

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ

КАТЕДРА ПО НЕВРОЛОГИЯ

Завеждащ Катедра: Проф. Д-р Лъчезар Трайков

Д-р Албена Каменова Андреева

**ФЕНОТИПНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ГЕНОТИП-ФЕНОТИП
КОРЕЛАЦИИ ПРИ НАСЛЕДСТВЕНИТЕ СПАСТИЧНИ
ПАРАПАРЕЗИ**

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

София

2013

Дисертационният труд е написан на 297 машинописни страници, включващи 73 таблици и 40 фигури. Библиографският списък съдържа 217 литературни източника, от които 5 на кирилица и 212 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедрата по неврология при Медицински университет-София на 25.06.2013 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 28.11.2013 г. от 14.00 ч., в Аудиторията на Клиниката по нервни болести – УМБАЛ „Александровска” – София, съобразно заповед на ректора № РК 36-1483/18.07.2013 г. при научно жури в състав:

1. Проф. Д-р А. Капрелян, дм (рецензия)
2. Доц. Д-р В. Гергелчева, дм (рецензия)
3. Проф. Д-р И. Търнев, дмн (становище)
4. Проф. Д-р Л. Мавлов, дмн (становище)
5. Доц. Д-р Н. Никоевски, дмн (становище)

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

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

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение

II. Постановка на изследването

- II.1 Цели, хипотези и задачи
- II.2 Контингент на изследване
- II.3 Методи на изследване

III. Резултати

- III.1 Генетично верифицирани семейства с автозомно-доминантна Наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутации в спастиновия ген
 - III.1.1 Клинико-генетичен анализ на семействата със спастинови мутации
 - III.2.1 Клинико-генетичен анализ на семействата с погрешно-смислени мутации
 - III.2.2 Клинико-генетичен анализ на семействата със сплайс-сайт мутации
 - III.2.3 Клинико-генетичен анализ на семействата с делеции
 - III.2.4 Клинико-генетичен анализ на семействата с единични нуклеотидни замени, водещи до възникване на стоп кодон
 - III.2.5 Сравнително представяне на семействата с различни типове мутации в спастиновия ген
 - III.3 Генетично верифицирани семейства с автозомно-доминантна Наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутации в атластиновия ген
 - III.3.1 Клинико-генетичен анализ на семействата с мутации в атластиновия ген
 - III.3.2 Обобщени данни за семействата с мутации в атластиновия ген
 - III.3.3 Сравнително представяне на семействата с атластинови мутации
 - III.4 Сравнително изследване на семействата с мутации в гените, кодиращи спастин и атластин
 - III.5 Генетично верифицирани семейства с автозомно-рецесивна Наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутации в спатаксиновия ген
 - III.5.1 Клинико-генетичен анализ на семействата с мутации в спатаксиновия ген
 - III.5.2 Обобщени данни за пациентите с мутации в спатаксиновия ген
 - III.6 Генетично верифицирани семейства с автозомно-рецесивна Наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутации в параплегиновия ген
 - III.6.1 Клинико-генетичен анализ на семействата с мутации в параплегиновия ген
 - III.6.2 Обсъждане на семействата с мутация p.L78X в параплегиновия ген
 - III.7 Сравнително представяне на семействата с мутации в гените, кодиращи параплегин и спатаксин
- IV. Диагностичен подход при Наследствените спастични парапарези – обобщение на съвременните препоръки и приложение на получените знания
- V. Приноси

Използвани съкращения:

АД	Автозомно-доминантен
АР	Автозомно рецесивен
БА	Болест на Алцхаймер
НСП	Наследствена спастична парапареза
СНР	Сухожилни и надкостни рефлекси
ДК	Долни крайници
ГК	Горни крайници
ЕМГ	Електромиография
ЕП	Евокирани потенциали
ЗЕП	Зрителни евокирани потенциали
М.с. СЕП	Мозъчностволови Слухови евокирани потенциали
МРТ	Магнитно-резонансна томография
КТ	Компютърна томография
ОСТ	Оптична кохерентна томография
SPG	Спастична параплегия
SPRS	Скала за оценка на спастичната параплегия
SARA	Скала за откриване и оценка на атаксия

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Наследствените спастични парапарези (НСП) са група от херeditарни заболявания, за които е характерно голямо клинично и генетично разнообразие. Характеризират се с бавно прогресираща дисфункция на пирамидните пътища (Derienne и сътр., 2007; Fink, 2003; Salinas и сътр., 2008; Gasser и сътр., 2010).

Патоморфологично се наблюдава аксонална дегенерация, разпространяваща се от периферния край на аксона към клетъчното тяло като в напредналите фази на заболяването е възможно наличието на неспецифични лезии в бялото мозъчно вещество.

Първите симптоми могат да се явят във всяка възраст – от детска до над 70 години (Harding, 1983; Salinas и сътр., 2008).

Клинично се класифицират като чисти и комплицирани форми (Harding, 1983; Fink, 2009). Типични са бавната прогресия, без клинични ремисии и двустранното и симетрично засягане на долни крайници. Заболяването не е свързано с намаляване на естествената продължителност на живота на пациентите, но с прогресията му част от тях могат да са принудени да използват помощни средства за придвижване или са приковани на инвалиден стол.

Основни белези на чистите форми са постепенно прогресираща спастичност в долни крайници, тазоворезервоарни разстройства и дискретни смущения във вибрационния и позиционен усет (Harding, 1983; Polo и сътр., 1993; Fink, 2006). Ангажирането на горните крайници не е типично. В болестния процес не се вълчва булбарната мускулатура.

Херeditарните спастични парапарези се определят като комплицирани при наличие на допълнителни неврологични и екстраневрологични симптоми и белези като деменция, амиотрофия, периферна невропатия, епилептични пристъпи, хипоплазия на корпус калозум, фронтална корова атрофия или екстрапирамидни смущения (Harding, 1983; McDermotte и Shaw, 2002).

Начинът на унаследяване може да бъде автозомно-доминантен, автозомно-рецесивен и Х-свързан. До момента са описани над 48 форми – 16 автозомно-доминантни, 27 автозомно-рецесивни и 5 Х-свързани.

През последните 120 години са събрани данни за множество клинични форми, които не могат да бъдат класифицирани само на базата на предложената от Harding класификация. Натрупват се знания за различни варианти на НСП, чиито характеристики излизат далеч извън рамките на разделянето им на форми с ранно и късно начало. Постепенно става ясно, че прецизната диагностика на заболяването изисква използването на съвременен интердисциплинарен подход, характеризиращ се със съвместните усилия на молекулярната генетика и клиничната неврология. Така днес е известно, че НСП могат да се предизвикат от мутации в многобройни гени, кодиращи различни белтъци и че нервната система реагира доста унифицирано на техните промени или дефицит, с прояви на постепенно прогресираща долна спастична парапареза. Същевременно интердисциплинарният подход подпомага диагностицирането на комплицираните форми и причисляването им към групата на

наследствените спастични парапарези, както и спомага за отдиференцирането им от други невродегенеративни заболявания.

Българската популация се състои от различни етноси. Това е предпоставка от една страна преобладаващият брой случаи да е с автозомно-доминантен тип на унаследяване и чист клиничен фенотип, както е сред народите, населяващи Северна Европа и Северна Америка. От друга страна в България са налице затворени ендогамни общности, сред които доминира автозомно-рецесивния модел на унаследяване и комплициран фенотип, което е характерно за народите на Северна Африка и Средиземноморския басейн.

Поради изключителната клинична и генетична хетерогенност на НСП, преобладаващото схващане на изследователите е, че на този етап не може да се открие категорична корелация между даден генетичен локус и строго определени клинични фенотипи. Същевременно е налице и голяма интер- и интрафамилна вариабилност на клиничната картина при ангажиране на един и същ генетичен локус.

Независимо от това, знанията за честотата на определени мутации в популацията и задълбоченото и последователно изучаване на клиничните фенотипи дават възможност за отдиференциране на по-хомогенни синдромокомплекси, свързани с даден генетичен локус. Това подпомага ефективното насочване на молекулярно-генетичните изследвания и става основа за генетично консултиране на засегнатите семейства.

II. ПОСТАНОВКА НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

II.1 Цели, хипотези и задачи

Цел на настоящото проучване е фенотипното характеризиране и изясняването на генотип-фенотип корелациите при наследствените спастични параплегии, дължащи се на различни генетични дефекти, с оглед ефективно насочване за молекулярно-генетично изследване и създаване на възможности за генетична профилактика на засегнатите семейства.

Литературният обзор, данните от предварителните клинични изследвания и нарастващият брой генетично верифицирани пациенти и семейства с НСП в България позволяват да се формират следните **хипотези**:

Мултиетническият състав на българската популация предполага голяма клинична и генетична хетерогенност на наследствените спастични парапарези. Очакваме, подобно на други европейски държави, да преобладават АД форми. Едновременно с това, наличието на затворени, ендогамни общности и групи в България предполага, че ще се откриват често и АР форми сред тях.

Друга наша хипотеза е, че наследствени спастични парапарези със сходен фенотип могат да се дължат на мутации в различни гени и да се обуславят от различни патогенетични механизми, и обратно - различни мутации в един и същи ген могат да

причиняват различни клинични профили на заболяването. Клиничният фенотип вероятно зависи от вида и локализацията на мутацията и нейния ефект върху белтъчната структура и функция.

Проучването има следните по-конкретни **задачи**:

- 1/ Детайлно фенотипизиране на фамилии с различни форми на наследствена спастична парапареза с използването на клинични и невроизобразяващи методи
- 2/ Генеалогично проучване на засегнатите фамилии с оглед изясняване типа на унаследяване
- 3/ Събиране на кръвни проби и насочване за молекулярно-генетично изследване
- 4/ Проучване на интра- и интерфамилните вариации в клиничното протичане на наследствените спастични парапарези, причинени от една и съща мутация.
- 5/ Сравняване фенотипните прояви при наследствени спастични парапарези, причинени от известни генетични дефекти с описаните в литературата.
- 6/ Сравняване на фенотипната характеристика на наследствени спастични парапарези, причинени от мутации в различни гени.
- 7/ Сравняване на фенотипната характеристика на наследствени спастични парапарези, причинени от различни мутации в един и същи ген.
- 8/ Изработване на клинични насоки за диференцирано молекулярно-генетично изследване на фамилни и спорадични случаи с наследствени спастични парапарези в България

II.2 КОНТИНГЕНТ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

До момента са прегледани и изследвани общо 397 болни и представители на техните семейства, произхождащи от 140 родословия, насочени към клиниката с диагноза: „Наследствена спастична парапареза” или идентифицирани при теренни проучвания. При 277 пациенти са установени история на заболяването и промени в неврологичния статус, съвместими с посочената диагноза.

Молекулярно-генетичното изследване е потвърдило диагнозата при 68 пациента от 32 фамилии като са установени мутации в гените, кодиращи белтъците спастин, атластин, параплегин и спатаксин. Автозомно-доминантен модел на унаследяване се наблюдава при 21 семейства, автозомно-рецесивен при 8 семейства, а 3 от случаите са спорадични. Според разпределението по пол генетично уточнените пациенти са съответно 39 мъже и 29 жени. Изследваните семейства са от български, ромски и турски етнически произход. Спастинови мутации са установени при 36 пациента, принадлежащи към 22 семейства като от тях 22 са мъже, а 14 са жени. Мутации в атластиновия ген са открити при 11 болни (7 мъже и 4 жени) в 2 фамилии. При две пациентки в едно семейство е установена мутация в гена, кодиращ спатаксин. Параплегинови мутации са установени при 19 пациента (10 мъже и 9 жени) в хомозиготно състояние, а в хетерозиготно състояние при 53 болни (30 мъже и 23 жени), произхождащи от 7 родословия. Клинично и генеалогично изследвания са осъществени при всички болни. МРТ на главен мозък и цервикален миелон е осъществена при 32 от верифицираните болни. При 14 болни е осъществен МРТ на тораколумбален сегмент на гръбнака. При 4 болни е проведена КТ на главен мозък. При 30 пациенти е осъществено ЕМГ изследване. Ликворно изследване е проведено при 20 болни. Евокирани потенциали са осъществени при 30 болни. Невроофтالمологична

консултация е проведена при 30 пациенти. Подробно невропсихологично изследване е правено при 18 пациенти. Невроотологична консултация е проведена при 21 болни.

До този момент генетична верификация не е направена при 107 семейства, към които принадлежат 208 болни. Независимо от това, те са изследвани подробно клинично, а мнозинството от тях и инструментално. При тях е проведен и мутационен скрининг за най-честите мутации. От тези 107 семейства: 18 показват АД модел на унаследяване, 25 семейства са с автозомно-рецесивен модел на унаследяване, а спорадичните случаи са 64.

От анализите са изключени 6 от първоначално изследваните фамилии, защото еволюцията на заболяването при засегнатите индивиди показва, че се касае за друга диагноза. Разширеното генеалогично изследване и теренните проучвания демонстрираха, че други 5 случая, считани първоначално за спорадични всъщност принадлежат към големи ромски семейства с автозомно-рецесивно унаследяване.

II.3 МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ:

1. Клинични методи

1.1. Снемане на анамнеза и изследване на неврологичен статус

1.2. Невроофтальмологично изследване

1.3. Отоневрологично изследване

2. Неврофизиологични изследвания

2.1. ЕНГ и ЕМГ

2.2. Изследване на евокирани потенциали – ЗЕП, м.с.СЕП

2.3. ЕЕГ и мозъчна картография

3. Лабораторни изследвания на серум и ликвор

4. Невропсихологично изследване

5. Изобразяващи изследвания: КАТ/МРТ на главен и гръбначен мозък

6. Родословен метод – генеалогично проучване с оглед търсене на връзка между отделните засегнати индивиди.

7. Молекулярно–генетични методи

8. Статистически методи за обработка на резултатите от клиничните, както и от генотип–фенотип корелациите.

При снемането на анамнезата са отчитани: възраст на първите прояви на заболяването, възраст при изследването, характеристика на първите оплаквания, настоящи оплаквания, ход на оплакванията, наличие на чист фенотип или на допълнителни комплициращи фенотипа симптоми и асоциирани белези, способност за самостоятелно придвижване и необходимост от използване на помощни средства, както и възраст, на която се появява необходимост от подпомагане при придвижването. При изпращането на биологични проби (кръв или слюнка) за генетично изследване са попълвани специални протоколи (приложение 1).

Като основни клинични инструменти за определяне на тежестта на заболяването и степента на инвалидизация при пациентите с НСП са използвани следните скали:

1. Десетстепенната скала на Walton, отчитща степента на инвалидизация чрез критерии, засягащи способностите за самообслужване и справяне с ежедневните дейности (Walton и сътр., 2006);

2. Скала за оценка на спастичната парапареза (Schule и сътр., 2006), всепризната като най-детайлното средство за оценка на всички засегнати системи и функции при НСП, а именно: способност за самостоятелно придвижване, оценявана чрез изминавано разстояние, качество и скорост на походката, възможност за изкачване на стълби и скорост за изпълнение на поставената задача, изправяне от седнало положение; кардиналният белег на НСП – спастичността в долни крайници се оценява чрез модифицираната скала на Ashworth, вземаща под внимание спастичността във флексорите, аддукторите и абдукторите на бедрото; паретичните прояви се определят чрез изследване силата на абдукторите на бедрото и флексорите на стъпалото; под внимание се взема присъствието на контрактури в ставите, а чрез визуално-аналоговата скала се регистрира присъствието на болка, дължаща се на спастичитета в долни крайници, оценява се и наличието или липсата на тазоворезервоарни дисфункции; Числовият израз на степента на инвалидизация при нея варира от 0 до 52 точки.

3. Петстепенната скала за определяне тежестта на заболяването, въведена от Fonknechten през 2000 г. градира степента инвалидизация, акцентирайки върху прехода от нормална самостоятелна походка до необходимост от употреба на помощни средства и инвалиден стол;

4. За оценка на пирамидното ангажиране при хомозиготни и хетерозиготни носители на мутацията е използвана петстепенна скала за пирамидно засягане, разглеждаща аспектите на кортикоспинална дисфункция от норморефлексия до възникване на спастична парапареза (Търнев и сътр., 2012).

5. Като индивидуално средство за определяне тежестта на спастичност в долни крайници е използвана скалата на Ashworth (Ashworth, 1964). 6. За прецизиране на тежестта на церебеларната симптоматика при болни с комплицирани форми на заболяването е използвана Скала за откриване и оценка на атаксията (Schmitz-Hübisch T и сътр., 2006), оценяваща подробно всички аспекти на нео- и палеоцеребеларно малкомозъчно засягане. Според нея тежестта на церебеларната атаксия се определя от 0 до 30 точки. Всички оценъчни скали са представени подробно в приложение 2

Използвани са данните от проведените хематологични и биохимични изследвания, ликворно изследване и ликворна електрофореза. Евокирани потенциали – ЗЕП и м.с. СЕП, са осъществявани на двуканален усреднител Nihon Kohden, модел Neuropack. ЕМГ изследване при болните е провеждано на Dantec-Keypoint електромиограф (Natus, Copenhagen, Denmark). Невроизобразяващите изследвания на главен мозък и миелон са извършвани с апарати 1.5 T MR Imager (MR Signa HDxt, GE Healthcare Milwaukee USA) и 0.5 T MR Imager (Phillips GS PTPTN). Невропсихологичното изследване е осъществявано с тест-батерия, оценяваща екзекутивните функции, внимание, памет, ориентация, интелектуални функции, зрително-пространствени способности и праксис. Невроофтالمологичните и отоневрологични специализирани консултации са осъществявани в УМБАЛ «Александровска».

Молекулярно-генетичният анализ е проведен в Лаборатория по молекулярна патология, СБАЛАГ «Майчин дом» и Лаборатория по неврогенетика, Университет – Антверпен, Белгия. При всички изследвани пациенти е получено предварително информирано съгласие за молекулярно-генетично изследване.

В проучването са включени пациенти, изследвани в УМБАЛ «Александровска», Детска неврологична клиника, УСБАЛНП «Св. Наум», УМБАЛ «Царица Йоанна», амбулаторни пациенти и пациенти и семейства идентифицирани и изследвани по време на теренни проучвания в страната.

Осъществени са теренни проучвания с цел генеалогично изследване, изграждане на родословни дървета и установяване начина на унаследяване. Информацията за

отбелязаните като засегнати индивиди във фамилиите е получена от пациентите. При проучванията на терен са събирани проби от кръв и слюнка за целите на молекулярно-генетичната диагностика. Теренни проучвания са извършвани в областите Кюстендил, Благоевград, Плевен, Пловдив, Разград, Русе, Хасково, Сливен, Стара Загора, Бургас, Варна, Търговище, където са идентифицирани по-големи семейства.

III. РЕЗУЛТАТИ

III.1 ГЕНЕТИЧНО ВЕРИФИЦИРАНИ СЕМЕЙСТВА С АВТОЗОМНО-ДОМИНАНТНА НАСЛЕДСТВЕНА СПАСТИЧНА ПАРАПАРЕЗА, ДЪЛЖАЩА СЕ НА МУТАЦИИ В СПАСТИНОВИЯ ГЕН

III.1.1 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА СЕМЕЙСТВОТА СЪС СПАСТИНОВИ МУТАЦИИ

Спастинови мутации са установени при 36 пациенти, произхождащи от 22 семейства. От тях 14 са жени и 22 са мъже. Възрастовият диапазон на пациентите към момента на прегледа варира от 10 до 71 годишна възраст. Възрастта на изява на първите симптоми варира между 2 години и 65 години. Средната възраст на първоначална изява на заболяването е 30.2 години. Един пациент е клинично асимптомен. Средната продължителност на заболяването е 13.71 години. Според етническия си произход семействата са: 1 турско, 2 ромски, 1 българомохамеданско и 18 български. Автозомно-доминантен модел на унаследяване се наблюдава при 19 фамилии, а в 3 от случаите се касае за спорадични мутации. Чиста фенотипна изява се установява при 20 семейства, а комплицирана при 2 семейства. В 9 семейства се установява ранно начало – преди 35 годишна възраст, а при 13 семейства – късно начало. В 10 от семействата е налице антиципация с по-ранна изява на симптомите в следващите поколения. Според вида на установените мутации семействата се подразделят, както следва: при 9 фамилии са открити погрешносмислени мутации, при 5 - сплайс мутации, при - 4 делеции, при 1 - дупликация и при 3 – единични нуклеотидни замени, водещи до стоп кодон.

На таблица 1 е направено обобщено представяне на всички верифицирани мутации в спастиновия ген

Таблица 1 Семейства с мутации в спастиновия ген

Семейство-Индексен пациент	Нуклеотидна замяна	Аминокиселин на замяна	Тип на мутацията	Локализація в гена	Тип на унаследяване	Етническа принадлежност	Съобщена за първи път
1-1 1-3	g.60863G>A	IVS4-1G>A	Единична нуклеотидна замяна в сплайс-акцепторно място	Инtron 4	АД	Българска	Иванова и сътр., 2006
2-2 2-3 2-5	g.83103A>G	p.D441G	Единична нуклеотидна замяна/Погрешно смислена мутация	Екзон 11	АД	Турска	Burger и сътр., 2000
3-1 3-2 3-3	g.91195C>T	p.T550I	Единична нуклеотидна замяна/Погрешно смислена мутация	Екзон 15	АД	Турски роми	Иванова и сътр., 2006
4-2 4-3	g.100598A>G	IVS16-2A >G	Единична нуклеотидна замяна в сплайс-акцепторно място	Инtron 16	АД	Българска	Иванова и сътр., 2006

5	c.415+1G->T	IVS1+1G>T	Единична нуклеотидна замяна в сплайс-донорно място	Интрон 1	АД	Ромска	Derienne и сътр., 2006
6	g.35759_35760 delTG	p.G171del GTfsX	Делеция с изместване на рамката на четене	Екзон 3	АД	Българска	Иванова и сътр., 2006
7	c.1877C->A	p.D584E	Погрешносмислена на	Екзон 17	АД	Българска	Нова
8	g.35759_35760 delTG	p.G171del GTfsX	Делеция с изместване на рамката на четене	Екзон 3	АД	Българска	Иванова и сътр., 2006
9	c. 1269G->A	p.G382S	Погрешносмислена	Екзон 8	Спорадичен АД	Българска	Нова
10-1 10-3		IVS5-9 C>T	Единична нуклеотидна замяна в сплайс-акцепторно място			Българска	Нова
11-1 11-3		ex8-16 deletion	Делеция	Екзон 8	АД	Българска	Нова
12		ex1 duplication	Дупликация	Екзон 1	АД	Българска	Нова
13	c.415+1 G/T	IVS1+1G>T	Единична нуклеотидна замяна в сплайс-донорно място	Интрон 1	АД	Българска	Derienne и сътр., 2006
14-2	c.1792C->T	p.A556V	Погрешносмислена	Екзон 15	АД	Българска	Fonknechten и сътр., 2000
15	c.1268delT	p.F381FfsX 395	Делеция	Екзон 8	Спорадичен	Българска	Нова
16-3	c.1282 A >G	p.N386S	Погрешносмислена	Екзон 8	Спорадичен	Българска	Orlacchio и сътр., 2004
17-1 17-2	c.1164C->T	p.Q347X	Единична нуклеотидна замяна, водеща до формиране на стоп кодон	Екзон 7	АД	Българо-мохамедани	McDermott и сътр., 2009
18-1 18-3	c1245 C>T	p.P374S	Погрешносмислена		АД	Българска	Нова
19	c.1164C->T	p.Q347X	Единична нуклеотидна замяна, водеща до формиране на стоп кодон	Екзон 7	АД	Българска	McDermott и сътр., 2009
20	c1809 C>T	p.R562X	Единична нуклеотидна замяна, водеща до формиране на стоп кодон	Екзон 15	АД	Българска	Fonknechten и сътр., 2000
21-1 21-3 21-4	c1468 G>A	p.C448Y	Погрешносмислена	Екзон 11	АД	Българска	Hazan и сътр., 1999
22-1 22-2 22-3	c1233G>C	p.G370R	Погрешносмислена		АД	Българска	Нова

Клиничната диагноза при пациентите се базираше на следните основни пунктове:

1. Клинична картина с двустранно пирамидно засягане в долни крайници, включващо хиперрефлексия, спастичност и патологични рефлексии в долни крайници;

2. Неврологично изследване, потвърждаващо пирамидната увреда и евентуално смутен вибрационен усет в долни крайници, включително оценка според Скалата за оценка на спастичната парапареза, скалите на Ashworth и Walton и 5-степенната скала за оценка степента на инвалидизация;
3. Модел на унаследяване, съответстващ на автозомно-доминантна НСП
4. Фамилна история на заболяването с подробен генеалогичен анализ и/или изключване на друга причина за спастична парапареза при спорадичните случаи;
5. Насока за провеждане на молекулярно-генетични изследвания;

Обобщените фенотипни данни за семействата със спастинови мутации са представени на таблица 2

Таблица 2. Обобщени фенотипни данни за семействата със спастинови мутации

Брой пациенти; Мъже/Жени	36; 22/14
Средна възраст при началните симптоми (години)	30.2 (SD 15.51; граници 2-65)
Средна продължителност на заболяването (години)	13.71 (SD 10.39; граници 1-35)
Средна възраст, при която самостоятелното придвижване става невъзможно (години)	43.4 (граници 34-59)
Фамилна история	19; (86 %)
Спорадични случаи	3; (13.6%)
Чист фенотип	20; (90%)
Комплициран фенотип	2; (10%)
Антиципация	10 (45%)
Когнитивни смущения	3/36; (8.3%)
Самостоятелно придвижване	4/36; (11.1%)
Затруднено, но без помощни средства	21/36; (58.3%)
Използване на помощни средства	11/36; (30.6%)
ЕМГ данни за полиневропатия	0/18
МРТ	
Атрофия на гръбначния мозък	3/20; (15%)
Неспецифични лезии в бялото мозъчно вещество	4/22; (18%)

Според вида на установените мутации семействата се подразделят на:

1. Носители на погрешносмислени мутации – 9 семейства (семейство 2; семейство 3; семейство 7; семейство 9; семейство 14; семейство 16; семейство 18; семейство 21; семейство 22);
2. Сплайс сайт мутации – 5 семейства (семейство 1; семейство 4; семейство 5; семейство 13; семейство 10);
3. Делеции – 4 семейства (семейство 6; семейство 8; семейство 11; семейство 15);
4. Дупликации – 1 семейство (семейство 12);
5. Единични нуклеотидни замени, водещи до формирането на стоп кодон – 3 семейства (семейство 20; семейство 9; семейство 17).

III.2.1 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА СЕМЕЙСТВАТА С ПОГРЕШНОСМИСЛЕНИ МУТАЦИИ В СПАСТИНОВИЯ ГЕН

В нашето проучване погрешносмислените мутации представляват 40.9% от всички установени мутации в спастиновия ген.

Семейства с погрешносмислени мутации в спастиновия ген според етническия си произход са: 7 български, 1 турско и 1 турски роми.

Подробното обсъждане на фенотипните им изяви показва, че 7 (77.8%) от семействата са с автозомно-доминантен модел на унаследяване (семейство 2; семейство 3; семейство 7; семейство 14; семейство 18; семейство 21; семейство 22), а в 2 (22.2%) от случаите са налице спорадични мутации (семейство 9; семейство 16).

Чиста фенотипна характеристика се наблюдава при 8 семейства – 7 български (семейство 7; семейство 9; семейство 14; семейство 16; семейство 18; семейство 21; семейство 22) и при 1 ромско (семейство 2). Комплициран фенотип се установява при 1 турско семейство.

Средната възраст на изява на първите симптоми при семействата с погрешносмислени мутации е 27.1 години.

Ранно начало, преди 35 годишна възраст, се установява при 2 български семейства (семейство 9; семейство 16), при турското (семейство 2) и при ромското (семейство 3) семейства. Те представляват 44.4% от контингента болни с погрешносмислени мутации. Най-ранна клинична изява се установява при ромското семейство, където средната възраст на първите симптоми е 3.6 години, следвано от турското семейство – 7 години и от българско (семейство 16) – 12 годишна възраст.

Късно начало, след 35 годишна възраст, се наблюдава 5 български семейства (семейство 7; семейство 14; семейство 18; семейство 21; семейство 22). Тези семейства представляват 55.6% от всички семейства с погрешносмислени мутации.

Антиципация се открива при 5 семейства (семейство 2, семейство 3, семейство 7, семейство 21; семейство 22). Те представляват 55.6% от фамилиите с погрешносмислени мутации.

Тъй като погрешносмислените мутации се установяват при трите основни етноса в България, представяме генеалогичните и фенотипни данни на три фамилии, произхождащи от всеки един от тях.

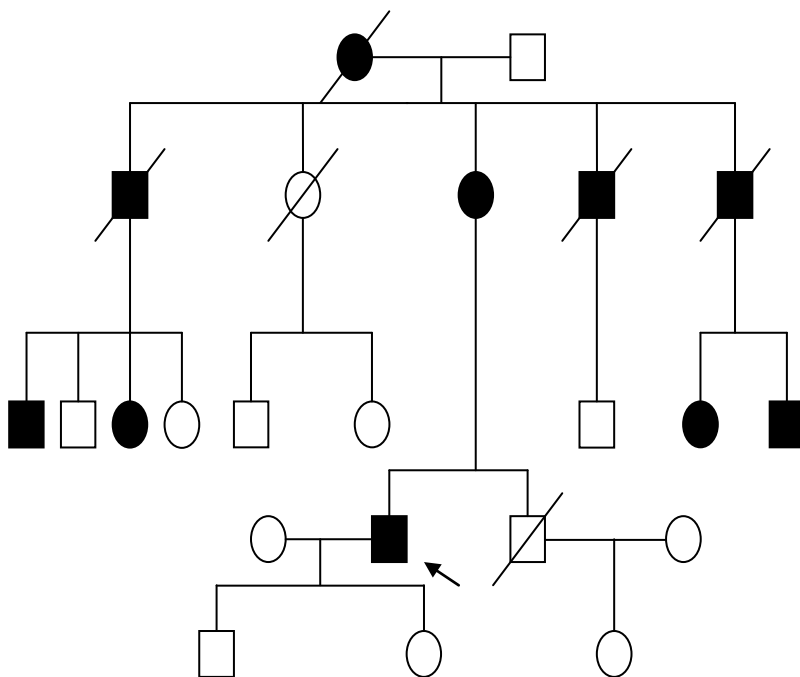
КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БЪЛГАРСКА ФАМИЛИЯ С АД ФОРМА НА НСП ОТ С. ЦАРАЦОВО (СЕМЕЙСТВО 18)

Основните фенотипните характеристики на семейство 18 са представени на таблица 3.

Таблица 3 Фенотипни характеристики на семейство 18

Възраст/Пол	Възраст при дебюта	Фенотип	SPRS	Степен на инвалидизация
62/М	50	Чист Хиперрефлексия в горни крайници	16/52	4
53/Ж	47	Чист	9/52	1

Родословно дърво на семейство 18



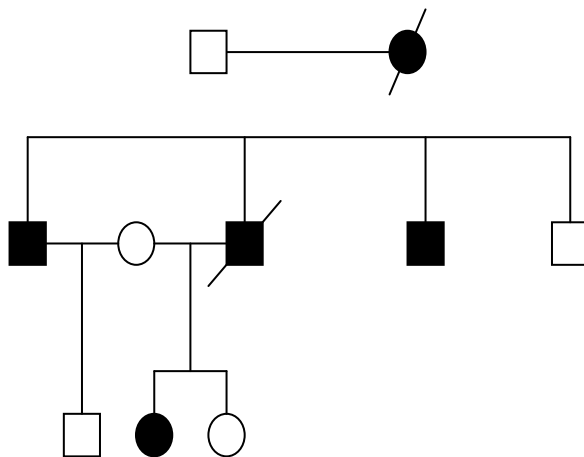
КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТУРСКА ФАМИЛИЯ С АД ФОРМА НА НСП ОТ С. АЛЕКСАНДРОВО (СЕМЕЙСТВО 2)

Основните фенотипните характеристики на семейство 2 са представени на таблица 4

Таблица 4 Фенотипни характеристики на семейство 2

Възраст/Пол	Възраст при дебюта	Фенотип	SPRS	Степен на инвалидизация
13/Ж	2	Комплициран Забавено прохождане Хиперрефлексия в горни крайници Пес кавус	17/52	3
35/М	14	Сколиоза Комплициран Ментална ретардация Хиперрефлексия в горни крайници Сколиоза	21/52	4
34/М	5	Комплициран Ментална ретардация Хиперрефлексия в горни крайници Сколиоза	17/52	3

Родословно дърво на семейство 2



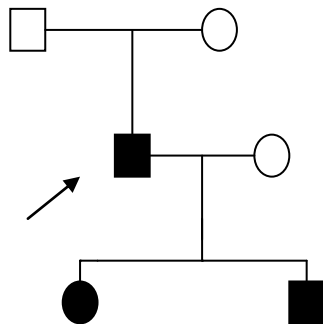
КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА РОМСКА ФАМИЛИЯ С АД ФОРМА НА НСП ОТ С. ЯСЕНОВЕЦ (СЕМЕЙСТВО 3)

Основните фенотипните характеристики на семейство 3 са представени на таблица 5

Таблица 5 Фенотипни характеристики на семейство 3

Възраст/Пол	Възраст при дебюта	Фенотип	SPRS	Степен на инвалидизация
13/Ж	2	Чист Забавено прохождане ТР инконтиненция	19/52	3
15/М	2	Чист Забавено прохождане ТР инконтиненция	18/52	3
42/М	7	Чист Забавено прохождане ТР инконтиненция	21/52	4

Родословно дърво на семейство 3



Тежестта на заболяването при деветте семейства с погрешносмислени мутации по принцип изглежда разнообразна. Оценена според начало на инвалидизация, средна възраст на появата на нужда от употреба на помощни средства и присъствието на различни симптоми като слабост в долни крайници, спастичност, тазоворезервоарни смущения и когнитивен дефицит, безспорно най-тежка клинична изява се наблюдава при семейството с комплициран фенотип (семейство 2).

По отношение на тежестта, оценена според 5-степенната скала за инвалидизацията, изглежда съществува най-висока степен на корелация с продължителността на заболяването като тя е по-висока при индивидите с по-дълго персистиране на клиничните симптоми (Таблица 5).

Таблица 5 Зависимост на степента на инвалидизация от средната продължителност на заболяването

Степен на инвалидизация	Брой пациенти	Средна продължителност на заболяването
1 (Липсва спастичност или много лека спастичност в долни крайници)	4	1.8 год.
2. (Умерено изразена спастичност при ходене)	1	2.0 год.
3. (Бягането е невъзможно, запазена способност за самостоятелно ходене)	9	16.9 год
4. (Ходене с помощни средства)	4	18.3 год
5. (Инвалидна количка)	0	

На таблица 6 са представени 4 пациента, при които еволюцията на заболяването е довела до необходимост от използване на помощни средства за придвижване. Двама от тях принадлежат към семейства с ранно начало и двама към семейства с късно начало на заболяването. Точно както е предположила Harding семействата с късно начало имат по-бърза прогресия и по-бързо достигат по-висока степен на инвалидизация в сравнение с тези с ранна клинична изява.

Таблица 6 Зависимост между типа на заболяването и средната му продължителност до използване на помощни средства

Семейства с ранно начало	Средна продължителност на заболяването до необходимост от помощни средства при ходене (години)
2	19
3	33
Семейства с късно начало	
7	12
18	9

III.2.2 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА СЕМЕЙСТВОТА СЪС СПЛАЙС-САЙТ МУТАЦИИ

Сплайс-сайт мутациите представляват 22.7% от всички мутации, установени в нашето изследване. Те са откриват при 5 семейства (семейство 1, семейство 4, семейство 5, семейство 10, семейство 13).

Според етническия си произход фамилиите са съответно 4 български и 1 ромска. При всички е налице автозомно-доминантен модел на унаследяване. Късно начало се открива при 3 семейства (семейство 1, семейство 5, семейство 13). Те представляват 60% от всички семейства със сплайс мутации. Ранно начало се наблюдава при 2 семейства (семейство 4, семейство 10). Това са 40% от фамилиите със сплайс-сайт мутации. При всички разглеждани семейства е налице чист фенотип. Един пациент е асимптомен носител (семейство 10).

Антиципация се открива при 1 семейство – 1 (20%). Средната възраст на първите симптоми при семействата е 34.3 години.

Представяме генеалогичните и фенотипни данни на българска фамилия със сплайс-сайт мутация.

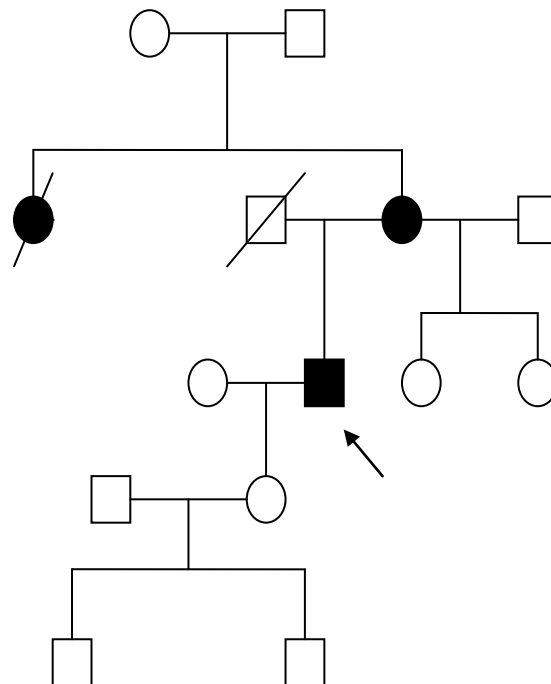
КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БЪЛГАРСКА ФАМИЛИЯ С АД ФОРМА НА НСП ОТ ГР. ПЛОВДИВ (СЕМЕЙСТВО 1)

Основните фенотипните характеристики на семейство 1 са представени на таблица 7

Таблица 7 Фенотипни характеристики на семейство 1

Възраст/Пол	Възраст при дебюта	Фенотип	SPRS	Степен на инвалидизация
71/Ж	50	Чист Хиперрефлексия в горни крайници	20/52	4
48/М	35	Чист Хиперрефлексия в горни крайници ТР императивност	12/52	3

Родословно дърво на семейство 1



Тежестта на заболяването при отделните представители на фамилиите със сплайс-сайт мутации отново показва най-изразена корелация с продължителността на персистиране на клиничните симптоми, което е представено на таблица 8

Таблица 8 Зависимост на степента на инвалидизация от средната продължителност на заболяването

Степен на инвалидизация	Брой пациенти	Средна продължителност на заболяването
1. (Липсва спастичност или много лека спастичност в долни крайници)	2	1 год.
2. (Умерено изразена спастичност при ходене)	1	2 год.
3. (Бягането е невъзможно, запазена способност за самостоятелно ходене)	2	12 год
4. (Ходене с помощни средства)	3	15.3 год
5. (Инвалидна количка)	0	

Пациентите, достигнали до степен на инвалидизация 4 произхождат от 3 семейства – 1, 4 и 5. Две от тези семейства са с късно начало (семейство 1 и семейство 5), едно е с ранно начало (семейство 4). Взаимоотношенията между типа на начало на заболяването и продължителността на заболяването, при която болните се нуждаят от помощ при ходене е представена на таблица 9.

Таблица 9 Зависимост между типа на заболяването и средната му продължителност до използване на помощни средства

Семейства с ранно начало	Средна продължителност на заболяването до необходимост от помощни средства при ходене (години)
4	27
Семейства с късно начало	
1	9
5	10

Следователно и при сплайс-сайт мутациите може да се извади заключението, че формите с късно начало показват тенденция към по-бързо прогресиране и достигат висока степен на инвалидизация за по-кратък период.

III.2.3 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА СЕМЕЙСТВАТА С ДЕЛЕЦИИ

Делециите представляват 18% от всички мутации, установени при нашето изследване. Те се откриват при 4 семейства (семейство 6, семейство 8, семейство 11, семейство 15). Всички семейства са с български етнически произход.

Автозомно-доминантен модел на унаследяване се открива при 3 семейства (семейство 6, семейство 8, семейство 11), а в 1 случай се касае за спорадична мутация. Семейства 6 и 8 са носители на една и съща мутация, но подробният генеалогичен анализ не успя да установи родство между тях.

При всички семейства се установява чиста фенотипна изява.

Ранно начало се открива в 1 семейство (6), което представлява 25% от случаите с делеции, а в останалите 3 семейства се установява късно начало (семейство 8, семейство 11, семейство 15). Те представляват съответно 75% от фамилиите с делеции.

Средната възраст на изява на първите симптоми сред представителите на семействата с делеции е 32.8 години. Антиципация се открива при 2 семейства.

Представяме генеалогичните и фенотипни данни на българска фамилия със сплайс-сайт мутация.

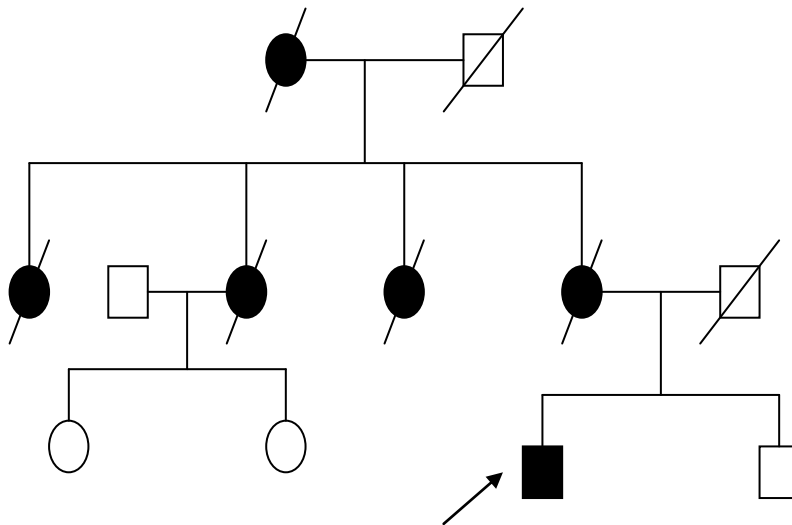
КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БЪЛГАРСКА ФАМИЛИЯ С АД ФОРМА НА НСП ОТ С. ИСКРЕЦ (СЕМЕЙСТВО 8)

Основните фенотипните характеристики на семейство 8 са представени на таблица 10

Таблица 10 Фенотипни характеристики на семейство 8

Възраст/Пол	Възраст при дебюта	Фенотип	SPRS	Степен на инвалидизация
51/М	35	Чист ТР императивност МРТ – нормален образ	19/52	3

Родословно дърво на семейство 8



Отношението на тежестта на заболяването отнесено към средната продължителност на симптомите е представена на таблица 11.

Таблица 11 Зависимост на степента на инвалидизация от средната продължителност на заболяването

Степен на инвалидизация	Брой пациенти	Средна продължителност на заболяването
1. (Липсва спастичност или много лека спастичност в долни крайници)	0	
2. (Умерено изразена спастичност при ходене)	2	2 год.
3. (Бягането е невъзможно, запазена способност за самостоятелно ходене)	1	16 год
4. (Ходене с помощни средства)	2	9.5 год
5. (Инвалидна количка)	0	

Двама пациенти от семействата с делеции са достигнали до необходимост от употреба на помощно средство при придвижване. Те принадлежат към семейства с късна изява на началните симптоми. Тук корелация по отношение на темповете на прогресия между семействата с ранно и късно начало не може да бъде представена, тъй като пациентът от семейството с ранно начало (семейство 6) има едва 2-годишна еволюция на заболяването и степен на инвалидизация 2. Ясно е маркирана обаче тенденцията за по-бърза еволюция на симптомите при болни с късен дебют.

Вероятно именно поради факта, че се сравняват семейства с късно начало, а и поради малкия брой пациенти, не се оформя добре и ясната тенденция за нарастване тежестта на заболяването с неговата продължителност.

III.2.4 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА СЕМЕЙСТВОТА С ЕДИНИЧНИ НУКЛЕОТИДНИ ЗАМЕНИ, ВОДЕЩИ ДО ВЪЗНИКВАНЕ НА СТОП КОДОН

Тези мутации представляват 13.6% от всички, установени при нашето изследване мутации. Те се откриват при 3 семейства (семейство 17, семейство 19, семейство 20). Представителите на 1 от семействата определят себе си като българомохамедани, а останалите 2 семейства имат български произход. И в трите семейства е налице фамилна история на заболяването и автозомно-доминантен тип на унаследяване. Две семейства имат чиста фенотипна изява (семейство 19, семейство 20), а семейство 17 има комплициран с епилепсия фенотип.

Ранно начало демонстрира едно семейство (семейство 17), а при семейства 19 и 20 се открива късна изява на първите симптоми. Семейства 17 и 19 имат един и същи тип мутация и произхождат от община Девин на Смолянска област. Независимо, че между тях не бе установена роднинска връзка, бихме могли да предположим съществуването на общ предшественик, носител на мутацията.

Присъствието на антиципация може да се обсъжда в едно семейство (семейство 19). Средната възраст на изява на симптомите сред пациентите е 29.5 години.

Представяме генеалогичните и фенотипни данни на българомохамеданска фамилия с единична нуклеотидна замяна, водеща до възникване на стоп-кодон.

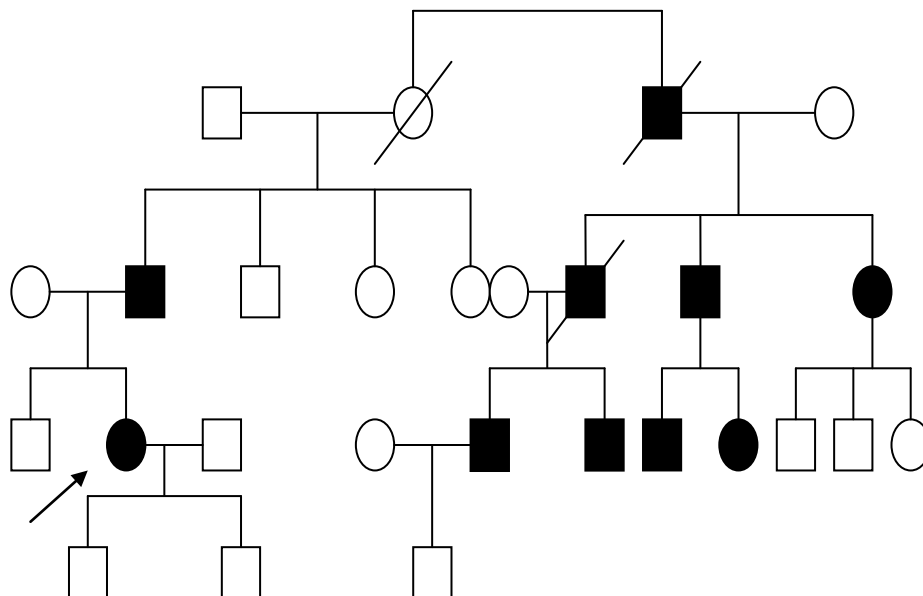
**КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БЪЛГАРОМОХАМЕДАНСКА
ФАМИЛИЯ С АД ФОРМА НА НСП ОТ С. ЛЯСКОВО (СЕМЕЙСТВО 17)**

Основните фенотипните характеристики на семейство 17 са представени на таблица 12

Таблица 12 Фенотипни характеристики на семейство 17

Възраст/Пол	Възраст при дебюта	Фенотип	SPRS	Степен на инвалидизация
36/М	30	Чист Хиперрефлексия в горни крайници	16/52	2
32/Ж	13	Комплициран Епилепсия с ГТКП МРТ – неспецифични лезии в бялото мозъчно вещество	21/52	3

Родословно дърво на семейство 17



На таблица 13 е представено взаимоотношението между степента на инвалидизация и средната продължителност на заболяването. Тежестта на болестта нараства с удължаване на средната му продължителност, което е видно при пациентите със степени на инвалидност 2 и 3. Степен на инвалидизация 4 е достигната само от един пациент и той е късно начало на заболяването, така че сравнение между ранните и късни форми не може да бъде направено. От друга страна се потвърждава схващането, че късния дебют на заболяването е свързан с много по-бърза еволюция на симптомите.

Таблица 13 Зависимост на степента на инвалидизация от средната продължителност на заболяването

Степен на инвалидизация	Брой пациенти	Средна продължителност на заболяването
1. (Липсва спастичност или много лека спастичност в долни крайници)	0	
2. (Умерено изразена спастичност при ходене)	1	6 год.
3. (Бягането е невъзможно, запазена способност за самостоятелно ходене)	2	9.5 год
4. (Ходене с помощни средства)	1	7 год
5. (Инвалидна количка)	0	

III.2.5 СРАВНИТЕЛНО ПРЕДСТАВЯНЕ НА СЕМЕЙСТВАТА С РАЗЛИЧНИ ТИПОВЕ МУТАЦИИ В СПАСТИНОВИЯ ГЕН

Според процентното разпределение на диагностицираните в нашето изследване мутации в спастиновия ген: погрешносмислените мутации са 40.9%, сплайс-сайт мутациите са 22.7%, делециите са 18%, единичните нуклеотидни замени, водещи до възникване на стоп кодон са 13.6%, дубликациите са 4.5%.

На таблица 14 е показано обобщено представяне на семействата според типа на мутацията в спастиновия ген

Таблица 14 Обобщени данни за семействата според типа мутация в спастиновия ген

Мутации	Брой семейства	Фенотип Чист/Комплициран	Начало Ранно/Късно	Средна възраст на първите симптоми	Тежест/Средна продължителност на заболяването, изискваща ходене с помощни средства
Погрешносмислени	9	8/1	4/5	27.1	18.3
Сплайс-сайт	5	5/0	2/3	34.3	15.3
Делеции	4	4/0	1/3	32.8	9.5
Единични нуклеотидни замени, водещи до стоп кодон	3	2/1	1/2	29.5	7
Дубликации	1	1/0	1/0	28	-

Късна фенотипна изява имат 13 семейства (59.09%). Ранно начало имат 9 семейства (40.9%). Това наблюдение е в съответствие с голямото проучване на семейства с мутации в спастиновия ген, при което са проследени 238 болни, проведено през 2000 г. (Fonknechten и сътр.) В това проучване се посочва, че е време да се ревизира схващането, че мутациите в спастиновия ген водят до заболяване с предимно късна фенотипна изява, тъй като 40% от болните имат първи симптоми на възраст преди 35 години. То установява, че процентът на погрешносмислените мутации сред всички мутации в спастиновия ген е 28% и не открива съществени разлики по отношение на средна начална възраст, тежест и прогресия на заболяването в сравнение с останалите типове мутации.

В българската група пациенти процентът на погрешносмислените мутации е по-голям – 40.9% и се създава впечатление за по-ранна средна възраст на първите прояви – 27.1 г., сравнено с останалите типове мутации. Същевременно средната продължителност на заболяването, при която се явява необходимост от използване на помощни средства е 18.3 години. Наблюдението потвърждава, че формите с ранно начало прогресират по-бавно и съответно еволюцията на заболяването до достигане на момент, в който се явява необходимост от употреба на помощни средства е по-дълга.

Делециите в спастиновия ген са изследвани в друго мащабно проучване, осъществено от Derienne през 2006. В него се установява 20%-на честота на делециите сред всички мутации в спастиновия ген. Не са открити глобални различия, сравнено с клиничната изява при пациентите с други типове мутации. Изказано е впечатление за сравнително по-ранна възраст на първите симптоми в сравнение с останалите типове мутации.

В нашето изследване делециите представляват 18% от всички установени мутации, което е твърде близко до съобщеното в литературата число. Средната възраст на началните симптоми е 32.8 години. Последното наблюдение в нашата група пациенти не потвърждава тезата за по-ранна фенотипна изява при този тип мутации. Средната продължителност на заболяването, при която се явява необходимост от използване на помощни средства е 9.5 години.

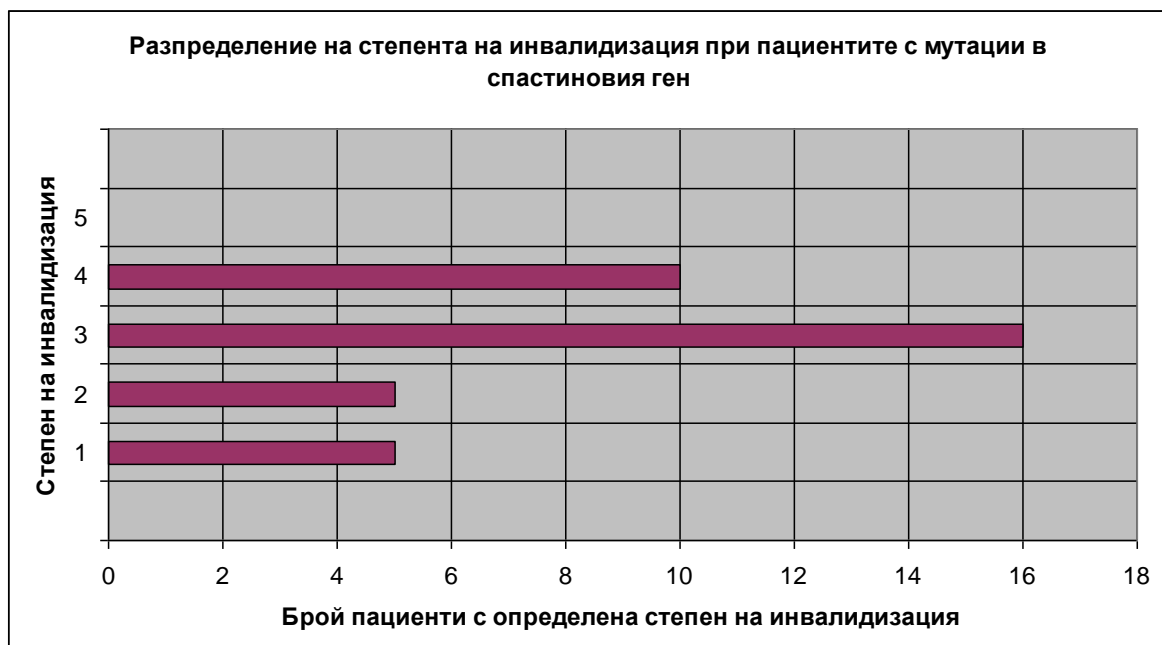
В проведеното от нас изследване най-ранна средна възраст на начало на заболяването се открива при погрешносмислените мутации. Съответно и еволюцията на заболяването при тях е най-продължителна. Най-късна начална възраст на дебюта се открива при сплайс-сайт мутациите и съответно средната продължителност на заболяването до момента на използване на помощни средства е по-кратка. По отношение на делециите и единичните нуклеотидни замени, то те показват висока начална възраст и съответно темповете на инвалидизация при тях са по-бързи. Все пак сравнявания контингент болни е твърде малък, за да се направят категорични заключения относно поведението на различните типове мутации в спастиновия ген.

От друга страна сравнението между пациентите с ранно и късно начало на болестта при семействата, носители на погрешносмислени и сплайс-сайт мутации недвусмислено говори, че късният дебют е свързан с по-интензивна прогресия и по-бързо достигане на високи степени на инвалидизация.

Оценено в глобален мащаб не се установяват съществени различия във фенотипната изява при болните, носители на различни типове мутации в спастиновия ген. При всички пациенти е налице ядрото на синдрома, изявено с хиперрефлексия, спастичност и патологични рефлексии в долни крайници. Останалите често срещани симптоми като лека слабост в долни крайници, хиперрефлексия в горни крайници, тазоворезервоарна императивност, намален вибрационен усет в долни крайници, сколиоза и *pes cavus* са разнообразно изразени при семействата с различни мутации. Съществуват подчертана вариабилност, както между отделните семейства, така и между представителите на една и съща фамилия.

Степента на инвалидизация при пациентите със спастинови мутации варира от първа до четвърта по 5-степенната скала и е представена на фигура 1

Фигура 1 Разпределение на степента на инвалидизация при пациентите с мутации в спастиновия ген



Погледнато през призмата на етническата принадлежност на отделните семейства, обаче правят впечатление известни различия във фенотипните характеристики на отделните етнически групи. Независимо дали имат ранно или късно начало българските семейства се представят като цяло с по-лек фенотип, първите

симптоми на болестта се явяват между II и V декада от живота, а средната възраст, при която е необходимо подпомагане при движение е 49.3 години. При ромското семейство (3) е налице най-тежък фенотип с начало на заболяването в първа декада от живота – между 2- и 7-годишна възраст. Във второто поколение пациентите прохождат на по-късна възраст и походката никога не е била нормална. В първото поколение е налице необходимост от използване на помощни средства на средна възраст 40 години. В турската фамилия (2) началото на заболяването е в I-II декада от живота – между 5- и 14-годишна възраст. Необходимост от непостоянно използване на помощни средства се явява на средна възраст 34 години. В семейството е налице комплициран с когнитивен дефицит фенотип. В българомохамеданското семейство (17) се наблюдава ранно начало с дебют на оплакванията във II-III декада от живота, между 13- и 30-годишна възраст. Способността за самостоятелно придвижване е съхранена, но фенотипа е комплициран с епилепсия с генерализирани тонично-клонични пристъпи.

От направеното изложение могат да се изведат следните заключения:

1. НСП тип 4 не трябва повече да се разглежда като форма с предимно късно начало, тъй като 40% от семействата се отнасят към I тип според класификацията на Harding.
2. Преобладаващият брой семейства имат чист фенотип, но наред с тях се откриват и фамилии с комплицирана клинична изява.
3. Отделните съпътстващи симптоми и асоциирани белези са вариабилно проявени сред семействата, носители на различни мутации и съществува голямо разнообразие, както вътре, така и между отделните семейства
4. Семействата с късно начало имат по-бърза еволюция и за по-кратко време достигат висока степен на инвалидизация.
5. По-дългата еволюция на заболяването показва преки линейни взаимоотношения с нарастване тежестта на симптоматиката
6. Антиципация се установява в 45% от семействата
7. Съществуват асимптомни пациенти, носители на мутация в спастиновия ген.
8. Мултиетническият социален спектър на българското общество позволява да се направи сравнение между фенотипните прояви при българските, ромските, турското и българомохамеданското семейства:
 - a. Българските семейства имат най-лек клиничен фенотип със средна възраст на необходимостта от използване на помощни средства на възраст 49.3 години;
 - b. Ромското семейство има най-тежък клиничен фенотип с най-ранна изява и необходимостта от използване на помощни средства на възраст 40 години.
 - c. Турското семейство има изява във I-II декада от живота, но комплициран с когнитивен дефицит фенотип и необходимостта от използване на помощни средства на възраст 34 години

III.3 ГЕНЕТИЧНО ВЕРИФИЦИРАНИ СЕМЕЙСТВА С АВТОЗОМНО-ДОМИНАНТНА НАСЛЕДСТВЕНА СПАСТИЧНА ПАРАПАРЕЗА, ДЪЛЖАЩА СЕ НА МУТАЦИИ В АТЛАСТИНОВИЯ ГЕН

III.3.1 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА СЕМЕЙСТВАТА С АТЛАСТИНОВИ МУТАЦИИ

От всички пациенти, насочени към нашия център за изследване, 25 бяха подложени на генетичен скрининг за мутации в атластиновия ген.

Опорни пунктове на клиничната диагноза бяха:

1. Клинична картина с двустранно пирамидно засягане в долни крайници, включващо хиперрефлексия, спастичност и патологични рефлексии в долни крайници;
2. Неврологично изследване, потвърждаващо пирамидната увреда в долни крайници, включително оценка според Скалата за оценка на спастичната парапареза, скалите на Walton и Ashworth и 5-степенната скала за оценка степента на инвалидизация
3. Модел на унаследяване, съответстващ на автозомно-доминантна НСП
4. Ранна клинична изява на симптомите
5. Сравнително агресивна начална прогресия, последвана от известно стационариране
6. Липса на тазоворезервоарни и сетивни смущения
7. Фамилна история на заболяването с подробен генеалогичен анализ и изключване на друга причина за спастична парапареза;
8. Насочване за молекулярно-генетично изследване

При секвенационния анализ на атластиновия ген при изследваните пациенти бяха установени 2 молекулни дефекта L250P и G482V при общо 11 болни. От тях 7 са мъже и 4 са жени. Носителство на мутация L250P бе установено при 6 представители на голямо ромско семейство (23). Мутация G482V се установи при 5 индивида от семейство с български етнически произход. Двете мутации са погрешносмислени. Обобщени данни за установените мутации са представени на таблица 15

Таблица 15 Обобщени данни за семействата с атластинови мутации

Семейство/ Пациент	Нуклеотидна замяна	Амино киселинна замяна	Тип на мутацията	Локали Зация в гена	Тип на унасле дяване	Етническа принад лежност	Съобща на за първи път
23-1 23-2 23-3 23-4 23-5 23-8	c.749T>C	L250P	Погрешно смислена	Екзон 8	АД	Ромска	Иванова и сътр., 2006
24-1 24-2 24-3 24-4 24-8	c.1445G>T	G482V	Погрешно смислена	Екзон 12	АД	Българска	Иванова и сътр., 2006

Обобщените фенотипни данни за семействата с атластинови мутации са представени на таблица 16

Брой пациенти; Мъже/Жени	11; 7/14
Средна възраст при началните симптоми (години)	4.3 (SD 4.10; граници 1.5-9)
Средна продължителност на заболяването (години)	25.1 (SD 17.9; граници 4-60)
Средна възраст, при която самостоятелното придвижване става невъзможно (години)	16 (граници 10-19)
Фамилна история	(11); 100%
Чист фенотип	1; (50%)
Комплициран фенотип	1; (50%)
Антиципация	1; (50%)
Самостоятелно придвижване	1/11; (9.1%)
Затруднено, но без помощни средства	6/11; (54.5%)
Използване на помощни средства	4/11; (36.4%)
Смутен вибрационен усет в долни крайници	0/11
Тазоворезервоарни смущения	0/11
Когнитивни смущения	0/11

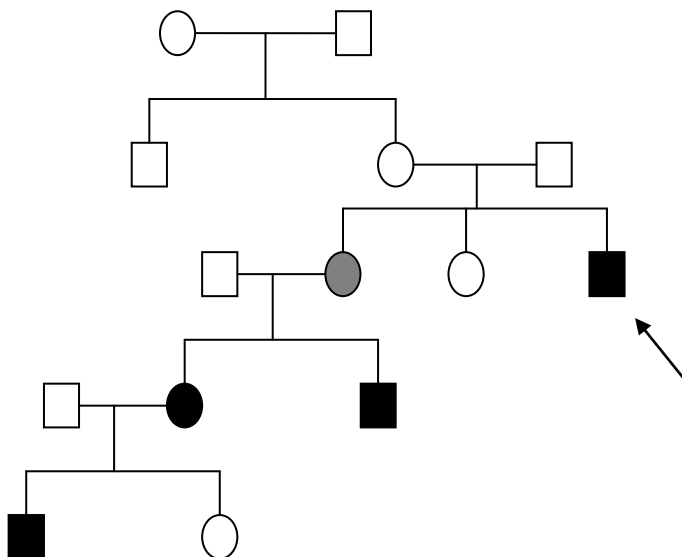
КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БЪЛГАРСКА ФАМИЛИЯ С АД ФОРМА НА НСП ОТ ГР. СОФИЯ (СЕМЕЙСТВО 24)

Основните фенотипните характеристики на семейство 24 са представени на таблица 17

Таблица 17 Фенотипни характеристики на семейство 24

Възраст/Пол	Възраст при дебюта	Фенотип	SPRS	Степен на инвалидизация
63/Ж	9	Асимптомна	0/52	1
32/Ж	2	Чист Хиперрефлексия в горни крайници	22/52	4
34/М	3	Комплициран Епилепсия Хиперрефлексия и слабост в горни крайници	22/52	4
12/М	1.5	Чист	13/52	3
61/М	9	Чист Хиперрефлексия в горни крайници	23/52	4

Родословно дърво на семейство 24



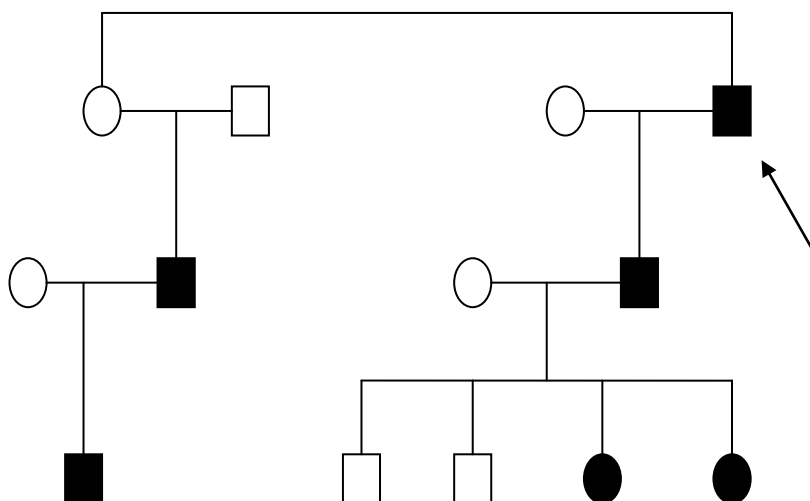
КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА РОМСКА ФАМИЛИЯ С АД ФОРМА НА НСП ОТ ГР. БОТЕВГРАД (СЕМЕЙСТВО 23)

Основните фенотипните характеристики на семейство 23 са представени на таблица 18

Таблица 18 Фенотипни характеристики на семейство 23

Възраст/Пол	Възраст при дебюта	Фенотип	SPRS	Степен на инвалидизация
70/М	Детска възраст	Чист	14/52	3
34/М	Детска възраст	Чист	11/52	2
36/М	Детска възраст	Чист	15/52	3
12/Ж	6	Чист	17/52	3
10/Ж	6	Чист	14/52	3
15/М	2	Чист Хиперрефлексия в горни крайници	19/52	4

Родословно дърво на семейство 23



III.3.2 ОБОБЩЕНИ ДАННИ ЗА СЕМЕЙСТВАТА С МУТАЦИИ В АТЛАСТИНОВИЯ ГЕН

Представяме 11 пациента, носители на атластинови мутации, които произхождат от 2 големи семейства. И двете установени мутации са погрешносмислени, което съответства на литературните данни, че това е преобладаващия тип мутации, установени в този ген. Ромската фамилия има чиста фенотипна изява, а при българското семейство се наблюдава комплициран с епилепсия фенотип. При двете семейства се установява ранно начало на заболяването. В българското семейство би могло да се обсъжда присъствие на антиципация. Средната начална възраст на симптомите в двете семейства е 4.3 години.

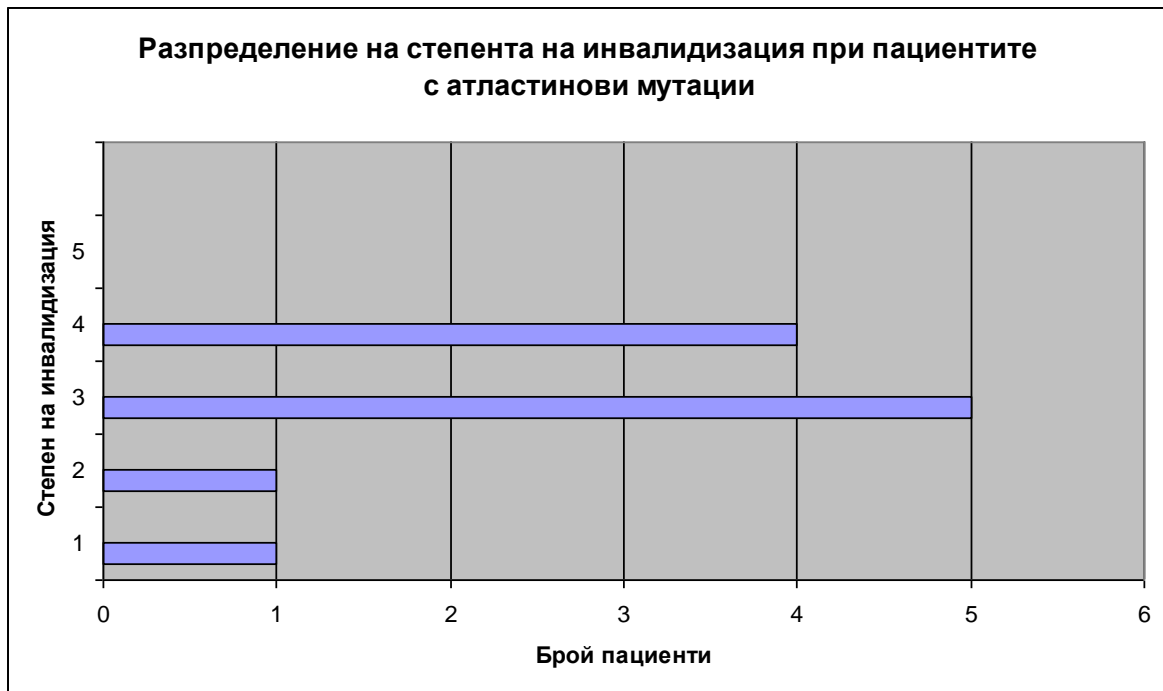
Разпределението на средната възраст на началните симптоми е представено на фигура 2.

Фигура 2 Разпределение на възрастта на началните симптоми при пациентите с мутации в атластиновия ген



Средната продължителност на заболяването е 25.1 години. Средната възраст, на която пациентите се нуждаят от помощно средство при ходене е 16 години. Наред с пациентите с тежка фенотипна изява и ранно инвалидизиране се наблюдават и пациенти с по-лека клинична картина, които въпреки ранното начало запазват способностите си да се придвижват самостоятелно придвижване до напреднала възраст. Един от пациентите е асимптомен носител на мутацията. Така 54.5% от болните имат трудности при ходене, но се движат самостоятелно, докато до употреба на помощно средство прибягват 36.4%. Разпределението на пациентите според степента на инвалидизация, оценена по 5-степенната скала е представено на фигура 3.

Фигура 3 Разпределение на степента на инвалидизация при пациентите с мутации в атластиновия ген



Статистическите данни по отношение на задължителните симптоми на заболяването сочат, че 90.9% от болните имат спастичност в долни крайници, 100% имат оживени СНР в краката, 90.9% имат двустранен патологичен рефлекс на Бабински. От често срещаните съпътстващи симптоми хиперрефлексия в горни крайници се установява при 45.5%, а пареза в долни крайници имат 45.5%; Парезата в горни крайници като рядко срещан съпътстващ симптом се открива при 1 болен (9%). Всички пациенти имат съхранени когнитивни, сетивни и тазоворезервоарни функции. При никой не се открива ангажиране на ЧМН, сколиоза или pes cavus.

III.3.3 СРАВНИТЕЛНО ПРЕДСТАВЯНЕ НА СЕМЕЙСТВАТА С АТЛАСТИНОВИ МУТАЦИИ

На таблици 19 и 20 са представени сравнителните характеристики на семействата по отношение на интервала от време, при който определен брой пациенти достигат дадена степен на инвалидизация.

Таблица 19 Зависимост на степента на инвалидизация от средната продължителност на заболяването при семейство 23

Степен на инвалидизация	Брой пациенти	Средна продължителност на заболяването
1 (Липсва спастичност или много лека спастичност в долни крайници)	0	
2. (Умерено изразена спастичност при ходене)	1	20 год.
3. (Бягането е невъзможно, запазена способност за самостоятелно ходене)	4	23.8 год
4. (Ходене с помощни средства)	1	10 год
5. (Инвалидна количка)	0	

Таблица 20 Зависимост на степента на инвалидизация от средната продължителност на заболяването при семейство 24

Степен на инвалидизация	Брой пациенти	Средна продължителност на заболяването
1 (Липсва спастичност или много лека спастичност в долни крайници)	1	Над 60 години
2. (Умерено изразена спастичност при ходене)	0	
3. (Бягането е невъзможно, запазена способност за самостоятелно ходене)	1	10 год
4. (Ходене с помощни средства)	3	17 год
5. (Инвалидна количка)	0	

От таблиците става ясно, че макар и чист фенотипът на ромската фамилия е по-тежък, отчетено според средната продължителност на заболяването, при която се явява нужда от употреба на помощни средства при ходене. Инвалидизация степен 4 в ромското семейство настъпва през I декада от живота, след средно 10 годишна

еволюция на заболяването. В българското семейство същата степен на инвалидизация се достига след 17 годишна еволюция и настъпва през II декада от живота. Същевременно клиничната картина в българското семейство показва комплициран с епилепсия характер. Тежестта на симптоматиката показва известна поляризация като наред с това, че се наблюдават по-голям брой пациенти, нуждаещи се от употреба на помощни средства при ходене, съществуват и асимптомни носители на мутацията.

От направеното изложение могат да бъдат направени следните изводи:

1. За мутациите в атластиновия ген е характерна ранна фенотипна изява на симптомите, начална бърза прогресия, последвана от стационаране
2. Наред с чистите форми се откриват и такива с комплициран фенотип
3. Съществуват фенотипни вариации като наред с тежко инвалидизираните болни съществуват и такива със съхранена възможност за самостоятелно придвижване в късна възраст
4. Част от болните са асимптомни носители
5. Не се откриват когнитивни, сетивни и тазоворезервоарни смущения
6. Не се открива ангажиране на ЧМН
7. В част от семействата може да се обсъжда присъствие на антиципация
8. Съществуват различия в клиничното протичане на заболяването при българското и ромско семейства:

-за ромското семейство е характерен по-тежък фенотип с достигане на висока инвалидизация, не позволяваща самостоятелно придвижване през I декада от живота

-в българското семейство независимо от по-големия брой тежко инвалидизирани болни, необходимост от употреба на помощни средства се явява през II декада от живота

III.4 СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА СЕМЕЙСТВОТА С МУТАЦИИ В ГЕНИТЕ, КОДИРАЩИ СПАСТИН И АТЛАСТИН

Прилики

1. При двата типа мутации се откриват семейства с чисти и комплицирани форми.
2. При двете сравнявани групи семейства се установява антиципация
3. Отделните симптоми и белези, представляващи задължителни характеристики на заболяването като спастичност, хиперрефлексия в долни крайници и патологични рефлексии присъстват еднакво проявени при двата контингента болни
4. Съпътстващите и често срещани синдроми са налице и в двете групи и са разнообразно проявени
5. Пациентите със съхранено самостоятелно придвижване и със затруднено, но неизискващо използване на помощни средства в двете групи са приблизително еднакво разпределени
6. В двете кохорти пациенти се установяват асимптомни носители на съответната мутация

Разлики

1. Средната възраст на началните симптоми е значително по-ранна при атластиновата група – 4.3 г., срещу 30.2 г. при СПАСТ-позитивните болни
2. Значително по-големи вариации в началната възраст на изява в спастиновата група - граници 2 г.- 65 г., срещу позитивната за атластинови мутации група граници 1.5 г. – 9 г.
3. Средната продължителност на заболяването също показва съществени различия като е значително по-голяма и с по-големи вариации в атластиновата група - 25.1 г. (граници 4-60) в сравнение със спастиновата 13.71 г. (граници 1-35)
4. Средната възраст, при която пациентите се принуждават да използват помощни средства също показва значими различия като е многократно по-ранна при болните с мутации в атластиновия ген - 16 години с вариации 10 г. – 19 г. При пациентите с мутации в спастиновия ген тези характеристики имат следния числов израз - 43.4 години с вариации 34 г. – 59 г.
5. При пациентите с атластинови мутации не се откриват смущения в сетивните, когнитивните и тазоворезервоарните функции
6. Никой от болните с атластинови мутации няма ангажиране на ЧМН
7. При болните с атластинови мутации не са установени сколиоза и пес кавус

III.5 ГЕНЕТИЧНО ВЕРИФИЦИРАНИ СЕМЕЙСТВА С АВТОЗОМНО-РЕЦЕСИВНА НАСЛЕДСТВЕНА СПАСТИЧНА ПАРАПАРЕЗА, ДЪЛЖАЩА СЕ НА МУТАЦИИ В СПАТАКСИНОВИЯ ГЕН

От пациентите с НСП, проследени и изследвани от нашия екип за генетичен скрининг за мутации в спатаксиновия ген бяха насочени 5 болни. Мутация Arg594Thr в хомозиготно състояние в спатаксиновия ген беше установена при 2 болни, произхождащи от едно семейство.

На таблица 21 са представени данни за откритата мутация

Таблица 21 Обобщени данни за семейството с мутация в спатаксиновия ген

Семейство/ Пациент	Нуклеотидна замяна	Аминокисел ин на замяна	Тип на мутацията	Локализация в гена	Тип на унаследяван	Етническа принадлеж ност
25-1 25-3	c.2834G>C p.Arg945Thr	Arg594Thr	Сплайс- сайт	Екзон 15	АР	Българомохамедани

Опорни пунктове за клиничната диагностика бяха:

1. Клинична картина с двустранно пирамидно засягане в долни крайници, включващо хиперрефлексия, спастичност и патологични рефлексии в долни крайници;
2. Неврологично изследване, потвърждаващо пирамидната увреда в долни крайници, включително оценка според Скалата за оценка на спастичната парапареза, 5-степенната скала за оценка степента на инвалидизация, скалите на Walton и Ashworth и Скалата за откриване и оценка на атаксията
3. Модел на унаследяване, съответстващ на автозомно-рецесивна НСП
4. Ранна клинична изява на симптомите – I-II декада от живота
5. Първоначално нормално развитие, последвано от сравнително бързо прогресираща спастична парапареза с достигане на висока степен на инвалидизация за няколко години
6. Присъствие на когнитивни смущения, сензомоторна полиневропатия и евентуално наличие на екстрапирамидни прояви, церебеларна атаксия и епилептични припадъци
МРТ на главен мозък, визуализиращ изтъняване на корпус калозум, симетрични перивентрикуларни лезии в бялото вещество, а на по-късен етап и фронтална корова атрофия
7. Фамилна история на заболяването с подробен генеалогичен анализ и изключване на друга причина за спастична парапареза
8. Насочване за молекулярно-генетично изследване

III.5.1 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА СЕМЕЙСТВАТА С МУТАЦИИ В СПАТАКСИНОВИЯ ГЕН

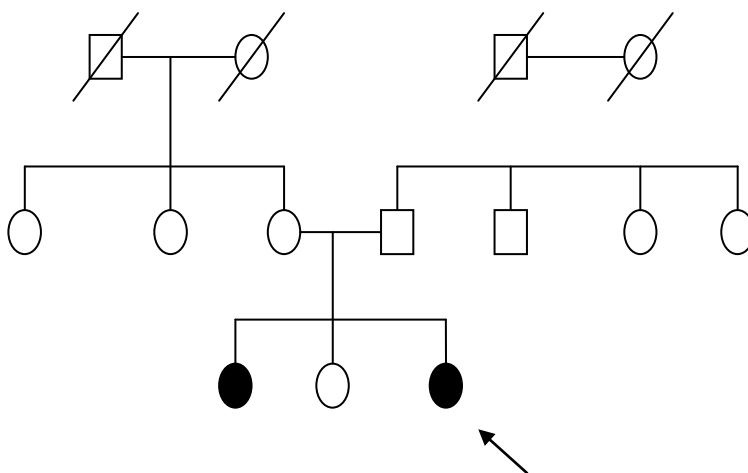
КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БЪЛГАРОМОХАМЕДАНСКА ФАМИЛИЯ С АВТОЗОМНО-РЕЦЕСИВНА ФОРМА НА НСП ОТ С. ЗАГРАЖДЕН (СЕМЕЙСТВО 25)

Основните фенотипните характеристики на семейство 25 са представени на таблица 22

Таблица 22 Фенотипни характеристики на семейство 25

Възраст/Пол	Възраст при дебюта	Фенотип	SPRS	SARA	Степен на инвалидизация
32/Ж	21	Комплициран Панцеребеларен, Полиневропатен и Псевдобулбарен синдроми; Когнитивен дефицит; Хипотрофия на тенара двустранно МРТ-хипоплазия на корпус калозум, хипотрофия на цервикален миелон, неспецифични лезии в бялото вещество	26/52	14/30	4
31/Ж	17	Комплициран Панцеребеларен синдром	31/52	19/30	5

Родословно дърво на семейство 25



III.5.2 ОБОБЩЕНИ ДАННИ ЗА ПАЦИЕНТИТЕ С МУТАЦИИ В ГЕНА, КОДИРАЩ СПАТАКСИН

Представяме две пациентки, произхождащи от едно семейство с мутация в гена, кодиращ спатаксин. Средната възраст на началните симптоми е 19 години. Средната продължителност на заболяването е 8 години, а средната възраст, на която губят възможност за самостоятелно придвижване е 21 години като една от болните е на инвалиден стол след 13-годишна еволюция на заболяването. И при двете пациентки са налице основните характеристики на заболяването, проявени със спастичност, хиперрефлексия и патологични рефлексии. Честите съпътстващи симптоми – пареза в долни крайници и хиперрефлексия в горни крайници се откриват и при двете пациентки. При едната от тях са налице и тазоворезервоарни прояви. Към рядко срещаните съпътстващи прояви се отнася дисталната мускулна хипотрофия, която се открива при една от пациентките. Двете пациентки имат добре изразен панцеребеларен синдром и скандирана дизартрия. Полиневритна симптоматика се установява при една от болните. Хипотрофия на корпус калозум и неспецифични лезии в бялото вещество на главния мозък, супра- и инфратенториално се откриват при една от болните. Фронтална корова атрофия е открита при една от изследваните пациентки, при която се установява и умерено изразено когнитивно нарушение.

На таблица 23 са представени сравнителните характеристики на семейството по отношение на интервала от време, след който пациентите достигат определена степен на инвалидизация.

Таблица 23 Зависимост на степента на инвалидизация от средната продължителност на заболяването при семейство 25

Степен на инвалидизация	Брой пациенти	Средна продължителност на заболяването
1 (Липсва спастичност или много лека спастичност в долни крайници)	0	
2. (Умерено изразена спастичност при ходене)	0	
3. (Бягането е невъзможно, запазена способност за самостоятелно ходене)	0	
4. (Ходене с помощни средства)	1	2 год
5. (Инвалидна количка)	1	13 год.

Данните от таблицата демонстрират, че НСП 11 е бързо прогресираща и тежко инвалидизираща форма на заболяването като при един пациент се явява необходимост от използване на помощни средства за придвижване само 2 години след клиничния дебют на заболяването, а другият пациент е на инвалидна количка след 13 годишна еволюция на болестта. Зависимостта на степента на инвалидизация, определена според 5-степенната скала, от продължителността на развитие на заболяването е представена на фигура 4

Фигура 4 Зависимост на степента на инвалидизация от продължителността на заболяването



От направеното дотук изложение могат да бъдат изведени следните заключения:

1. Болните с мутации в спатаксиновия ген имат първоначално нормално развитие
2. За НСП 11 формата на заболяването е характерно ранно начало – през I-II декада от живота
3. Типична е бърза прогресия с ранно достигане на висока степен на инвалидизация – 8-9 години след началото на заболяването
4. Наред с фамилните се откриват и спорадични случаи
5. При част от семействата се наблюдава кръвно родство
6. Не са описани асимптомни носители на мутация в гена, кодиращ спатаксин
7. Всички пациенти имат двустранно засягане на кортикоспиналните пътища с първоначални прояви в долни крайници, които остават по-тежко засегнати, въпреки че на по-късен етап се обхващат и ръцете
8. Тази форма на заболяването има комплициран характер като моторните прояви се съпътстват от когнитивни смущения, церебеларна атаксия и евентуално полиневропатия с елементи на сегментна демиелинизация и аксонална загуба, дистална хипотрофия на малките мускули на ръцете и краката, екстрапирамидни симптоми и епилептични пристъпи
9. Типичен е лек до умерен когнитивен спад, който следва в развитието си моторните симптоми, но може да бъде и първа изява на заболяването
10. Когнитивните смущения се свързват основно с постепенно разгръщащата се фронтална корова атрофия
11. Скандираната дизартрия може да е ранен симптом или да се яви на по-късен етап с прогресията на заболяването
12. Типична черта при невроизобразяването е хипоплазията на корпус калозум с прогресиращ във времето характер, неспецифични хиперинтензни лезии в бялото мозъчно вещество и фронталната корова атрофия, явяваща се на по-късен етап
13. Част от болните имат хипотрофия на малките мускули на крайниците
14. Честотата на допълнителните симптоми като тазоворезервоарна дисфункция нараства с прогресията на болестта

III.6 ГЕНЕТИЧНО ВЕРИФИЦИРАНИ СЕМЕЙСТВА С АВТОЗОМНО-РЕЦЕСИВНА НАСЛЕДСТВЕНА СПАСТИЧНА ПАРАПАРЕЗА, ДЪЛЖАЩА СЕ НА МУТАЦИИ В ПАРАПЛЕГИНОВИЯ ГЕН

От всички 140 семейства за мутация в параплегиновия ген са изследвани 40 фамилии и съответно произхождащите от тях 190 болни. От тези 40 фамилии с турски произход са 3 (12 изследвани индивида), с български произход са 8 (10 изследвани индивида), 1 е с българомохамедански (1 изследван индивид) и с ромски произход са 28 (167 изследвани индивида).

От изследваният контингент болни мутация в параплегиновия ген беше установена при 72 пациента, произхождащи от 7 семейства. Всички семейства са с ромски етнически произход. Мутации в параплегиновия ген не бяха установени при българските и турски фамилии. Особен интерес представлява фактът, че във всички случаи се касае за една и съща мутация в гена, кодиращ параплегин, а именно p.L78X. В хомозиготно състояние тя е открита при 19 пациенти, а в хетерозиготно при 53 представители на изследваните фамилии. Изненадващо и за самия изследователски екип бе, че мутацията бе установена при 48 представители на едно и също ромско семейство. При 11 болни тя е в хомозиготно състояние, а 37 индивида са нейни хетерозиготни носители. По своя характер мутация p.L78X е безсмислена и се разполага в екзон 2 на параплегиновия ген. Описана е за първи път от Arnoldi през 2008 г.

Обобщени данни за хомозиготните носители на мутацията са представени на таблица 25

Таблица 25 Обобщени данни за хомозиготните носители на мутация p.L78X в параплегиновия ген

Семейство/ Пациент	Нуклеотидна замяна	Амино киселинна замяна	Тип на мутацията	Локализация В гена	Тип на унаследяван е	Етническа принадлеж ност	Съобщена за първи път
26-III.4	c.233T>A	p.L78X	Безсмислена	Екзон 2	АР	Ромска	Arnoldi и сътр., 2008
26-III.12							
26-IV.1							
26-IV.9							
26-IV.10							
26-IV.13							
26-IV.20							
26-IV.24							
26-V.11							
26-V.18							
26-V.20							
27-IV.3							
28-II.1							
28-II.2							
29-II.1							
30-II.1							
30-II.2							
30-II.3							
31-III.1							

Мутация р.L78X в нашето изследване е открита при 72 представители на 7 ромски фамилии. В седемте семейства е налице фамилна история на заболяването. Сред хомозиготните пациенти 10 са от мъжки, а 9 са от женски пол. Средната възраст на началните симптоми е 37 години. Средната продължителност на заболяването е 10 години. Мутацията бе открита при 11 болни в хомозиготно състояние в голямо ромско семейство (26). В останалите по-малки семейства броят на хомозиготните носители е съответно: 1 (семейство 27), 2-ма (семейство 28), 1 (семейство 29), 3-ма (семейство 30) и 1 (семейство 31). В семейство 26 мутацията е установена в хетерозиготно състояние при 37 души. В 3 от обсъжданите по-малки родословия бяха верифицирани и хетерозиготни носители на мутацията, съответно: 8 в семейство 27, 4 в семейство 29 и 1 в семейство 31. В семейство 32 бяха открити 3 хетерозиготни носители, двама от които с категорична разгърната клинична картина. В последната фамилия е налице засягане на баща и дъщеря, което навежда на мисълта за възможен автозомно-доминантен модел на унаследяване.

За уточняване типът на унаследяване нашият екип реши да изследва максимално хомогенна в етнически и битов аспект популация пациенти, изложени на влиянието на приблизително еднакви фактори на средата. Пациентите бяха прегледани от две независими групи невролози. За засегнати бяха приемани индивидите, при които освен хиперрефлексия в долни крайници, бе налице поне един от следните симптоми и белези: спастично повишен мускулен тонус, слабост и патологични рефлексии. От всеки индивид бе събирана подробна медицинска анамнеза за началното психомоторно развитие, възраст при поява на първите двигателни симптоми, начална възраст на дебют на церебеларната симптоматика и прогресия на заболяването. За внимателно фенотипизиране бяха използвани Скалата за оценка на спастичната парапареза (Schule и сътр., 2006), Скалата за откриване и оценка на атаксията (Schmitz-Hübisch T и сътр., 2006) и 5-степенната скала за оценка на инвалидизацията (Fonknechten и сътр., 2000). С оглед по-детайлна преценка на моторните прояви при хомозиготите и хетерозиготните носители бе използвана и 5-степенна скала за оценяване на пирамидните функции. Предвид факта, че тази форма на НСП се характеризира с ангажиране на митохондриалните функции бяха оценявани и допълнителни фактори на средата, влияещи върху оксидативния стрес като тютюнопушене.

Основните опорни пунктове на клиничната диагностика на пациентите преди насочването им към молекулярногенетично изследване бяха:

1. Ранно начало на оплакванията
2. Чист или комплициран с церебеларна атаксия, полиневропатни прояви, оптично ангажиране или единствено с наличието на церебеларна атрофия, неспецифични лезии в бялото вещество на главния мозък или спинална атрофия фенотип
3. Тип на унаследяване
4. Избор на хомогенна в етнически и битов аспект популация пациенти.

Обобщените данни за фенотипните характеристики на пациентите с параплегинова мутация са представени на таблица 26

Таблица 25 Фенотипни характеристики на семействата с параплегинова мутация

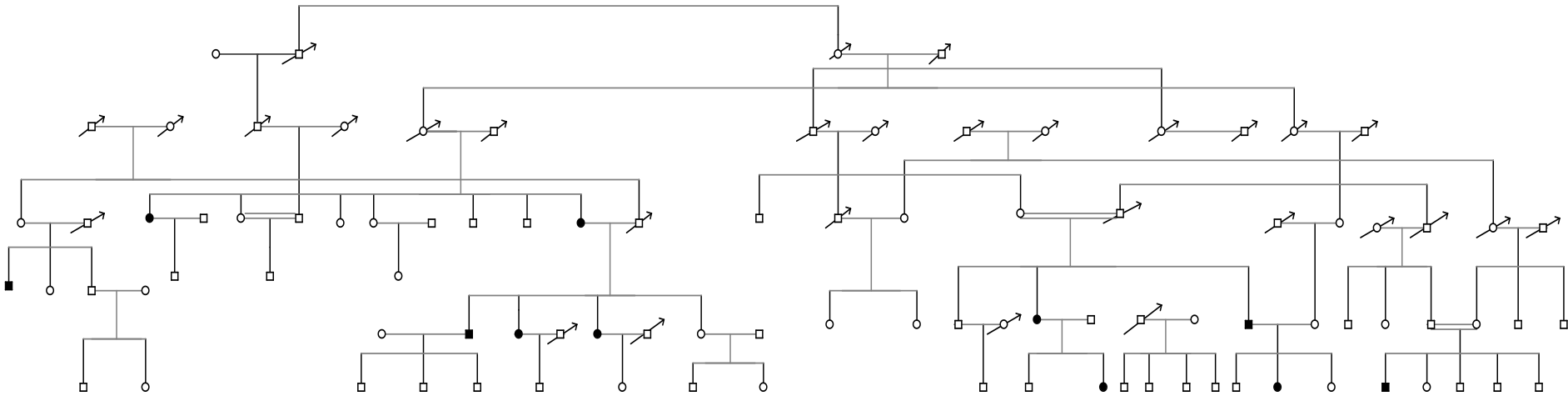
Брой пациенти; Мъже/Жени	19; 10/9
Средна възраст при началните симптоми (години)	37 (SD 8.11, граници 17-52)
Средна продължителност на заболяването (години)	10 (SD 6.26, граници 1-23)
Средна продължителност на заболяването до необходимост от помощни средства	18 (граници 15-23)
Придвижване Самостоятелно	2/19; (10.5%)
Затруднено, но без помощни средства	13/19; (68.4%)
Използване на помощни средства	4/19; (21%)
Церебеларна симптоматика	11
Когнитивни нарушения	
Леко когнитивно нарушение	2/11
Деменция	1/11
ЕМГ	
Миогенна увреда	1/11
МРТ	
Церебеларна атрофия	6/11
Спинална атрофия	1/11
Неспецифични лезии в бялото мозъчно вещество	4/11
ОСТ	
Абнормна находка	1/8

III.6.1 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА СЕМЕЙСТВАТА С МУТАЦИИ В ПАРАПЛЕГИНОВИЯ ГЕН

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА РОМСКА ФАМИЛИЯ С АВТОЗОМНО-РЕЦЕСИВНА ФОРМА НА НСП ОТ ГР. БАНСКО (СЕМЕЙСТВО 26)

Семейство 26 е с ромски етнически произход и в него се откриват кръвнородствени бракове. Представителите на отделните клонове на фамилията понастоящем живеят в гр. Банско, гр. Разлог, гр. Белица, гр. Якоруда и гр. Елешница. Известни са ни следните инбредни бракове: един във II-то поколение между втори братовчеди, два в III-то поколение между втори братовчеди и един в IV-то поколение между III братовчеди. Във фамилията са налице засегнати индивиди в поне 4 поколения. Мутацията p.L78X се открива при 48 негови представители. При 11 болни тя е в хомозиготно състояние, а 37 индивида са нейни хетерозиготни носители. От групата на хомозиготни пациенти 7 са жени, а 4 са мъже. Сред тях се открива изразена клинична хетерогенност предвид това, че от една страна се наблюдават индивиди само с леки белези на пирамидно засягане като хиперрефлексия и клонуси в долни крайници, а от друга индивиди с чиста или комплицирана фенотипна изява.

Родословно дърво на семейство 26



В обобщен вид фенотипните характеристики на хомозиготните носители в семейството са представени на таблица 26.
Таблица 26 Фенотипни характеристики на хомозиготните носители на мутация p.L78X в параплегиния гена

Начална възраст и първи прояви				Фенотипни характеристики при настоящото изследване															
Семейство/ Пациент №	Пол	Възраст/Възраст при началото	Първи прояви	Скала за оценка на пирамидните функции						SPRS		SARA			Допълнителни характеристики				
				Хиперрефлексия ГК/ДК	Поликинетични рефлексии responde	Клонуси/ Патологични рефлексии	Сластичност	Долна парапареза	Пирамидна оценка	SPRS оценка	Атаксия ГК/ДК	Атаксия на походката	Дизартричен говор	SARA оценка	Когнитивно функциониране	Допълнителни симптоми	Тежест	MRI	Трофонопушене
26-III.4	Ж	47/39	Стегнатост в ДК	-/+	-	-/+	+	+	5/5	15/52	-/-	-	-	0/30	-	-	Самостоятелна походка	-	+
26-III.12	Ж	67/52	Стегнатост в ДК	+/+	+	+/+	+	+	5/5	34/52	+/-	-	-	2/30	-	-	Придвижване с помощно средство	-	-
26-IV.1	М	55/46	Стегнатост в ДК	+/+	+	+/+	+	+/-	5/5	26/52	-/-	-	-	0/30	Нормално	-	Самостоятелна походка	Лека спинална атрофия	+
26-IV.9	М	46/38	Слабост в ДК	+/+	+	+/+	+	+	5/5	22/52	-/+	+	-	9/30	Нормално MMSE=25	-	Самостоятелна походка	Церебеларна атрофия; Неспецифични лезии в бялото моз. вещество	+
26-IV.10	Ж	48/46	Стегнатост в ДК	-/+	-	-/+	+	-	4/5	10/52	-/-	-	-	0/30	-	-	Самостоятелна походка	-	-
26-IV.13	Ж	50/50	Без оплаквания	-/+	-	-/+	+/-	-	4/5	5/52	-/-	-	-	0/30	-	-	Самостоятелна походка	-	-
26-IV.20	Ж	49/41	Стегнатост в ДК	+/+	+	+/+	+	+/-	5/5	16/52	-/-	-	-	0/30	Нормално MMSE=28	-	Самостоятелна походка	Нормален	+
26-IV.24	М	53/43	Стегнатост в ДК	+/+	+	+/+	+	+/-	5/5	21/52	-/-	-	-	0/30	MMSE=26 Конструктивна апраксия	-	Самостоятелна походка	Нормален	+
26-V.11	Ж	28/28	Без оплаквания	-/+	+	+/-	-	-	2/5	0/52	-/-	-	-	0/30	Нормално	-	Самостоятелна походка	-	-
26-V.18	Ж	31/31	Без оплаквания	+/+	+	-/+	-	-	3/5	1/52	-/-	-	-	0/30	Нормално	-	Самостоятелна походка	-	+
26-V.20	М	36/17	Слабост в ДК	+/+	+	+/+	+	+/-	5/5	16/52	+/+	+	+	9/30	Нормално MMSE=27	-	Самостоятелна походка	Церебеларна атрофия	+

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА РОМСКА ФАМИЛИЯ С АВТОЗОМНО-РЕЦЕСИВНА ФОРМА НА НСП ОТ ГР. ПРОВАДИЯ (СЕМЕЙСТВО 32)

Това семейство е от особен интерес за нашия изследователски екип, тъй като в него са налице 3-ма хетерозиготни носители на мутацията – двама мъже и една жена. Мутацията се открива в две поколения като е налице при двама братя и при дъщерята на единия от тях. Двама от пациентите (баща и дъщеря) са с изразени прояви на долна спастична парапареза, а третият представител на семейството е асимптомен носител на мутацията. Семейството е с ромски произход и живее в гр. Провадия. Родословно дърво на семейство 32

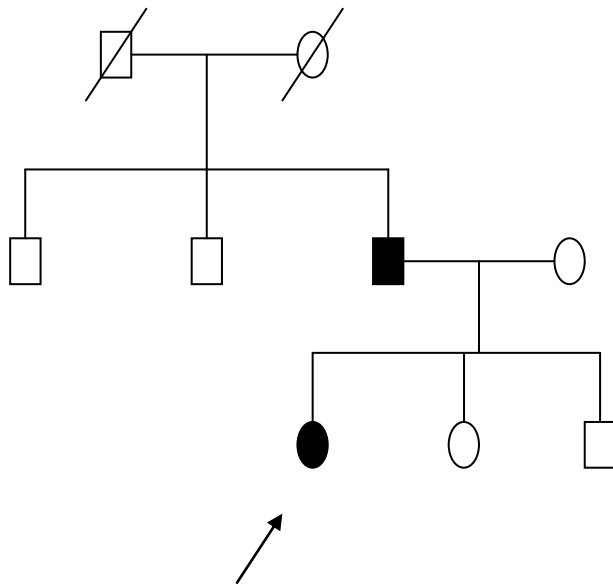


Таблица 27 Фенотипни характеристики на хетерозиготните носители на мутация pL78X в семейство 32

Начална възраст и първи прояви				Фенотипни характеристики при настоящото изследване																
Семейство/ Пациент №	Пол	Възраст/Възраст при началото	Първи прояви	Скала за оценка на пирамидните функции						SPRS		SARA			Допълнителни характеристики					
				Хиперрефлексия	ГК/ДК	Поликлетични рефлексни response	Клонуси/ Патологични рефлексии	Спастичност	Долна парапареза	Пирамидна оценка	SPRS оценка	Атаксия ГК/ДК	Атаксия на походката	Дизартричен говор	SARA оценка	Когнитивно функциониране	Допълнителни симптоми	Тежест	MRI	Тютюнопушене
32-III.1	Ж	18/9	Стегнатост в ДК	+/+	+	+/+	+	+	5/5	17/52	-/-	-	-	0/30	Нормално MMSE=27	-	Самостоятелна походка	Спинална атрофия	-	
32-II.3	М	39/9	Стегнатост в ДК	+/+	+	+/+	+	+	5/5	21/52	-/-	-	-	0/30	Лека дислексия	-	Самостоятелна походка	Церебеларна атрофия	+	
32-II.1	М	35	Без оплаквания	-/-	-	-/-	-	-	0/5	0/52	-/-	-	-	0/30	-	-	Самостоятелна походка	-	+	

III.6.2 ОБСЪЖДАНЕ НА СЕМЕЙСТВАТА С МУТАЦИЯ p.L78X В ПАРАПЛЕГИНОВИЯ ГЕН

Популациите, в които е налице ефект на родоначалника имат доказано важно значение за идентификацията на генни мутации, предизвикващи редки заболявания с унаследяване според законите на Мендел. Изучаването на млади, високо ендогамни изолирани популации като българските роми е довело до установяване на повече от 20 генни мутации с ефект на родоначалника, свързани със засягане на единични гени (Angelicheva D и сътр., 1999; Azmanov D и сътр., 2010; Chandler D и сътр., 2000; Thomas PK и сътр., 2001; Guerguelcheva и сътр., 2012). Склонността им към ендогамия и възможността да се изследват големи семейства създава предпоставки за идентификация на гени чрез linkage анализи (Kalaydjieva и сътр., 1996; Angelicheva и сътр., 1999).

Считаме, че сред изследваната от нас популация пациенти, засегнати от мутация p.L78X, която е описана за първи път от Arnoldi през 2008 г., е налице ефект на родоначалника.

Повечето съобщения в литературата говорят за автозомно-рецесивен тип на унаследяване при SPG7 формата. Няколко изследвания съобщават за хетерозиготни мутации в параплегиновия ген (McDermott, 2001; Elleuch, 2006; Arnoldi, 2008; Brugmann, 2008; Warnecke, 2010; Schlipf, 2011; Sanchez-Ferrero, 2012). През 2001 г. McDermott съобщава за семейство, при което мутацията в параплегиновия ген изглежда се предава по автозомно-доминантен модел. Arnoldi, който през 2008 г. описва същия тип мутация, която е открита и при ромските семейства в България, съобщава за 4 хетерозиготни индивиди при условие, че мутацията се локализира в консервативен домен на гена и не е открита при никой от контролите. Неотдавнашно изследване демонстрира неспецифични лезии в бялото мозъчно вещество при асимптоматен хетерозиготен носител на мутация в параплегиновия ген (Warnecke, 2010). Тези наблюдения навеждат на мисълта, че е възможно съществуването на двоен модел на унаследяване при тази форма на заболяването – автозомно-рецесивен и автозомно-доминантен с непълна пенетрантност. В литературата съществуват и други предположения, а именно двугенен модел на унаследяване, базирани на изследванията на Koppen.

Мутация p.L78X е установена освен при българските роми и при роми, живеещи в Италия (Arnoldi и сътр., 2008) и Испания (Sanchez-Ferrero и сътр., 2012). Фенотипните анализи при българските, италианските и испанското семейства сочат, че между българските и италианските семейства съществуват много сходни черти. При всички са налице болестно оживени рефлексии в долни крайници, спастично повишен мускулен тонус и патологични рефлексии. Очертават се обаче и някои важни различия: италианските и испанското семейство демонстрират чиста фенотипна изява, докато при българските семейства е налице комплицирана с церебеларна атаксия, ангажиране на ЧМН и миогенна увреда клинична картина. Те се съпътстват от промени в когнитивните функции свързани с наличието на дисекзекутивни симптоми, леко когнитивно нарушение и лек дементен синдром. При българските пациенти се наблюдава и добре проявена церебеларна симптоматика, ангажираща походката и крайниците. Друга съществена отличителна черта са промените, разкрити при невроизобразяването, свързани с присъствието на церебеларна атрофия и неспецифични лезии в бялото мозъчно вещество, които също не се наблюдават при италианските и испанска фамилии. Особено впечатляваща е липсата на корелация между присъствието на церебеларна атрофия на МРТ и клиничната изява на малкомозъчна симптоматика. Наблюдават се пациенти с разгърната клиника на

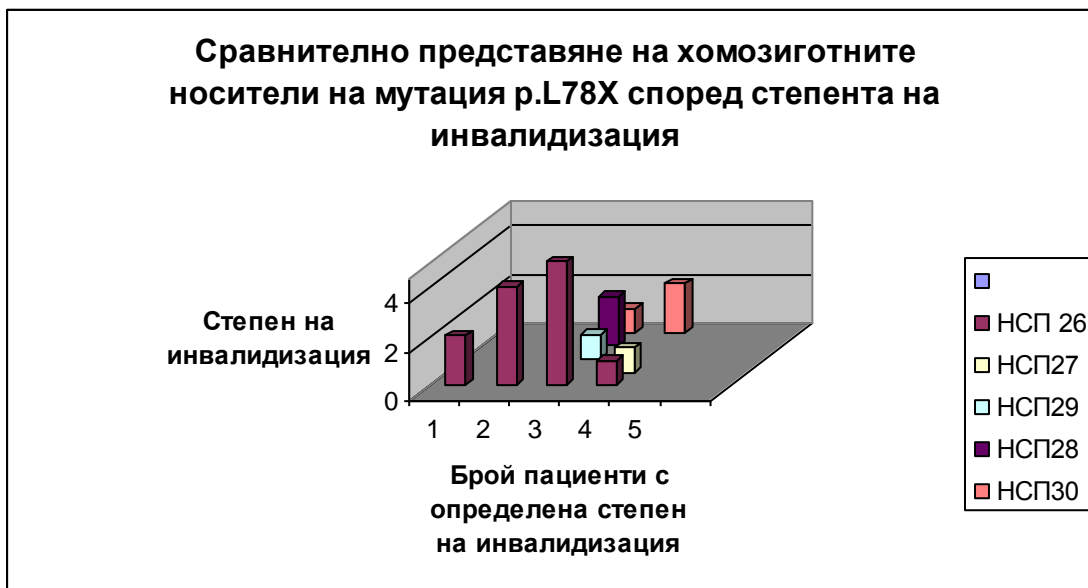
церебеларно ангажиране и отсъствие на малкомозъчно засягане от образните изследвания и обратното. ЕМГ изследване е нормално при всички, с изключение на един пациент, при който се откриват категорични данни за миогенна увреда, клинично свързана с присъствието на миопатен синдром. От друга страна сред българските пациенти има и хомозиготни носители, които имат само оживени с поликинетични характеристики СНР в долни крайници. Според нас обсъжданата българската кохорта болни разкрива добре една съществена черта на тази форма на НСП, а именно възможността за голяма фенотипна хетерогенност дори и сред носителите на една и съща мутация в параплегиновия ген, докато при испанската и италианските фамилии се очертава един по-хомогенен фенотип. В едно и също българско семейство са налице асимптомни носители на мутацията и пациенти с чиста и комплицирана клинична изява на симптомите. От изложеното до тук прави впечатление и друга особеност на НСП тип 7, а именно да дебютира и протича със симптоми, които първоначално биха могли да насочат клиничното мислене към други диагнози. При един от описаните хомозиготни пациенти заболяването започва с комбинация от пирамидни и церебеларни симптоми и първоначалната му диагноза е демиелинизиращо заболяване. При други трима болни церебеларната симптоматика е толкова добре изразена при само набелязана пирамидна увреда, че първите диагнози при тях са насочени към автозомно-рецесивна церебеларна атаксия.

Като цяло може да се направи заключение, че НСП тип 7 протича с умерено тежка фенотипна изява, като това твърдение се илюстрира добре от факта, че 21% (4/19) от пациентите нямат никакви трудности при самостоятелното придвижване, 58% (11/19) имат известни трудности при ходене, но не използват помощни средства и едва 21% (4/19) са принудени да употребяват помощно средство след средна продължителност на заболяването 10 години. При българските семейства с ромски етнически произход е налице по-богат и разнообразен фенотип, сравнено с италианските и испанската фамилии.

III.6.3 СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА СЕМЕЙСТВАТА С МУТАЦИЯ p.L78X В ПАРАПЛЕГИНОВИЯ ГЕН

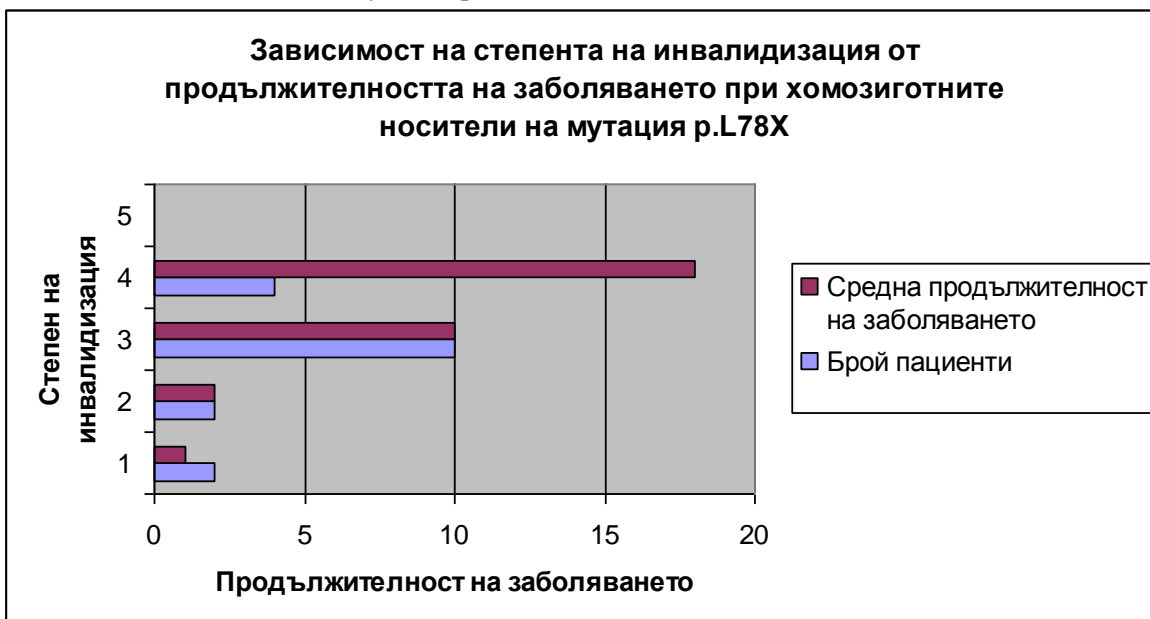
На фигура 5 е направено сравнително представяне на хомозиготните носители на мутация p.L78X според степента на инвалидизация на отделните представители на седемте семейства. Тя отново демонстрира, че клиничната картина сред носителите на мутацията е умерена тежка. Сред представителите на фамилиите няма болни, които са с пета степен на инвалидизация и съответно имат нужда от инвалиден стол. Преобладаващият брой пациенти имат втора и трета степен на инвалидизация, а само 4 болни имат необходимост от подкрепа от помощно средство при придвижване.

Фигура 5 Сравнително представяне на хомозиготните носители на мутация pL78X според степента на инвалидизация

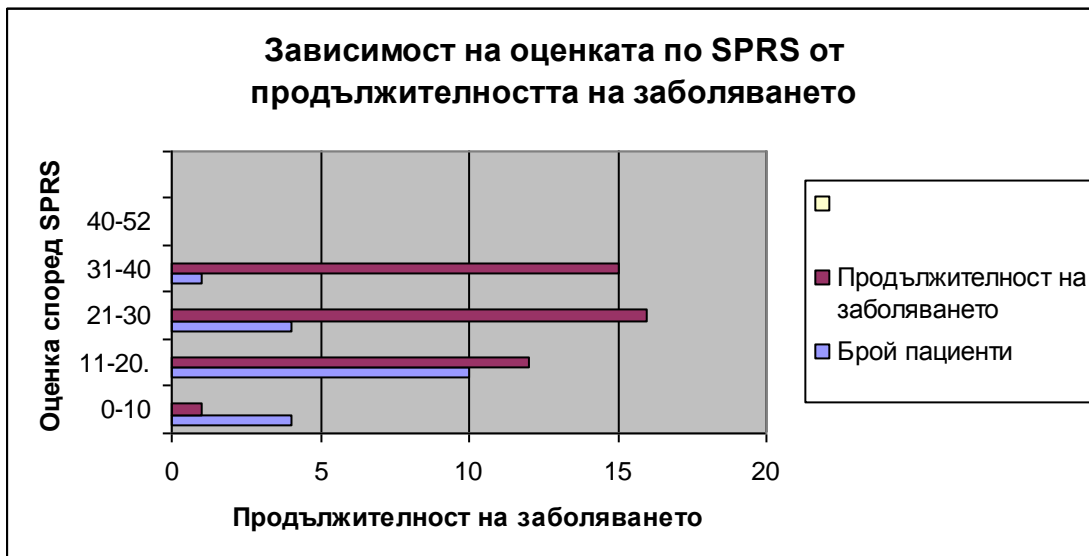


Тежестта на клиничното засягане е сравнително еднакво проявена сред отделните представители на седемте фамилии и макар и хетерогенна показва ясна зависимост от продължителността на заболяването, което е представено на фигури 6, 7 и 8

Фигура 6 Зависимост на степента на инвалидизация от продължителността на заболяването при хомозиготните носители на мутация pL78X

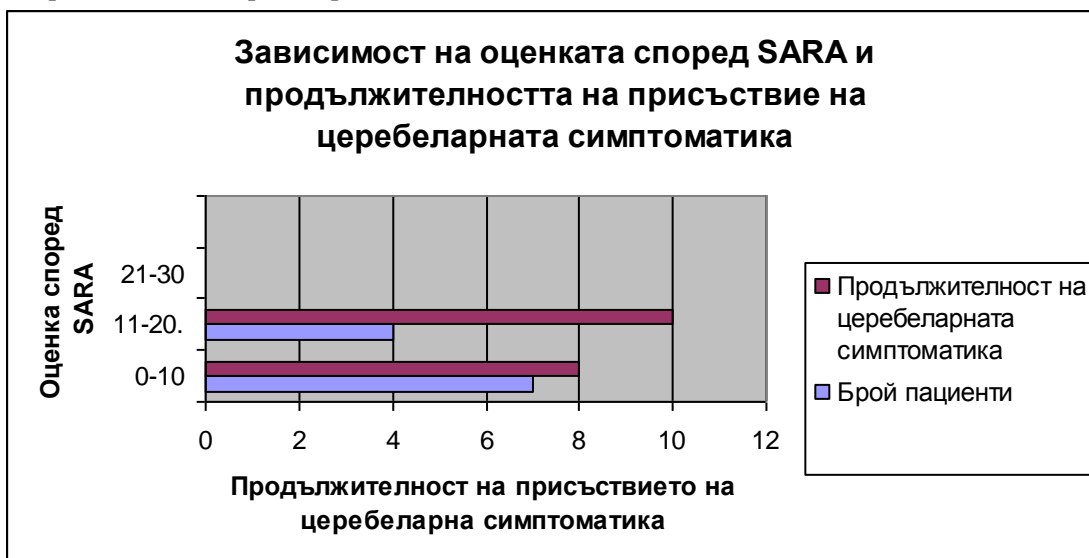


Продължителността на заболяването има добре изразени взаимоотношения и с оценката според Скалата за оценка на спастичната парапареза и показва тенденцията за нарастване на тежестта на заболяването с неговата продължителност (фигура 7).
 Фигура 7 Зависимост на оценката по Скалата за спастична парапареза от продължителността на заболяването



Подобна зависимост с давността на заболяването се открива и по отношение на тежестта на церебеларната симптоматика, оценена чрез Скалата за откриване и оценка на атаксията.

Фигура 8 Зависимост на оценката по Скалата за откриване на атаксията от продължителността на присъствие на церебеларната симптоматика



Една от целите на нашето изследване бе насочена към оценяване влиянието на факторите на средата като тютюнопушенето, причиняващо оксидативен стрес, върху развитието и прогресията на тази форма на заболяването. От хетерозиготната популация пациенти бяха подбрани индивидите, които имат I степен роднинска връзка

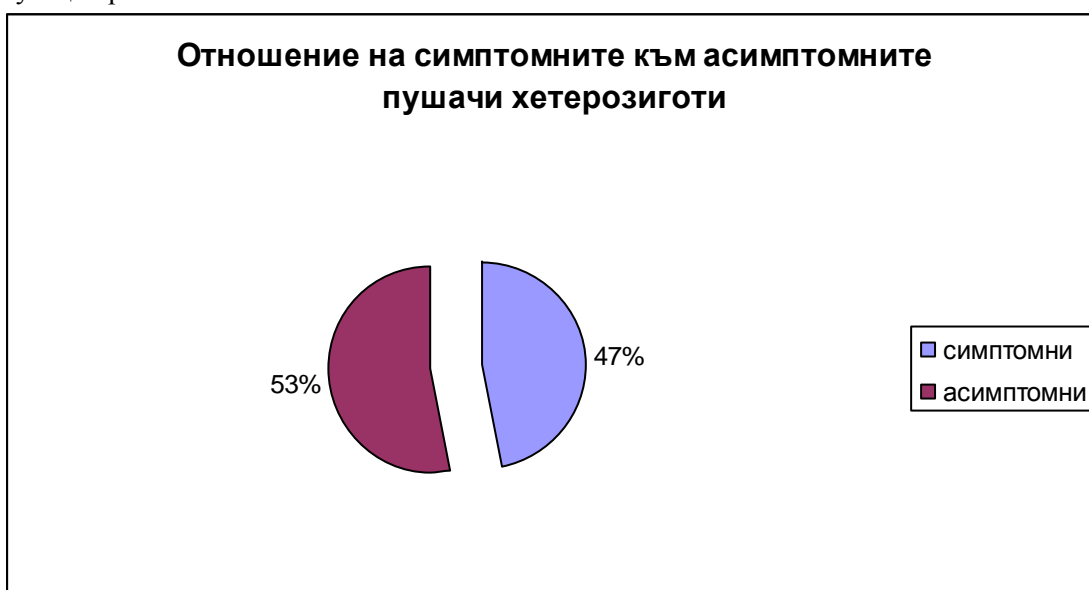
с носител на мутацията в хомозиготно състояние. Сред тях 9 индивида са пушачи, а 13 са непушачи, което е представено на фигура 9.

Фигура 9 Съотношение на броя пушачи към непушачи в хетерозиготната популация пациенти



Тези две групи представители на хетерозиготната популация бяха допълнително разделени на такива, които имат лека пирамидна симптоматика, оценена според 5-степенната скала за пирамидно засягане и такива, при които пирамидно ангажиране не се установява. Направеният анализ показва, че девет от симптомните хетерозиготи никога не са пушили, а осем са пушачи. Процентното разпределение на пациентите е представено на фигура 10

Фигура 10 Отношение на симптомните към асимптомните пушачи хетерозиготи на мутация рL78X



От представеното обсъждане дотук не може да се заключи с абсолютна убеденост, че фактори на средата като тютюнопушенето имат влияние върху развитието на заболяването.

От направеното изложение могат да се направят следните заключения за тази форма на заболяването:

1. Мутациите в параплегиновия ген са причина за поява на широко разпространена в България форма на НСП
2. Мутация р.L78X е често срещаща се сред ромския етнос и при нея се наблюдава ефект на родоначалника
3. Моделът на унаследяване при преобладаващата част от семействата е автозомно-рецесивен
4. Част от семействата, носители на мутацията са инбредни
5. Първите прояви могат да варират в широк диапазон - между II и VI декада от живота
6. Тази форма не е тежко инвалидизираща и 58% от пациентите запазват възможност за самостоятелно придвижване след средно 10 годишна продължителност на заболяването
7. Типична е бавната прогресия
8. Характерна е клинична хетерогенност като наред с пациентите с минимално пирамидно засягане, се наблюдават и такива с чист и комплициран фенотип
9. Основни комплициращи симптоми са церебеларната атаксия и когнитивните смущения. При част от болните е възможно ангажиране на ЧМН и миогенна увреда
10. Сред българската популация болни няма сигурни данни за въвличане на оптичния нерв в болестния процес
11. Често срещана комплицираща изява от невроизобразяването е наличието на церебеларна атрофия на МРТ и неспецифични лезии в бялото мозъчно вещество
12. Липсва корелация между МРТ данните за церебеларна атрофия и клиничното присъствие на малкомозъчна симптоматика
13. При част от изследваните мутация р.L78X се открива в хетерозиготно състояние като отново е налице клинично разнообразие като част от тях са асимптомни, други имат данни за леко пирамидно ангажиране, а при трети се наблюдава разгърната картина на пирамидно увреждане
14. Няма сигурни данни за влиянието на тютюнопушенето като фактор, водещ до оксидативен стрес, върху разгръщането и прогресията на заболяването
15. Повдига се въпросът за възможен смесен автозомно-доминантен и автозомно-рецесивен модел или за двугенен модел на унаследяване
16. Обсъжда се влиянието на модифициращи фенотипната изява фактори

III.7 СРАВНИТЕЛНО ОБСЪЖДАНЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ С МУТАЦИИ В ГЕНИТЕ, КОДИРАЩИ ПАРАПЛЕГИН И СПАТАКСИН

Прилики

1. При двата типа мутации е налице автозомно-рецесивен модел на унаследяване
2. При двата типа мутации се открива комплицирана фенотипна изява
3. Отделните симптоми и белези, представляващи задължителни характеристики на заболяването като спастичност, хиперрефлексия в долни крайници и патологични рефлексии присъстват еднакво проявени при двата контингента болни
4. Съпътстващите и често срещани синдроми са налице и в двете групи и са приблизително еднакво проявени
5. При двата типа мутации са налице церебеларни белези като комплициращ симптом
6. Когнитивни смущения с характер на леко когнитивно нарушение се откриват и при двете групи болни
7. При образните изследвания и в двете групи пациенти се установяват неспецифични лезии в бялото мозъчно вещество и спинална атрофия
8. В двете кохорти пациенти не се установяват асимптомни носители на съответната мутация

9. Разлики

10. Съществуват съществени различия в средната възраст на изява на началните симптоми като в семейството със спатаксинова мутация е значително по-ранна – 19 г. в сравнение с позитивните за параплегинова мутация фамилии – 37 г.
11. Значително по-големи вариации в началната възраст на изява в параплегиновата група (17-52 г.) срещу спатаксиновата група (17-21)
12. Средната възраст, при която болните се нуждаят от подкрепа при ходене също показва важни различия – 57 г. при болните с мутация в параплегиновия ген, срещу 21 г. в семейството със спатаксинова мутация
13. За семействата с параплегинови мутации е характерна умерено тежка фенотипна изява и сравнително бавна еволюция на симптомите, докато при болните с мутации в спатаксиновия ген е налице относително бърза прогресия и тежка инвалидизация като след средно 10 годишна продължителност на болестта част от болните се нуждаят от инвалиден стол
14. За болните с параплегинови мутации е типична фенотипна хетерогенност като наред с болните с комплицирана клинична картина се наблюдават и такива с минимално пирамидно ангажиране и с чист фенотип. Подобна хетерогенност липсва в групата със спатаксинова мутация
15. Степента на церебеларно засягане, отчетена според Скалата за откриване и оценка на атксията е значително по-тежка при носителите на мутация в гена, кодиращ спатаксин
16. При част от болните с мутация в спатаксиновия ген се установява сетивна полиневропатия. Полиневропатна симптоматика не е обективизирана от ЕМГ при нито един болен с параплегинова мутация
17. В групата с мутация в параплегиновия ген се установява ангажиране на ЧМН, докато такова не е установено при позитивните за спатаксинова мутация пациенти

18. Един болен с параплегинова мутация демонстрира данни за миогенна увреда, съответстваща клинично на добре оформен миопатен синдром
19. При един болен в спатаксиновата група се откриват леки хипотрофии на дисталните мускули на горни крайници
20. В спатаксин положителната група невроизобразяващите средства установяват хипоплазия на корпус калозум и фронтална корова атрофия, липсващи при болните с параплегинова мутация
21. В групата с мутация в параплегиновия ген се откриват значителен брой хетерозиготни носители на мутацията, което не се установява в спатаксиновата група

IV. ДИАГНОСТИЧЕН ПОДХОД ПРИ НАСЛЕДСТВЕНИТЕ СПАСТИЧНИ ПАРАПАРЕЗИ – ОБОБЩЕНИЕ НА СЪВРЕМЕННИТЕ ПРЕПОРЪКИ И ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

НСП са клинично и генетично хетерогенна група заболявания, които се унаследяват автозомно-доминантно, автозомно-рецесивно или Х-свързано. Установени са повече от 48 различни в генетично отношение форми и са идентифицирани 28 от причиняващите ги гени. При липса на фамилна история на заболяването е задължително провеждането на диференциално-диагностични изследвания, основно в насока митохондриални заболявания, множествена склероза, адреномиелоневропатия, вит. В12 дефицитни състояния, миелопатия, церебеларни атаксии.

Най-честата в световен мащаб, а и в България е НСП 4 формата, дължаща се на мутации в спастиновия ген (MIM 182601). Според различните изследвания на нея се падат 40-50% от всички случаи с автозомно-доминантна НСП. По правило протича с чиста форма на заболяването, но се описват и семейства с комплициран с церебеларна атаксия, лек дементен синдром и невропатни прояви фенотип. Сред българските фамилии основен комплициращ синдром е когнитивния дефицит, независимо, че повечето семейства не правят изключение от правилото и имат чиста фенотипна изява. При един представител на българските родословия е установена и компликация с генерализирани тонично-клонични пристъпи. Средната възраст на изява на началните симптоми е силно вариабилна и може да се движи между 1- и 76-годишна възраст. В литературата съществува голям брой съобщения за спорадични случаи на СПАСТ-позитивни болни, при които липсва фамилна история на заболяването. Предполага се, че това е свързано със съществуването на около 20% асимптомно носителство на мутации в спастиновия ген. Българската популация не прави изключение и в нашето проучване бяха установени един асимптомно носител и трима болни със спорадични мутации. Сред българските пациенти също е в сила универсалното правило на Harding, че по-късната изява на първите симптоми (след 35 годишна възраст) се съпътства от по-бърза еволюция и достигане на по-висока степен на инвалидизация с по-бързи темпове в сравнение с ранното начало (преди 35 годишна възраст) на заболяването. В контекста на нашето изследване е важно да се подчертае, че съществува още един важен аспект, касаещ тежестта на клиничните изяви, а именно етническият произход. Автозомно-доминантната НСП, дължаща се на спастинови мутации се среща и при трите основни етноси в България: български, турски и ромски. Интересно е, че семействата от ромския етнос имат значимо по-тежка фенотипна изява, сравнено с българските при един и същи тип мутации.

На базата на данните от световната литература и резултатите от изследванията в България считаме, че при пациентите с чиста форма на заболяването и автозомно-доминантен тип на унаследяване, както и при спорадичните случаи с чиста фенотипна изява е уместно молекулярно-генетичното изследване да започне с изследване на спастиновия ген.

Според международните изследвания втората по честота форма на НСП в световен мащаб е НСП 3А, причинена от мутации в атластиновия ген (MIM 182600). На нея се падат около 40% от случаите с автозомно-доминантна НСП, когато е изключена мутация в спастиновия ген. Тя се характеризира с ранно начало (преди 20 годишна възраст) и сравнително бърза начална прогресия. По правило протича с чиста фенотипна картина, но може да има и комплицирана, най-често с невропатия, клиника.

По принцип при тази форма не се откриват когнитивни, сетивни и тазоворезервоарни смущения. При описаните от нас семейства се наблюдава подчертана клинична хетерогенност като наред с леките случаи на пирамидно засягане се срещат, асимптомни носители и такива с тежко протичане. Едното от изследваните от нас семейства е с чист фенотип, а другото с комплицирана с епилепсия клиника. Описаните семейства са от български и ромски произход и отново ромското семейство има изразено по-тежка клинична картина и по-ранна и тежка степен на инвалидизация в сравнение с българското.

С оглед на това считаме, че пациентите с автозомно-доминантен модел на унаследяване, ранно начало на заболяването и чиста или комплицирана фенотипна изява, при които са изключени мутации в спастиновия ген, трябва да бъдат насочени за молекулярно-генетичен анализ на гена, кодиращ атластин.

Следващи по честота автозомно-доминантни форми са НСП 31, дължаща се на мутации в REEP1 гена, която представлява 8% от автозомно-доминантните форми и НСП 10, свързана с мутации в KIF5A гена, която често се асоциира с аксонална невропатия. При българската кохорта болни тези автозомно-доминантни форми не бяха установени.

Независимо че, по правило НСП 3А формата е втората по честота в световен мащаб, то изглежда в българската популация на второ място се подрежда автозомно-рецесивната НСП 7 форма (MIM 607259), дължаща се на мутации в параплегиновия ген. Клиничната изява на тази форма може да бъде чиста или комплицирана с церебеларна атаксия, полиневропатия, оптична атрофия и булбарна симптоматика. Началната възраст на изява е твърде вариабилна с граници между 8 г. и 42 г. При част от семействата се установява наличието на кръвнородствени бракове.

За мутации в параплегиновия ген в България са изследвани общо 190 болни, произхождащи от 40 семейства, които според етническия си произход са: български (8 фамилии), турски (3 фамилии), българомохамедански (1 фамилия), ромски (28 фамилии). В нашето изследване бе установена една мутация с ефект на родоначалника, разпространена сред ромските семейства, която ангажира общо 72 болни от седем родословия като при 19 пациенти е в хомозиготно състояние, а при 53 се наблюдава хетерозиготно носителство. От тези 7 родословия при представителите на 6 фамилии се установява церебеларна атаксия. При изследваните български, турски и българомохамедански фамилии не беше установена церебеларна атаксия, но не беше верифицирана и мутация в параплегиновия ген. Семействата от ромски произход принадлежат към групите на йерлиите и калдерашите.

Интересен е фактът, че посочената мутация е описана само при ромски семейства, живеещи в Италия, Испания и България. Фенотипът не е свързан с тежко протичане и прогресията на заболяването е бавна. Средната възраст на началото варира между II и VI декада от живота, а фенотипът е комплициран с церебеларна атаксия, когнитивни нарушения и булбарна симптоматика. Според нас особено важен и обогатяващ фенотипната изява на тази форма е установеният миопатен синдром, кореспондиращ с данни за миогенна увреда при един от носителите на мутацията. Същевременно трябва да бъде подчертан и фактът за нарастващия брой съобщения в литературата за хетерозиготно носителство на мутации в параплегиновия ген. Сред част от ромските хетерозиготни носители в нашето изследване се установява присъствието на лека пирамидна симптоматика. Други автори съобщават за неспецифични лезии в бялото мозъчно вещество при хетерозиготни индивиди. McDermott описва семейство с мутация в параплегиновия ген с вероятно автозомно-доминантен модел на унаследяване. В нашето изследване също се описва симптомно хетерозиготно

семейство с предаване на мутацията от баща на дете, при което също не се изключва възможността за автозомно-доминантна наследственост.

Счита се, че най-честата автозомно-рецесивна форма на НСП сред европейците е НСП 11 (MIM 182601), свързана с мутации в гена, кодиращ спатаксин. На нея се падат 21% от всички автозомно-рецесивни форми в Европа. Характеризира се с ранно начало, обикновено преди 25 годишна възраст, и предизвиква до умерена към тежка степен на инвалидизация. Типична находка от образната диагностика е хипоплазията на корпус калозум, неспецифичните лезии в бялото мозъчно вещество и фронталната корова атрофия. Във фенотипно отношение основни комплициращи черти са когнитивния дефицит, церебеларната дизартрия и хипотрофията на малките мускули на ръцете. При българската кохорта пациенти са верифицирани двама пациенти, произхождащи от едно семейство с мутация в спатаксиновия ген.

Втората по-честота автозомно-рецесивна форма е НСП 15 (MIM 270700), която се дължи на мутации в ZFYVE26 гена, който кодира белтък, наречен спастицин. Във фенотипно отношение тази форма е доста подобна на НСП 11 и се характеризира с когнитивен дефицит, невропатия, дистална амиотрофия, церебеларна атаксия, хипоплазия на корпус калозум и пигментна дегенерация на ретината. В нашето изследване не бяха установени семейства, носители на мутация в ZFYVE26 гена.

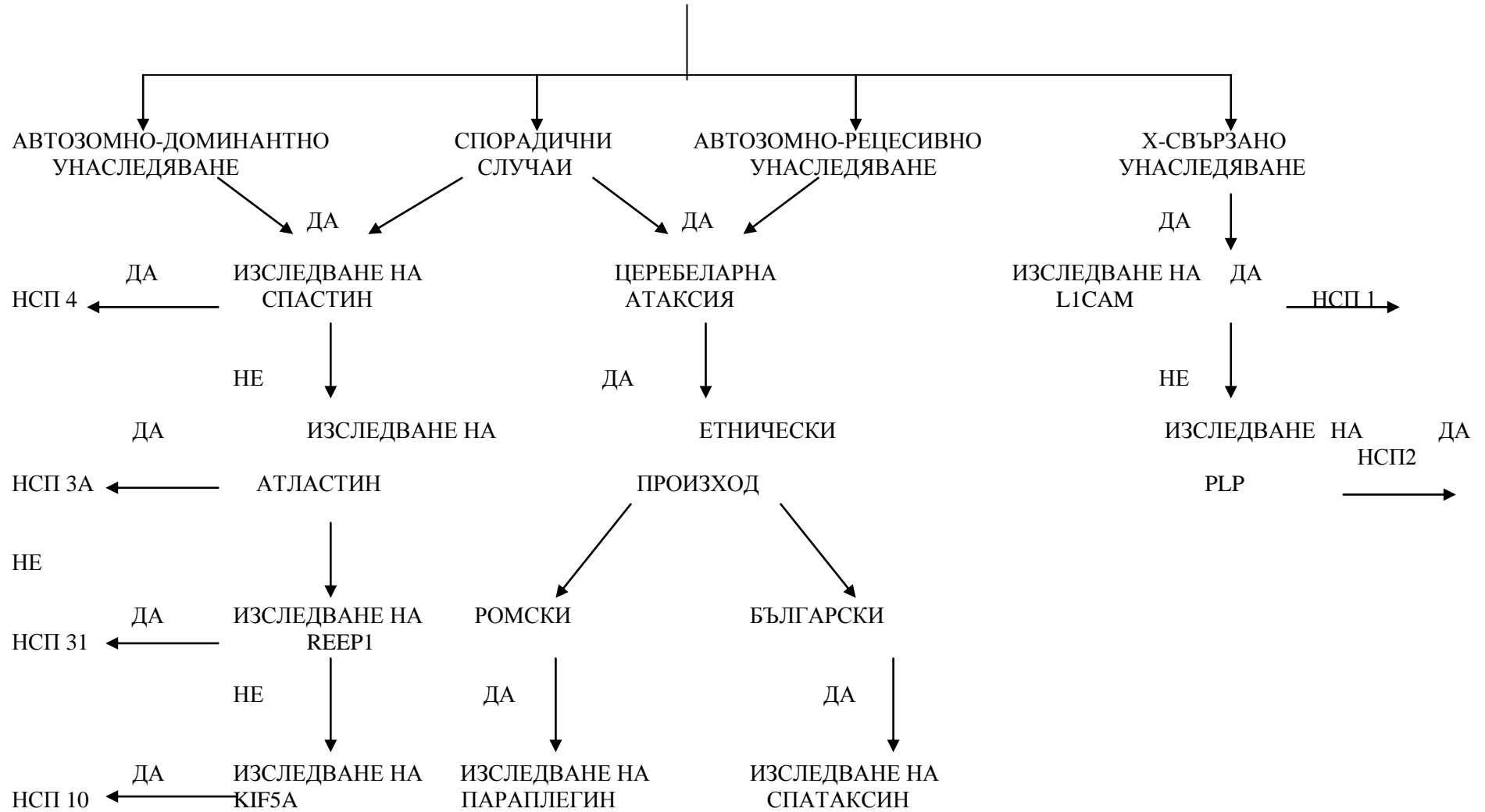
Автозомната спастична атаксия на Charlevoix-Saguenay е широко (ARCAKS, MIM 270550) разпространена в североизточен Квебек. Висока честота на заболяването се открива и сред холандската популация. Дължи се на мутации в SACS гена, кодиращ белтъка саксин и клинично се характеризира със спастичност, церебеларна атаксия, невропатия и ретинопатия.

До момента в България не са идентифицирани X-свързани форми на НСП. Към тази група се отнасят НСП 1 (MIM 303350), дължаща се на мутации в LICAM гена, които кодира невралната клетъчна адхезионна молекула. Тази форма е алелна на MASA синдром и X-свързаната хидроцефалия. Мутациите в PLP гена, отговорен за възникването на НСП 2 (MIM 312920) са свързани с фенотипна изява на разнообразни по тежест синдроми, започвайки от тежката инфантилна форма на болестта на Pelizeus-Marzbacher, протичаща с окуломоторни смущения, спастична парепареза, атаксия, хореоатетоза, оптична атрофия и забавено психомоторно развитие и достигайки до леките чисти форми с късно начало. Мутациите в този ген по принцип са свързани с нарушаване процесите на миелинизация.

Направеното дотук изложение очерта най-честите форми на НСП в световен мащаб. Направените от нас изследвания показват, че подобно на останалите страни в България най-често срещаните форми на НСП се дължат на мутации в спастиновия ген. Честотата им е малко по-висока от тази в останалите страни и представлява 52% от всички установени мутации и 76% от случаите с автозомно-доминантно унаследяване. Втората по честота форма в българската популация е автозомно-рецесивната НСП 7, на която принадлежат 29% от всички случаи с НСП. На автозомно-доминантната НСП 3А, свързана с мутации в атластиния ген се падат 16%, а най-рядка е НСП 11 формата, дължаща се на мутации в спатаксина – 3%.

Основавайки се на придобитият опит от нашите резултати, на международните препоръки за диагностика на НСП и на изводите, направени от редица изследователи бихме могли да предложим диагностичен алгоритъм за насочване за молекулярно-генетично изследване при болните с НСП в България.

НАСЛЕДСТВЕНА СПАСТИЧНА ПАРАПРЕЗА



Получените от нас резултати подкрепят цитираните в литературата данни за най-висока честота на разпространение на автозомно-доминантната НСП 4 форма. Същевременно малко изненадващо на второ място по разпространение се открива автозомно-рецесивната НСП 7. Причините за това най-вероятно се крият в мултиетническия социален състав на българската популация.

По-нататъшно задълбочено обсъждане и разширяване на изследвания контингент пациенти е необходимо и за затвърждаване на първоначалното ни наблюдение за лека и с по-късно начало фенотипна изява при българската популация пациенти. Като причини в съображение биха могли да влязат съответните типове мутации, възможността те да са разпространени с по-голяма честота в българската популация, вариации в експресията на мутантния протеин или евентуално допълнителна роля да играят определени фактори на средата. В редица семейства ни правеше впечатление и по-ранната поява и по-тежкото протичане на заболяването в следващите генерации.

Предмет на бъдещи изследвания е верифицирането на причините за антиципацията следващите генерации и прецизното уточняване дали причините за нея са изцяло генетични или се намесва действието и на допълнителни модифициращи негенетични фактори.

Бъдещите изследвания на биохимичните процеси и функционирането на дългите проводници в здраве и болест не само биха отговорили на тези въпроси, но биха спомогнали за разбиране същността на патологичния процес, както при НСП, така и на механизмите, лежащи в основата на редица невродегенеративни заболявания.

V. ПРИНОСИ

A. Научно-приложни

1. Събрана е голяма кохорта от семейства с наследствени спастични парапарези, при които е проведено клинично-генеалогично изследване.
2. Създадена е ДНК банка от всички клинично изследвани семейства, която е основа на настоящите и бъдещите генетични изследвания.
3. Разработен е диагностичен алгоритъм за насочване за молекулярно-генетично изследване на наследствените спастични парапарези в българската популация.
4. Идентифицираните генетични дефекти създават възможност за генетично консултиране на засегнатите семейства, селективен генетичен скрининг за носителство на автозомно-рецесивните форми сред високо рискови групи и общности, както и провеждане на генетична профилактика на по-тежките форми на наследствени спастични парапарези чрез пренатална диагностика в засегнатите семейства.

B. Научно-теоретични

5. Описан е клиничния спектър на автозомно-доминантната наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутации в спастиновия ген, в българската популация. Проучени са генотип/фенотип корелациите при тази форма, вкл. и при 13 идентифицирани за първи път генетични дефекта в спастиновия ген.
6. Описан е клиничния спектър на автозомно-доминантната наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутации в атластиновия ген, в българската популация. Проучени са генотип/фенотип корелациите при тази форма, вкл. и при 2 идентифицирани за първи път генетични дефекта в атластиновия ген.
7. Описан е клиничния фенотип на автозомно-рецесивна форма на наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутация в спатаксиновия ген.
8. Описан е клиничния спектър на автозомно-рецесивната форма на наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутация в параплегиновия ген, в хомозиготно и в хетерозиготно състояние.
9. Установени са специфики в разпространението на различните форми на НСП сред различни етнически и религиозни малцинства. Автозомно-доминантната НСП, дължаща се на спастинови мутации е установена и при трите основни етноси: българи, турци и роми; автозомно-доминантната НСП, дължаща се на атластинови мутации е открита при българи и роми; автозомно-рецесивна форма на наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутация в спатаксиновия ген е открита сред българомохамедани; автозомно-рецесивната форма на наследствена спастична парапареза, дължаща се на мутация в параплегиновия ген у нас е открита само сред роми и е най-честата НСП в ромската общност, като се среща, както сред роми йерлии, така и сред калдераши, принадлежащи към Влашката група роми. Сред ромите са открити и клинично изследвани и други автозомно-рецесивни форми на НСП, които са обект на бъдещи генетични изследвания.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Андреева А, Търнев И, Литвиненко И, Иванова Н. Съвременни аспекти на наследствената спастична параплегия. Клиника, диагностика и невропатология. Бълг. невр., 2005; т.5, бр.3:130-134
2. Иванова Н, Йорданова А, Митев В, Андреева А, Търнев И, Литвиненко И, Кременски И. Съвременни аспекти на наследствената спастична параплегия. Молекулни механизми. Бълг. невр., 2005; т.5, бр.3:124-129
3. Андреева А, Йорданова А, Гергелчева В, Михайлова В, Иванова Н, Търнев И. Българско семейство с наследствена спастична парапареза с хипоплазия на корпус калозум. Бълг. невр. и псих. практика, 2008; бр.3:7-9
4. Андреева А, Кънчева Д, Иванова Н, Йорданова А, Търнев И. Наследствени спастични парапарези, дължащи се на мутации в спастиновия ген. Клинико-генетични корелации, 2013 под печат в списание Бълг. невр.
5. Ivanova N, Lofgren, Tournev, Rousev, Andreeva, Iordanova, Georgieva, Deconinck, Kremensky, De Jongue, Mitev. Spastin gene mutations in Bulgarian patients with hereditary spastic paraplegia. Clin. Genet., 2006; 70 (6):490-495

ПОСТЕРИ

1. Андреева А, Литвиненко И, Иванова Н, Търнев И. “АД Наследствени спастични парапарези. Клинико-генетични аспекти”. Национална конференция по неврология през 2005 г.
2. Андреева А, Йорданова А, Гергелчева В, Михайлова В, Иванова Н, Търнев И. “Наследствена спастична парапареза с хипоплазия на корпус калозум”. Националната конференция по детска неврология, психиатрия и психология през 2006 г.
3. Андреева А, Литвиненко И, Иванова Н, Йорданова А, Шотеков П, Търнев И. “Автозомно-доминантни наследствени спастични парапарези, предизвикани от мутации в спастиновия ген. Клинико-генетични аспекти”. X юбилеен национален конгрес по неврология през 2007 г.
4. Андреева А, Гергелчева В, Михайлова В, Йорданова А, Търнев И. “Херeditарна спастична парапареза с агенезия на корпус калозум”. X юбилеен национален конгрес по неврология през 2007 г.
5. Андреева А, Иванова Н, Литвиненко И, Йорданова А, Търнев И. “Наследствени спастични парапарези – клинико-генетични корелации”. XI национален конгрес по неврология през 2009 г.
6. Kancheva D, Andreeva A, Chamova T, Morar B, Ivanova N, Mitev V, Azmanov D, Kalaydjieva L, Tournev I, Jordanova A. “Founder SPG7 mutation causing hereditary spastic

paraplegia in Gypsies – clinical and genetic considerations”. VIB seminar, Blankenberge, Belgium, 2013

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. Unraveling the molecular basis of hereditary spastic paraplegias – contribution from European Gypsies. Проектът е финансиран от Tom Wahling Stiftung, Германия, 2011-2012
2. Изучаване на молекулните основи на Наследствената спастична парапареза с автозомно-рецесивен тип на унаследяване чрез клинично и генетично изследване на пациенти от ромски етнически произход. Проектът е към МУ-София, начало 2012 г.
3. Фенотипни характеристики и генотип/фенотип корелации при наследствените спастични параплегии. Проектът е финансиран от МОН, 2005-2008.
4. Молекулярна диагностика на автозомно-доминантната спастична параплегия. Проектът е финансиран от МУ-София, 2002-2003.

SUMMERY

Hereditary spastic paraplegias (HSPs) are group of neurodegenerative disorders with great clinical and genetic heterogeneity characterized by insidiously progressive spasticity of lower limbs. Their main pathological feature is degeneration of pyramidal tracts. HSPs are divided into pure and complicated forms depending on whether spasticity occurs in isolation or is associated with additional signs and symptoms such as neuropathy, cerebellar ataxia, optic atrophy, cognitive impairment, seizures and retinal pigmentary degeneration. The mode of inheritance can be autosomal dominant (AD), autosomal-recessive (AR) or X-linked. Until now more than 48 different forms have been reported: 16 AD, 27 AR and 5 X-chromosome-linked.

The aim of our study was to describe the phenotype characteristics and to perform genotype-phenotype analyses of the different forms of HSPs in Bulgarian population.

Materials and methods: After obtaining informed written consent we studied 397 patients from 140 families referred to our hospital with the diagnosis hereditary spastic paraplegia. The examined patients were from Bulgarian, Turkish and Gypsy origin. The neurological evaluation was based on specific scales as Ashworth spasticity scale (1964), Spastic paraplegia rating scale (Schule et al, 2006) and Scale for assessment and rating of ataxia (Schmitz-Hübisch T et al. 2006).

Pyramidal involvement was measured by using 5 grade scale, where grade 0 is normal reflexes, grade 1 is brisk tendon reflexes, grade 2 is polykinetic reflexes, grade 3 is clonus and/or extensor plantar responses, grade 4 is spasticity at lower limbs, grade 5 spastic paraparesis at lower limbs.

The severity of the disease was measured by using a 5 grade scale, where grade 1 is normal or very slight stiffness in the legs, 2 is moderate gait stiffness, 3 is unable to run but able to walk alone, 4 is walk with help, 5 is wheelchair-bound (Fonknechten et al., 2000).

To evaluate the presence of cortical and cerebellar atrophy and unspecific white matter lesions brain MRI was performed.

Nerve conduction studies and electromyography were performed with a Dantec–Keypoint portable electromyograph (Natus, Copenhagen, Denmark).

The involvement of optic nerve was assessed by using optic coherent tomography (OCT).

Results: Genetic studies confirmed the diagnosis in 68 patients from 32 kindreds. Mutations in genes encoding proteins spastin, atlastin, spataxin and paraplegin have been found. Spastin gene mutations were identified in 36 patients from 22 families. Thirteen of the described mutations are new. Genetic analyses confirmed atlastin gene mutations in 11 patients from two families. The two mutations described in these families are also new. Spataxin gene mutations were observed in two sisters from one family. A single pL78X mutation in paraplegin gene was found at homozygous state in 19 patients and in 53 family members at heterozygous state. These patients belong to 7 Gypsy families. This mutation was previously described by Arnoldi in 2008 and can be considered as a founder in this subisolate.

The most frequent form of HSP reported worldwide is SPG4. It accounts for approximately 50% of AD-HSP. In our study we discovered spastin gene mutations in 53% of all HSP patients. These mutations were found in all three main ethnic groups of Bulgarian population. The mode of inheritance was AD in 19 families (86%) and 3 of the cases were sporadic (14%). The age of onset was between 2 and 65 years. The mean age of onset is 30.2 years. The mean age when independent walking was impossible is 43.4 years. Pure phenotype was observed in 20 families and complicated in two kindreds. Early onset (before 35 years) had 9 families and late onset had 13 families. Missense mutations were the most common type of the discovered gene defects in our study.

The second most frequent AD form reported worldwide is SPG3A. It represents about 40% of the young-onset AD-HSP when spastin gene mutations are excluded. In our study we described 2 families with atlastin gene mutations from Bulgarian and Gypsy origin. The Bulgarian family has complicated phenotype and the Gypsy kindred have pure phenotype. In our study this form accounts approximately 16% of all cases.

Surprisingly the second most common form of HSPs in Bulgaria is SPG7. We found a single mutation in paraplegin gene in 7 Gypsy families. The examined Bulgarian and Turkish families were not carriers of the mutation. This mutation was previously described by Arnoldi in 2008 and can be considered as a founder in this subisolate. It accounts about 28% of all cases in Bulgaria. We found mutation pL78X at homozygous state in 19 patients. The main complicating feature was cerebellar ataxia. One of the patients had optic nerve involvement and one patient had myogenic EMG pattern. There was heterogeneity in phenotypic features in this group of patients as there were patients with mild pyramidal involvement and patients with marked spasticity and cerebellar ataxia. Heterozygous carriers of the mutation are 53 family members. Clinical heterogeneity can be found in this group also as some of the patients had mild signs of pyramidal involvement. In one of the families heterozygous mutation was found in three family members – 2 brothers and the daughter of one of them. One of the brothers and his child had marked signs of spastic paraparesis of lower limbs. In this family may be additional disease modifying factors play certain role.

The most common AR form in Europe is those connected with spataxin mutations. In our study we found SPG11 mutation in one family. It accounts 3% of all cases in our study.