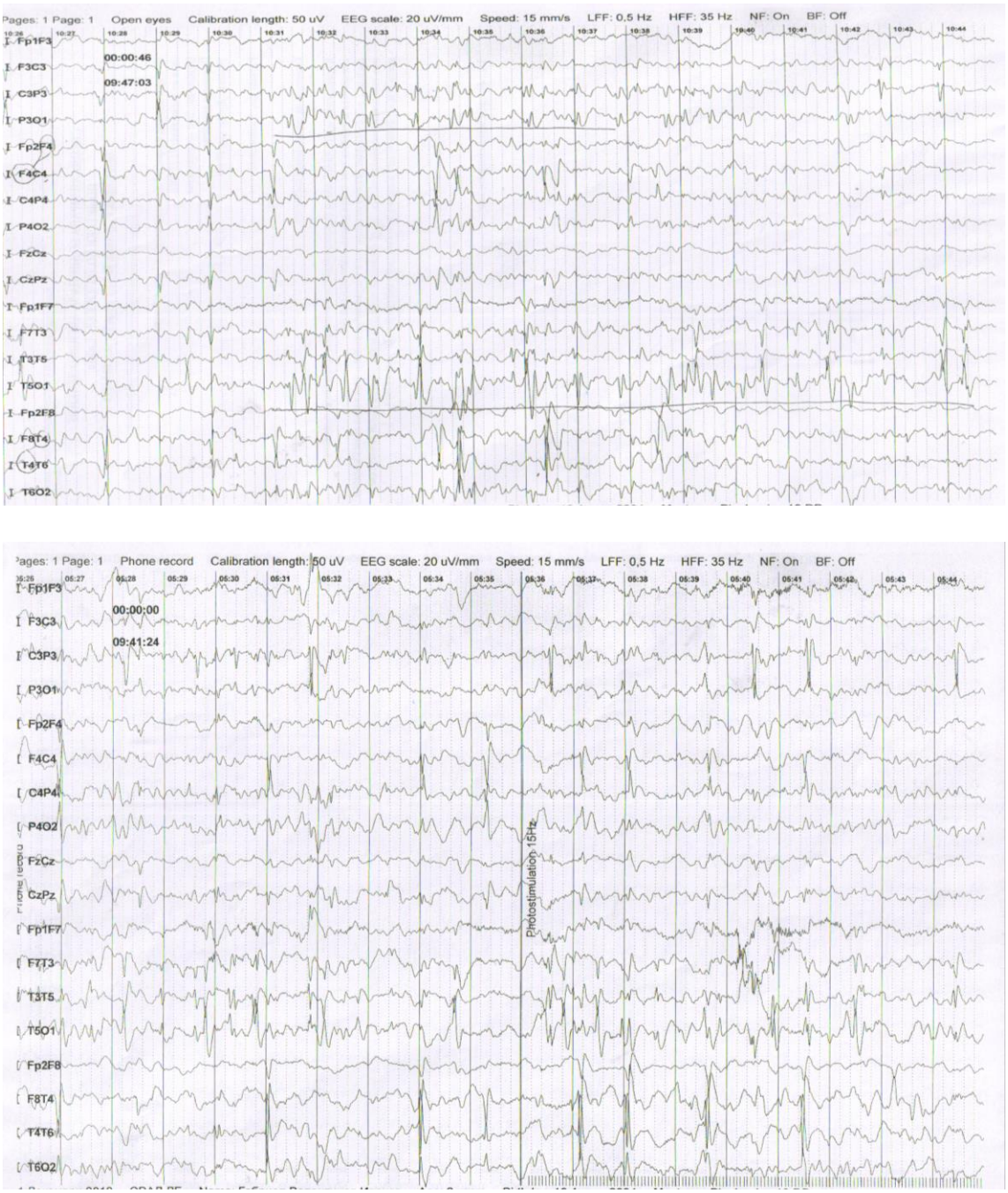
Таблица 6. Данни от проведените клинични и инструментални изследвания при пациентите от фамилията от село Мадара.

Пациент	**Роден**	**ФГ**	**Афебрилни пристъпи начало/ край**	**Видове епилептични пристъпи**	**Семиология на епилептичните пристъпи**	**Честота**	**ЕЕГ**	**МРТ, Невропсихологично изследване**	**Терапия**
IV-3	2004	-	6г./ в момента без пристъпи	ВГТКП ?	По време на сън - отворени, отклонени нагоре очи, нарушено съзнание, пяна от устата, потрепване на четирите крайници и изпускане по малка нужда. Продължителност 1 мин	Един единствен	2010 (сън) -генерализирани пароксизми от комплекси острие – бавна вълна с продължителност 1-2 сек. по-кратки комплекси от остри и последващи бавни вълни; 2010 (будност): Добре очертано огнище от единични и в серии остри вълни в лява тилна област в посока към съседна темпорална област. Друго огнище от единични остри вълни се очертава в Д-Т в посока към съседната централна област. 2011 (сън)- фокус от двуфазни остри вълни в Д Т. Бавновълнова абнормност Л Р.	МРТ 2(011г) – в норма Невропсихологично изследване 2011- алалия, умерена умствена изостаналост IQ=50.	VPA
III-5	1974	-	4-5г./12-13г.	ВГТКП по време на сън и будност	Неприятно чувство в стомаха, след това загуба на съзнание, потрепване на крайниците	?	2011 и 2012г – в норма	МРТ (2011г) – в норма Невропсихологично изследване (2011)- долно гранични стойности на когнитивно функциониране	РВ
III-6	1977	-	4-5г./12-13г.	ВГТКП по време на сън	Понякога казвала, че й е лошо, след това	?	2011 и 2012 - нормална	-	РВ

				и в будност	губела съзнание, имала потрепвания на крайниците и извиване на главата встрани				
III-3	1971	-	5-6г./11-12г	ВГТКП	Понякога казвала, че й е лошо, след това губела съзнание, имала разхвърляни движения на крайниците и главата	1-2 седмично	2012 - нормална	-	РВ
II-2	1949	-	14г – 18г.	ВГТКП ?	Прилошаване, притъмняване, загуба на съзнание	?	2012 - нормална	-	Не
III-1	1978	.	6г – 14-15г.	ВГТКП	Прилошаване, загуба на съзнание, треперене на крайниците, изпускане по малка нужда.	1/ 2-3 м.	-	-	РВ

м-месец; г-година; VPA – валпроева киселина; ? – няма информация; РВ - фенобарбитал

Фигура 26. Интериктален ЕЕГ запис на пробанда IV-3 на 6 годишна възраст с данни за асинхронни фокуси в ляво и дясно темпорално със съответна ипсилатерална латерализация.



2.7.2 Генетични изследвания.

В ход са анализ за скаченост и секвенционен анализ на известните до момента в литературата гени за фамилни фокални епилепсии (фамилни темпорално-дялови епилепсии, автозомно-доминантна роландова епилепсия с речева диспраксия, ФПЕПО), които се провеждат в Лабораторията по неврогенетика, Университет-Антверпен, Белгия. Към момента на подготвяне на дисертацията, не е получен резултат от генетичните изследвания.

2.7.3 Обсъждане.

Тази българска фамилия се представя с наследствена фокална епилепсия, с автозомно-доминантно унаследяване и непълна пенетранност, начало в първото десетилетие на живота и сравнително хомогенен фенотип с вторично-генерализирани тонично-клонични пристъпи. Аурата на пристъпите се описва като неясно усещане за „прилошаване" или дискомфорт в епигастриума, което предполага произход от темпоралния мозъчен дял. Епилептичните пристъпи са дневни и нощни, но липсва подробно описание на нощните пристъпи, което затруднява класифицирането им. Интерикталните ЕЕГ изследвания са абнормни само при пробанда, с данни за фокус от комплекси острие/бавна вълна в темпоралните отвеждания. При останалите четирима пациенти, ЕЕГ записите са нормални, като трябва да се има предвид, че те са направени средно около 10 години след последните епилептични пристъпи, а не са открити предишни ЕЕГ изследвания по време на активното заболяване. Невропсихологичното изследване е абнормно при пробанда IV-I, с данни за умерена степен на умствено изоставане. Други трима индивиди от семейството са посещавали помощно училище, като по анамнестични данни причините за това са по-скоро социални. Проведеното невропсихологично изследване при един тях (бащата на пробанда) е с данни за нормален интелект, макар и на долна граница на нормата. При МРТ изследването на главен мозък, осъществено при пробанда и неговия баща, не бяха установени структурни абнормности.

Епилептичният синдром има бенигнен ход на протичане, като пристъпите са затихнали спонтанно около пубертета при 5/6 пациента. При пробанда е регистриран само един епилептичен пристъп, като след започване на монотерапия с валпроат, не са отчетени повече пристъпи (проследяван е за период от около 2 години).

Фенотипът при това семейство не прилича на нито един от описаните до момента форми на наследствена фокална епилепсия [Michelucci и съавт. 2012]. В диференциално диагностичен план са обсъждани: 1. Фамилна мезиална темпорално-дялова епилепсия, въз основа на анамнестичните данни за епигастрална аура и неясно чувство за „прилошаване", предполагащи произход от темпоралния мозъчен дял, доброкачествения ход на протичане и нормалните резултати от проведените МРТ изследвания. 2. Автозомно-доминантна роландова епилепсия с речева диспраксия, предвид наличието на нощни ВГТКП, ЕЕГ данните за епилептиформена активност в центротемпоралните отвеждания при пробанда и наличието на интелектуален дефицит.

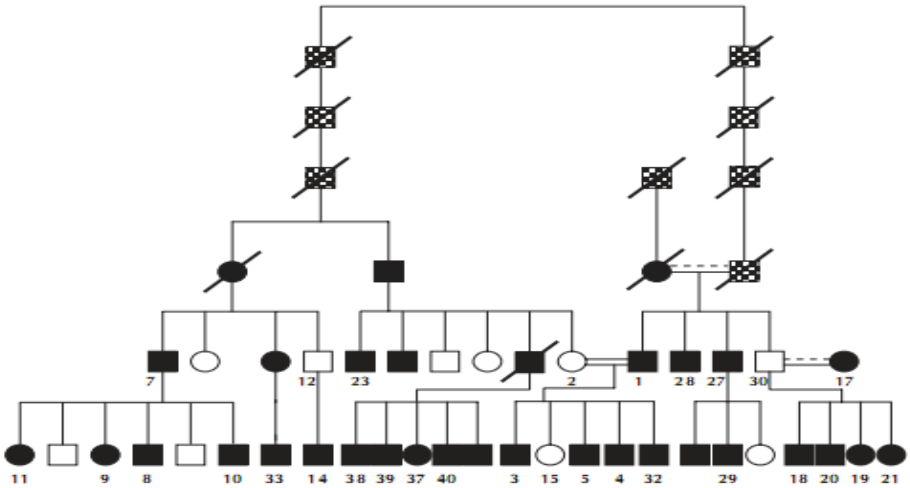
Липсата на достатъчно подробна анамнеза за пристъпите обаче (особено нощните), както и на иктални ЕЕГ записи, прави трудно поставянето на по-точна синдромна диагноза в това семейство.

2.8 Клинико-генетично проучване на фамилия от област Пловдив

Семейството е от ромски произход и принадлежи към субгрупата на тракийските калайджии. Членовете му живеят в съседни села на област Пловдив. Анамнестични данни за епилепсия има при тридесет и трима пациенти от три

последователни поколения, но фенотипизирани са *седемнадесет* от тях (12 мъже и 5 жени) и те са разгледани в изложението по-долу. Структурата на родословието е представена на **фигура 27**.

Фигура 27. Родословие на семейство от област Пловдив. Членовете с епилепсия са представени с черни символи, а тези с неизвестен фенотип – с частично запълнени символи. Двойните линии означават близкородствен брак, а пунктираната линия – възможен близкородствен брак.



2.8.1 Описание на фенотипа

Събраната до момента клинична информация за седемнадесетте засегнати членове на семейството е обобщена в **таблица 7.**

Бременността, раждането и постнаталният период са били нормални при всички засегнати индивиди на фамилията от област Пловдив. По анамнестични данни, пациент Pl 1 е преживял черепно-мозъчна травма с мозъчно сътресение на 40 годишна възраст. При Pl 37 е налице лека степен на умствено изоставане. Останалите пациенти са с нормален интелект. Неврологичният статус е нормален при всички засегнати индивиди. Фебрилни гърчове с начало средно около 2 месечна възраст и край на 4 години са съобщени при 8/17, а при 3/17 индивида те продължават след 6 годишна възраст.

Афебрилните епилептични пристъпи са с начало в ранна детска възраст (от 1 месец до 4 години), съобщават се при всички 17 засегнати членове на фамилията и са генерализирани тонично-клонични. В постикталния период е наблюдавана изразена сънливост и отпадналост. Нито един от засегнатите индивиди от фамилията не съобщава за аура. Честотата на генерализираните тонично-клонични пристъпи варира при отделните пациенти от 2-3/ седмично до 3-4/ годишно и те са дневни и нощни.

Интериктални ЕЕГ записи бяха проведени при всички 17 пациента. Те са нормални при четиринадесет от тях, с фотопароксизмален отговор при двама (Pl 19 и Pl 32) и със забавена основна активност при един (Pl 37) (**фигура 28**).

МРТ изследване на главен мозък беше осъществено при трима пациенти (Pl 1, Pl3 и Pl 21), като не бяха установени структурни абнормности.

Таблица 7. Данни от проведените клинични и инструментални изследвания при пациентите от фамилията от област Пловдив.

№	Роден	Пол	ФГ начало/ край	Афебрилни пристъпи начало/ край	Видове епилептични пристъпи	Честота	ЕЕГ	МРТ	Терапия	Ко-морбидност	Фенотип
PL 1	1959	М	2м./4г.	1-2м. /продължават	ГТКП	Преди – 2-3 седмично, сега 1-2/3 м.	2008: нормална	2008: нормален	PB, CBZ	ЧМТ на 40г. възраст	ФГ, ГТКП
PL 11	1989	Ж	Не	Ранно детство/ продължават	ГТКП	1 /месечно	2008: нормална	-	VPA	Не	ГТКП
PL 19	1989	Ж	2г/8г.	2г./ продължават	ГТКП	Първоначално 1/месечно, сега 2-3/г.	2008: фотопароксизмален отговор	-	PB, сега не се лекува	Не	ФГ+, ГТКП
PL 3	1984	М	7м./ 3г.	1г./ продължават	ГТКП	1/ месечно	2008: нормална	2008: нормален	PB, CBZ	Не	ФГ, ГТКП
PL 32	1993	М	1г./4г.	2.5г./ продължават	ГТКП	От 1/ м. до 1/ 2-3м.	2008: фотопароксизмален отговор	-	CBZ	Астма	ФГ, ГТКП
PL 37	1979	Ж	Няма данни	1г./ продължават	ГТКП	1/ 2-3м.	2008: леко забавена основна активност	-	CBZ	Леко умствено изоставане	ГТКП
PL 9	1991	Ж	4г./7г.	4г./ продължават	ГТКП	1-2/ месечно	2008: нормална	-	CBZ	Не	ФГ+, ГТКП
PL 14	1992	М	1г.7м/ 4г.	2г/ продължават	ГТКП	3-4/ годишно	2008: нормална	-	Не	Не	ФГ, ГТКП

PL 27	1964	М	Един на 2г.	3г./ продължават	ГТКП	Първоначално 1/ месечно, сега 1-2 годишно	2008: нормална	-	PB	Не	ФГ, ГТКП
PL 4	1991	М	Един на 8м.	2г./ продължават	ГТКП	Първоначално 1-2/м.; след това-1/ 2-3м.	2008: нормална	-	PB, CBZ	Не	ФГ, ГТКП
PL 20	1990	М	2г./ 8г.	3г./ продължават	ГТКП	Първоначално 1/м; след това 3-4/г.	2008: нормална	-	CBZ	Не	ФГ+, ГТКП
PL 29	1988	М	Не	3г./ продължават	ГТКП	1/ 2-3 месеца	2008: нормална	-	Не	Не	ГТКП
PL 21	1992	Ж	3г./4г.	1г./ продължават	ГТКП	1/ месечно	2008: нормална	2008: нормален	CBZ	Не	ФГ, ГТКП
PL 10	1992	М	Не	1.7г/ продължават	ГТКП	1/ 2-3 месеца	2008: нормална	-	CBZ	Не	ГТКП
PL 8	1984	М	Не	2г./ продължават	ГТКП	1/ месечно	2008: нормална	-	CBZ	Не	ГТКП
PL 18	2000	М	Два на 2г.	4г./ продължават	ГТКП	1/ 2-3 месеца	2008: нормална	-	VPA	Не	ФГ, ГТКП
PL 7	1959	М	Не	3г./ продължават	ГТКП	5-6/ годишно	2008: нормална	-	Не	Не	ГТКП

№ на пациента в родословието; М-мъж; Ж-жена; Г-година; м. месец; ФГ – фебрилни гърчове; ФГ+ - фебрилни гърчове плюс; VPA- валпроева киселина; CBZ – Carbamazepine; PB - Phenobarbital

Фигура 28. Интерикатален ЕЕГ запис на пациент Pl 19 на 14 годишна възраст с данни за фотопароксизмален отговор при интермитентна фотостимулация с честота 12 херца.

2.8.2. Генетични изследвания.

При извършения анализ за скаченост при (автозомно-доминантен или автозомно-рецесивен) типа на унаследяване, нито един не локус не показа значима скаченост (LOD scores > 2).

2.8.3. Обсъждане

Представена е голяма ромска фамилия с тридесет и трима членове с епилепсия, от които фенотипизирани са седемнадесет. Структурата на семейството предполага автозомно-доминантно унаследяване с непълна пенетранност. Епилептичният синдром е с начало в ранна детска възраст и се характеризира с генерализирани тонично-клонични пристъпи. Фебрилни гърчове в детството са установени анамнестично при 11 от 17 пациенти, което ги прави отличителна черта на фенотипа При трима от пациентите фебрилните гърчове са продължили над 6 годишна възраст и това ни дава основание да ги класифицираме като фербилни гърчове плюс [Scheffer и съавт.1997; Singh и съавт. 1999]. Парциални или други видове генерализирани епилептични пристъпи (миоклонични, атонични или абсанси) не са описани в тази фамилия. Лека степен на умствена изостаналост от раждането е съобщавена само при един пациент. Интерикталните ЕЕГ изследвания са в норма при четиринадесет изследвани пациенти, с дифузни промени при един и с данни за фоточувствителност при двама. Магнитнорезонансни изследвания на главен мозък бяха проведени при

трима пациенти и те са нормални. Епилептичните пристъпи са сравнително чести в началото на заболяването, като впоследствие се наблюдава тенденция за спонтанно разреждане. Към момента на провеждане на изследването с активна епилепсия са всички седемнадесет индивида, но трябва да се има в предвид, че нито един от тях не е провеждал продължително антиепилептично лечение в достатъчни дози и с подходящ за вида на пристъпите антиепилептичен медикамент.

Епилептичният синдром при това семейство отговаря в най-голяма степен на синдрома на генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс, тъй като е налице съчетание на фебрилни гърчове, фебрилни гърчове плюс и генерализирани тонично-клонични пристъпи [Scheffer и съавт.,1997; Mrabet и съавт., 2007; Baulac и съавт., 2008; Poduri и съавт., 2009]. За разлика от описаните в литературата фамилии с ГЕФГ+, при това семейство са налице само един вид генерализирани пристъпи - ГТКП. Възможно е обаче, абсанси или миоклонии да са съществували, но те да са останали неразпознати от членовете на семейството. Липсва и предшестваща медицинска документация, която да подпомогне характеризирането на фенотипа.

Проведените молекулярно-генетични изследвания в това семейство, вкл. и за трите локуса съдържащи ГЕФГ+ гени (SCN1A на хромозома 2q24, SCN1B на хромозома 19q13 и GABRG2 на хромозома 5q34), не дадоха положителен LOD score. Въпреки че тези гени не бяха изключени чрез директно секвениране, данните от анализа за скаченост не подкрепят тяхното засягане.

3. ИЗВОДИ

1. Установи се значителна клинична хетерогенност на фамилните форми на епилепсия при ромите, с изразени интра и интер-фамилни вариации в протичането на заболяването. Наследствени форми на епилепсия бяха идентифицирани сред почти всички ромски групи: калдераши, копанари, тракийски калайджии, хорохане рома, дасикане рома, като получените до сега данни показват, че сред тях преобладават фокалните пред генерализираните епилепсии.
2. Фамилните фокални епилептични синдроми най-често са с доброкачествен ход на протичане, като при повечето от изследваните семейства се наблюдава спонтанно разреждане и спиране на пристъпите с възрастта. При фамилиите с ГЕФГ+ прогнозата зависи от фенотипния спектър на болестта, като тя е по-неблагоприятна в случаите със синдром на Dravet.
3. В преобладаваща част от случаите, епилептичните пристъпи при наследствените форми на епилепсия се повлияват добре от терапия с подходящ за вида им антиепилептичен медикамент, като това зависи и от епилептичния синдром. Така терапевтична резистентност беше наблюдавана при 1 пациент със синдром на Dravet от фамилията от село Майско и при две пациентки от фамилията от град София, при които фокалната епилепсия е в рамките на митохондриална цитопатия. При останалите пациенти, след оптимизиране на терапията и при редовен прием на медикаментите беше постигнат добър контрол върху епилептичните пристъпи.
4. Не беше установен ефект на родоначалника по отношение на наследствените форми на епилепсия при ромите, какъвто съществува при други наследствени заболявания сред тях.
5. Потвърди се първоначалната хипотеза за генетична хетерогенност на фамилните епилептични синдроми, дори в случаите със сходства във фенотипа. Така например, фенотипът на фамилиите от град Нова Загора и град Видин 2А е сходен, но при семейството от град Нова Загора, се идентифицира локус, картиран върху хромозома 7p21.3. По подобен начин фамилията от град Видин 2В има сходен фенотип с ромската фамилия, описана от Angelicheva и съавт. (2009), но при последната беше установена скаченост с хромозома 5q31.3-q32, която липсва при Видин 2В.
6. При част от изследваните семейства с фамилна форма на епилепсия не беше картиран генетичен локус. Този резултат отхвърля възможността за моногенна наследствена епилепсия с Менделов тип на унаследяване и предполага полигенно унаследяване или мултифакторна патогенеза на заболяването.
7. Молекулярно-генетични изследвания при пациенти с фенотип отговарящ на синдрома на Dravet са необходими, тъй като установяването на мутации в SCN1A гена има важно диагностично, терапевтично и прогностично значение. Молекулярно-генетични изследвания при изразената генотипна и фенотипна хетерогенност на фамилните фокални епилепсии и генетичната епилепсия с фебрилни гърчове плюс за диагностика, за сега имат ограничено приложение.

4. ПРИНОСИ

<u>Научно-теоретични приноси</u>:

1. Описан е нов фенотип на фамилна мезиална темпорално-дялова епилепсия, картирана върху нов локус на хромозома 7p21.3;
2. Описана е нова форма на генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс и преобладаващи *парциални* пристъпи, картирана върху нов локус на хромозома 12p13.33;
3. Описана е фамилия с генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс (ГЕФГ+) с мозаицизъм при погрешносмислена мутация в SCN1A гена *(p.D194N)* при атипичен синдром на Dravet, унаследена от баща с ФГ+. Това доказва, че при такива мутации в *SCN1A, в следващото поколениие е възможна фенотипната* експресия на тежката епилептична енцефалопатия (синдром на Dravet);
4. Описана е фамилна латерална темпорално-дялова епилепсия с нов фенотип и погрешносмислена мутация в NCKAP5 гена
5. Описана е българска фамилия с митохондриална цитопатия и дефицит на комплекс IV на митохондриалната дихателна верига, в която епилепсията е водеща фенотипна изява.

<u>Практически приноси</u>:

1. Създадена е ДНК банка на пациенти с наследствени форми на епилепсия, основана на събраната кохорта от семейства с различни форми на наследствена фокална епилепсия и генетична епилепсия с фебрилни гърчове плюс, които са детайлно клинично фенотипизирани, с установени интер- и интра-фамилни вариации и подготвени за бъдещ молекулярно-генетичен анализ.

ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ В СПИСАНИЯ- 8

1. **Желязкова С**., Търнев И. Автозомно-доминантни фамилни парциални епилептични синдроми – клинична, електрофизиологична и генетична характеристика. Българска Неврология 2009 (9), 4, 164
2. **Желязкова С**., Радионова М, Сандер Ж, Търнев И. Фамилни мезиални и латерални темпорални епилепсии. Неврология и психиатрия 2011,(1): 51-54
3. **Желязкова С**., Търнев И. Идиопатични генерализирани епилепсии – основни генетични характеристики. Българска Неврология 2011,11 (1):1-7
4. **Желязкова С**, Радионова М, Morar B, Азманов Д, Ангеличева Д, Гергелчева В, Кънева Р, Златарева Д, Scheffer I, Калайджиева Л, Sander J W , Търнев И. Клинико-генетично проучване на ромска фамилия с генерализирана епилепсия и фебрилни гърчове плюс и нов локус на хромозома 12p13.33. Неврология и психиатрия 2012,(2): 69-73
5. **Желязкова С**, Азманов Д, Димова П, Радионова М, Божинова В, Флорез Л, Смит Ш, Жабленски А, Мъли Дж, Шефер И, Калайджиева Л, Сандер Ж, Търнев И. Клинико-генетично проучване на ромска фамилия със синдром на Dravet и мозаицизъм при погрешносмислена мутация в SCN1A гена. Неврология и психиатрия 2013, (3): 42-46
6. Azmanov D, **Zhelyazkova S**, Dimova P, Radionova M, Bojinova V, Florez L, Smith S, Tournev I, Jablensky A, Mulley J, Scheffer I, Kalaydjieva L, Sander JW. Mosaicism of a missense SCN1A mutation and Dravet syndrome in a Roma/Gypsy family. Epileptic Disord 2010; 12 (2): 117-24
7. Azmanov D, **Zhelyazkova S**, Radionova M, Morar B., Angelicheva D, Zlatareva D, Kaneva R, Tournev I, , Kalaydjieva L , Sander JW . Focal epilepsy of probable temporal lobe origin in a Gypsy family showing linkage to a novel locus on 7p21.3. Epilepsy Res. 2011 Sep;96(1-2):101-8.
8. Morar B, **Zhelyazkova S**, Azmanov DN, Radionova M, Angelicheva D, Guergueltcheva V, Kaneva R, Scheffer IE, Tournev I, Kalaydjieva L, Sander JW. A novel GEFS+ locus on 12p13.33 in a large Roma family. Epilepsy Res. 2011 Nov; 97(1-2):198-207.

НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ - 8
ПОСТЕРИ:

1. **С. Желязкова**, М.Радионова, И.Търнев, В. Гергелчева, Д. Азманов, Л. Калайджиева, Л. Сандер. Клинико-генетично проучване на ромска фамилия с идиопатична генерализирана епилепсия, картирана върху 12 хромозома. XI Национален конгрес по неврология с международно участие. София, България, 14-16 май 2009 г.

2. **Zhelyazkova S**, Tournev I, Radionova M, GuergueltchevaV, Morar B, Azmanov D, Angelicheva D, Scheffer I.E, Kalaydjieva L, Sander J W. GEFS + syndrome in a large Gypsy/Roma family. 21st ENS Meeting 28-31. 05. 2011, Lisbon

3. **С. Желязкова**, Д. Азманов, П. Димова, М. Радионова, В. Божинова, Л. Флорез, Ш. Смит, И. Търнев, А. Жабленски, Дж. Мъли, И. Шефер, Л. Калайджиева, Дж. Сандер. Ромска фамилия с гранична форма на синдром на Dravet и мозаицизъм при missense мутация в SCN1A гена. Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитие с международно участие, София, България, 21-23.10.2010 г.

4. **С. Желязкова**, М. Радионова, И.Търнев, Д. Азманов, Л. Калайджиева, Дж. Сандер. Фамилна мезиална темпорална епилепсия при роми. Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитие с международно участие София, България, 21-23.10.2010 г.

5. **Zhelyazkova S**, Radionova M, Tournev I, Azmanov D, Kalaydjieva L, Sander JW. Familial mesial temporal lobe epilepsy in Roma population. 14 EFNS congress in Geneva 25-28.09.2010.

6. **Zhelyazkova S**, Azmanov D, Dimova P, Radionova M, Bojinova V, Florez L, Smith S, Tournev I, Jablenski A, Mulley J, Scheffer I, Kalaydjieva L, Sander J.W. Mosaicism of a missense SCN1A mutation and Dravet syndrome in a Roma/Gypsy family". 20th ENS Meeting 19-23. 07. 2010, Berlin, Germany

7. **Zhelyazkova S**, Radionova M, Tournev I. Autosomal –dominant partial epilepsy with auditory features in a Gypsy/Roma family. 15 EFNS congress in Budapest, 10-13 09. 2011

8. **Желязкова С**., Радионова М, Търнев И. Латерална темпорална епилепсия при ромска фамилия. XII Национален конгрес по неврология с международно участие, София, 19-21.05.2011

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

1. Проект № 458736 на тема „Генетично и фенотипно проучване на парциална епилепсия при роми", финансиран от National Health and Medical Research Council of Australia. 2007 – 2009г .

2. Проект „Млад изследовател" № 12 D/2009 на тема „Клинично и генетично проучване на наследствена парциална епилепсия при роми", финансиран от Медицински Университет, София 2009-2010г.

3. Проект ДТК 02/67 от 17.12.2009 на тема" Съвременни подходи за разкриване генетичните основи на епилепсията", финансиран от МОН, 2009 – 2012г.

4. Проект ДУНК № 01-2/2009 г. от конкурс „Изграждане на университетски научноизследователски комплекси – 2009" на МОН на тема: „Национален Университетски комплекс за Биомедицински и приложни изследвания".

SUMMARY

Epilepsy is a common neurologic disorder, with prevalence in some resource-poor settings of up to 1-1.5%. Genetic factors are thought to play a role in the pathogenesis, with a monogenic or polygenic model of inheritance. Idiopathic epilepsies represent up to 47% of all epilepsies, as only 2% of them are considered to be monogenic. During the last 2 decades, several epilepsy-causing gene mutations and partial epilepsies with single-gene inheritance have been identified, but numerous issues still remain unclear.

The aim of our study was the clinical and genetic characterization of pedigrees with familial focal epilepsies and genetic epilepsy with febrile seizures plus.

Material and methods: In total 26 families with 130 epileptic patients were identified. The affected individuals were interviewed, underwent clinical and neurological examination and after informed consent was signed, peripheral blood for DNA extraction was obtained. Subsequently, the whole collected medical and genealogical information was reviewed and 8 families with a total of 80 patients were selected for molecular-genetic analysis and included in this study. EEG recordings were performed in 79 patients. Brain MRI was done in 33 individuals. Twenty-two patients underwent neuropsychological assessment.

Results: The first family is a Roma/Gypsy family from the village of Nova Zagora which presented with a unique phenotype of familial mesial temporal lobe epilepsy. Linkage analysis identified a single novel locus on 7p21.3, corresponding to the expected maximum in the family. The second family is from the village of Maisko and it is a Gypsy/Roma family where a missense mutation in SCN1A, p.D194N was transmitted from a mosaic GEFS+ father to a child with Dravet syndrome. The third family is a large consanguineous Roma/Gypsy family from the village of Slunchevo with phenotype compatible with GEFS+, with some unusual features, e.g. generalized tonic-clonic seizures persisting into late adult life and high frequency of focal epilepsy. A dense SNP genome scan and linkage analysis identified a novel GEFS+ locus on chromosome 12p13.33. The fourth family is a Roma/Gypsy family from the village of Razgrad with familial lateral temporal lobe epilepsy and some atypical features including lower age at seizure onset and abnormal EEG recordings in all except one of the patients. The molecular-genetic studies did not reveal any mutations in LGI1 gene, but identified a missense mutation in NCKAP5 gene. The fifth family is from Sofia and presented with phenotype classified as non-syndromic mitochondrial disorder, due to a complex IV defect of the mitochondrial respiratory chain where epilepsy was the main clinical manifestation. The sixth family is from Vidin and has a complicated pedigree structure, with two major branches V2A and V2B. The clinical picture in branch V2A was most consistent with the benign form of familial mesial temporal lobe epilepsy, while in branch V2A with familial temporal lobe epilepsy associated with febrile seizures without hippocampal sclerosis. Linkage study in this family gave negative or inconclusive results for all investigated loci. The seventh family is of a Bulgarian origin and it presented with autosomal dominant focal epilepsy with secondary generalized tonic-clinic seizures and benign course. The differential diagnosis included autosomal dominant rolandic epilepsy with speech dyspraxia and mesial temporal lobe epilepsy.

However, the precise classification of the familial epileptic syndrome failed in this case because of the lack of reliable description of the seizures and previous medical records. The last family is a large Wallachian Gypsy family from the Plovdiv region with a clinical picture consistent with GEFS+. None of the loci containing the GEFS+ genes known to date gave positive LOD scores.

Our results confirm that familial focal epilepsies and GEFS+ are clinically and genetically heterogeneous and that genetic testing is indicated only for cases, where the finding of a genetic mutation may influence patient management and genetic counseling.