

# GENETSKO TESTIRANJE U PEDIJATRIJSKOJ NEUROLOGIJI

---

Jurković, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:438985>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Ivan Jurković

GENSKO TESTIRANJE U PEDIJATRIJSKOJ NEUROLOGIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Ivan Jurković

GENSKO TESTIRANJE U PEDIJATRIJSKOJ NEUROLOGIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Igor Prpić, dr.med, redoviti profesor u trajnom zvanju

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Srđan Banac, dr.med, redoviti profesor u trajnom zvanju

2. Izv.prof.dr.sc. Sandro Dessardo, dr.med

3. Prof. dr. sc. Saša Ostojić, dr.med

Rad sadrži 29 stranica, 2 tablice, 1 sliku, 26 literaturnih navoda.

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Igoru Prpiću i komentorici dr.sc. Jeleni Radić Nišević koji su mi pomogli pri pisanju ovog diplomskog rada

Zahvaljujem se i svojoj obitelji kao i svojim prijateljima koji su od mojih ranih početaka obrazovanja bili uz mene.

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 1.1 EPILEPSIJA .....                                 | 1  |
| 1.2 GENSKA PODLOGA EPILEPSIJA .....                  | 1  |
| 1.3 SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE.....               | 2  |
| 1.4 SEKVENCIRANJE CIJELOG GENOMA .....               | 2  |
| 1.5 SEKVENCIRANJE CIJELOG EGZOMA.....                | 3  |
| 1.6 GENSKI PANELI.....                               | 3  |
| 2. SVRHA RADA .....                                  | 7  |
| 3. ISPITANICI I POSTUPCI (MATERIJALI I METODE) ..... | 7  |
| 4. REZULTATI.....                                    | 9  |
| 5. RASPRAVA .....                                    | 14 |
| 6. ZAKLJUČAK .....                                   | 22 |
| 7. SAŽETAK .....                                     | 23 |
| 8. SUMMARY .....                                     | 24 |
| 9. LITERATURA.....                                   | 25 |
| 10. ŽIVOTOPIS .....                                  | 29 |

## Popis skraćenica i akronima

ILAE = Međunarodna liga protiv epilepsije ( eng. International League Against Epilepsy)

NGS = sekvenciranje nove generacije (eng. next generation sequencing)

WGS = sekvenciranje cijelog genom (eng. whole genome sequencing)

WES = sekvenciranje cijelog exoma (eng. whole exome sequencing)

SNP = polimorfizam jednog nukleotida (eng. single nucleotide polymorphism)

INDEL = insercije i delecije baza (eng. insertion and deletion of bases)

CNV = varijacije broja kopija (eng. copy number variation)

EEG = elektroencefalogram

MR = magnetna rezonanca

KBC = Klinički bolnički centar

COG = očuvan oligomerni Golgijev kompleks (eng. conserved oligomeric Golgi complex)

# 1. UVOD

## 1.1 EPILEPSIJA

Epilepsija predstavlja čestu i izrazito heterogenu skupinu neuroloških bolesti pojavljujući se u 2% osoba (1). Prijašnja definicija epilepsije produžena je u najnovijoj reviziji te definicije izdane 2014. godine od Međunarodne lige protiv epilepsije (eng. International League Against Epilepsy - ILAE) (2). Prema toj reviziji osim minimalno dva neisprovocirana epileptička napadaja unutar više od 24 sata, epilepsijom se smatra i pojava jednog neisprovociranog epileptičkog napadaja u osoba koje imaju druge čimbenike povezane s većom vjerojatnošću trajno smanjenog praga potrebnog za epileptogenu aktivnost, odnosno znatno povećanim rizikom opetovan pojave. Takve pojave uključivale bi strukturne lezije, određene traumatske ozljede mozga, infekcije središnjeg živčanog sustava te druge. Nadalje potrebno je reći da epilepsija nije nužno cijelo-životna bolest te da se smatra da je osoba „izliječena“ od epilepsije, ako nije imala epileptičke napadaje unazad zadnjih 10 godina od kojih minimalno u zadnjih 5 nije koristila nikakve lijekove, ili kad je osoba prošla određenu dobu sindroma epilepsije ovisnog o dobi.

## 1.2 GENSKA PODLOGA EPILEPSIJA

Odavno se spekuliralo kako epilepsija sadrži moguću genetsku podlogu. Jedno od prvih istraživanja koje pokazuje tu korelaciju odnosa objavljeno je 1982. godine (3) i od tad su objavljena nekolicina radova koja su postepeno rasvjetljavala ovo do tad slabo istraživano područje. Značajniji napredak u poznavanju gena odgovornih za epilepsiju pojavio se otprilike prije 11 godina pojavom sekvenciranja nove generacije (eng. Next generation sequencing - NGS). Do danas, otkriveno je više od 500 gena koji su povezani s epilepsijom. Poznato je da je epilepsija etiološki raznolika i multifaktorijalna bolest. Otprilike 25%



epilepsija uzrokovano je stečenim stanjem kao što su moždani udar, traume glave i tumori dok se za ostalih 75% smatra da su u podlozi genetski faktori (4). Zahvaljujući brzom napretku genetičkih dijagnostičkih metoda i primjeni genomskih tehnologija, otkrivena je jasna genska podloga brojnih razvojnih i neuroloških bolesti koje su tradicionalno karakterizirane kao idiopatske” (5). Važnost genetske podloge epilepsije naglašena je i od ILAE. Zahvaljujući novim genetskim metodama poput NGS-a, koji se koristi i u ovom istraživanju, te mikropostroja, uvelike je povećano i ubrzano ljudsko razumijevanje genetske podloge odgovorne za razvoj epilepsije u velikom broju pacijenata.

### 1.3 SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE

Sekvenciranje nove generacije je relativno brza pretraga koja omogućava pregled cjelokupnog ljudskog genoma te u specifične gene od interesa. Drugim riječima NGS-om se pruža odličan uvid u razumijevanje genetike epilepsije. Ovom metodom predstavlja revoluciju u znanstvenoj, ali i kliničkoj praksi omogućujući bolji uvid u pacijentovu bolest i nudeći tako ciljanije metode liječenja i individualiziran terapijski pristup.

Ovisno o širini pretraživanja ljudskog DNA primjenjivost NGS-a bazira se na sekvenciranju cijelog genoma (eng. whole genome sequencing - WGS), samo kodirajućih sekvenca (eng. whole exome sequencing – WES) ili određenih skupina gena, odnosno panela.

### 1.4 SEKVENCIRANJE CIJELOG GENOMA

Koristeći WGS traži se prisutnost varijacija u ljudskom DNA, krenuvši od najmanjih poput supstitucije baza , delecija i insercija pa do inverzija i translokacija. Ovakve promjene

od posebnog su interesa za pedijatrijske pacijente kojima je moguće odrediti patofiziološke mehanizme bolesti, stanja i sindroma. Nadalje, ogromna prednost WGS-a je pristup bez hipoteze koji nam omogućuje da otkrijemo patološki uzrok nastanka bolesti bez prethodno potrebne dijagnoze.

Usprkos prednostima WGS-a on se još uvijek primjenjuje prvenstveno u znanstvene svrhe. Razlog tome je trenutna ekonomska neisplativost ove metode u odnosu na panele. Radi toga, metoda koja je odabrana u ovom radu, ujedno i trenutačno dobro zastupljena u kliničkom okruženju, su paneli gena.

## 1.5 SEKVENCIRANJE CIJELOG EGZOMA

Zadnjih nekoliko godina priča se o razlikama između WGS-a nasuprot WES-a. Sekvenciranje cijelog genoma fokusira se samo na regije koje kodiraju proteine s čime se značajno smanjuje količina genskog materijalakojeg je potrebno analizirati.

Dva glavna razloga zbog kojih bi se osoba podvrgnula WES-u umjesto WGS-u su vrijeme i novac. Naime za regiju od 90 giga baza u WGS-u za egzomsko sekvenciranje potrebno je svega 5 do 6 gigabaza. Iz priloženog je vidljivo da je broj parova baza u WES-u znacajno reduciran što omogućuje bržu i lakšu interpretaciju rezultata u odnosu na WGS.

## 1.6 GENSKI PANELI

Genetski paneli su dijagnostički testovi kojima se istražuje postojanje mutacija u već predodređenim genima za koje se zna da njihove mutacije utječu na etiologiju bolesti. Uloga panela je potvrđivanje kliničke dijagnoze, prognoziranje tijeka bolesti te omogućavanje rane terapijske intervencije gdje je to moguće. Njihova primjena revolucionizirala je otkrivanje

gena u brojnim bolestima, uključujući i epilepsiju. Ona nudi brz i financijski pristupačan način određivanja mutacije gena u kliničkoj praksi. Svaki laboratorij koji se bavi genetskim istraživanjima ima svoje specifične panele koji se više ili manje razlikuju u genima koje obrađuju.

Panelima se obrađuju protein-kodirajuće DNA sekvence svih gena u panelima. Ujedno, njima se obuhvaćaju i nekoliko mutacija koje se nalaze izvan kodirajućih regija. Ovim testovima zahvaćena je većina mutacija povezanih s epilepsijom i trebali bi se koristiti za detektiranje zamjene jednog nukleotida (eng. single nucleotide polymorphism - SNP) te malenih insercija i delecija (eng. insertion and deletion of bases - INDELS). Neki laboratoriji poput Blueprint Geneticsa i CeGaTa u sklopu svoje standardne analize uključuju i analize delecija i duplikacija (eng. copy number variations - CNV) uz pomoć NGS-a za sve protein-kodirajuće regije gena obuhvaćenih u panelu. Nadalje, sva tri laboratorija u mogućnosti su ponuditi ciljana genska testiranje članova obitelji, ako se procijeni da za to ima potrebe.

## 1.7 PREDNOSTI GENSKOG TESTIRANJA

Unazad zadnjih dvadeset gena broj gena prepoznat da imaju utjecaj na epilepsiju znatno se povećao i to ne bez razložno. Naime, danas na temelju tih spoznaja, drastično možemo utjecati na liječenje nekolicine genetski povezanih epilepsija. U tablici 1. prikazani su geni na koje se može individualiziranim pristupom poboljšati liječenje pacijenata.

Tablica 1. Prikaz gena povezanih s epilepsijom s mogućnostima specifičnog terapijskog pristupa. Modificirano i preuzeto (6)

| GEN            | SINDROM   | PRISTUP LIJEČENJU   |
|----------------|---|---|
| SCN1A          | Dravetov sindrom  | Izbjegavanje lijekova s djelovanjem na natrijske kanale (na primjer: fenitoin i lamotrigin) |
|                | Migrirajuća epilepsija novorođenčadi  |   |
| SLC2A1         | Defekt glukoznog transportera (GLUT1 sindrom)   | Ketogena dijeta   |
| KCNQ2          | Epileptička encefalopatija (povezana i s benignim epileptičkim sindromom)                                       | Retigabin (nije dokazana njegova djelotvornost I sigurnost u djece)                         |
| PRRT2          | Infantilne konvulzije (povezane i s epizodičnim ataksiom, paroksizmalnim diskinezijom i hemiplegičnom migrenom) | Karbamazepin može biti djelotvoran  |
| TSC1 i TSC2    | Tuberozna skleroza često povezana s infantilnim spazmima  | Vigabatrin, rapamicin I njegovi derivati mogu biti korisni                                  |
| ALDH7A1 i PNPO | Teška epilepsija dječje dobi  | Piridoksin  |

U skladu s tablicom 1., u osoba u kojih se sumnja na Dravetov sindrom, dijagnostikom patogene SCN1A mutacije, omogućujemo pravilnije liječenje te izbjegavamo brojne nepotrebne pretrage.

Nadalje, moguća je i obrnuta situacija. Pacijent se može prikazivati s ne tipičnom kliničkom slikom, kao što se vidi u osoba s metaboličkim sindromom, čijom genetskom

analizom potencijalno možemo otkriti patogenu mutaciju i eventualno gen-specifično liječenje. Čak i pri odsustvu takvog liječenja, rezultati mogu razjasniti uzrok pacijentovih tegoba što nerijetko donosi olakšanje pacijentima i njihovim obiteljima.

Genetske dijagnoze pomažu i pri donošenju reproduktivnih odluka. Takav uvid pogotovo je važan za obitelji u kojoj se javljaju teški stupnjevi epilepsije s poteškoćama u razvoju gdje prenatalna i predimplantacijska genska dijagnostika doprinose planiranju budućih trudnoća.

Prednosti samih panela leže u omjeru između ekonomičnosti i dijagnostičkih dobrobiti. Naime, za razliku od sekvenciranja cijelog genoma, paneli predstavljaju znatno jeftiniju metodu i imaju solidne dijagnostičke prozore. Štoviše, koristeći WGS nerijetko se mogu dobiti mutacije u više gena koje je teško interpretirati i odrediti njihovu značajnost s obzirom na kliničku sliku pacijenta. Na kraju, rezultati koristeći panele značajnije su brže gotovi nego oni u WES-u, a pogotovo naspram onih gdje je korišten WGS.

## 1.8 MANJKAVOSTI GENETSKOG TESTIRANJA

Iako je epilepsija bolest koja se dijagnosticira klinički, a ne genetski, sama spoznaja osobe da možda tijekom života može razviti epilepsiju značajno može smanjiti njenu kvalitetu života. Naime, spoznaja genetskog razloga uzroka epilepsije ne dovodi uvijek do olakšanja što potvrđuju i istraživanja (7, 8). U randomiziranoj studiji u osoba s epilepsijom u Ujedinjenom Kraljevstvu otkriveno je da većina osoba (62%) ima problema s reguliranjem osiguranja, a 36% osoba je odbijena isporuka osiguranja zbog dijagnoze epilepsije (9). No diskriminacija osoba s dijagnozom epilepsije nije bazirana samo na osiguranju već i na razini zdravstva, zapošljavanja i slično. (10).

Mane specifične za panele su ne sekvenciranje svih baza u ljudskom genomu. Nadalje, rezultati se temelje na varijantama za koje se zna da uzrokuju ili pridonose razvoju epilepsije. Što znači da za neke varijante koje moguće uzrokuju bolest neće biti pravilno interpretirane ovim istraživanjem. Velike delecije i duplikacije kao i ostale strukturne promjene ne mogu se detektirati panelima. Balansirane translokacije, kompleksne inverzije, bolesti uzrokovane mutacijom mitohondrijalne DNA također ne mogu biti obuhvaćene ovom metodom istraživanja. Bitno je spomenuti da pojava negativnog rezultata ne isključuje genetski uzrok bolesti jer uzročna mutacija se može nalaziti u dijelu gena ili genoma koji nije obuhvaćen danim panelom.

## **2. SVRHA RADA**

Svrha ovog istraživanja je, koristeći genske panele kao dijagnostičku metodu izbora, prikazati genske promjene u djece pedijatrijske dobi sa prethodno postavljenom dijagnozom epilepsije te dobiti vlastiti uvid u doprinos panela kao dijagnostičke metode.

## **3. ISPITANICI I POSTUPCI (MATERIJALI I METODE)**

Podatci su prikupljeni retrospektivno tijekom razdoblja od 2 i pol godina počevši s prvim uzimanjem podataka za analizu 17. studenog 2016. godine sa zaključno zadnjim prikupljenim podatkom 3. svibnja 2019. godine. Tijekom ispitivanog razdoblja broj ispitanika koji je sudjelovao u ovom istraživanju iznosi 47 (28 osobe muškog i 19 ženskog spola) od kojih u vrijeme pisanja ovog rada nisu pristigli rezultati za njih 16. Prije samog genskog testiranja svi ispitanici prošli su kroz standardne dijagnostičke postupke koji su u skladu s najnovijim smjernicama obrade pacijenata s epilepsijom (11). U skladu s danim, svim

pacijentima snimljen je elektroencefalogram (EEG) i učinjena magnetna rezonanca mozga (MR) prije odlučivanja za genetsko testiranje. Prikupljene nalaze, anamnestičke podatke i povijest bolesti analizirao je neurolog koji je na temelju danih podataka postavio radnu dijagnozu u skladu s najnovijom ILAE klasifikacijom (2).

Svi prikupljeni podatci za genetsko testiranje preuzeti su nakon informiranog pristanka roditelja. Materijali za DNA analizu dobiveni su iz limfocita periferne krvi u pacijenata pedijatrijske dobi u rasponu od 4 mjeseca do najstarijeg pacijenta s 18 godina i 6 mjeseci, koristeći pritom standardne postupke uzimanja uzoraka. Minimalni kriterij za genetičku obradu pacijenata bila je postavljena dijagnoza epilepsije u pedijatrijskoj dobi. Ujedno, svi podatci za analizu prikupljeni su u Neurološkoj ambulanti Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Rijeka. Važno je spomenuti da je broj ispitanika s dijagnosticiranom epilepsijom u danom razdoblju na KBC-u Rijeka daleko veći, ali da nisu uključeni u ovo istraživanje jer se u njih odlučilo za drugu metodu genetičkog testiranja.

Prikupljeni podatci analizirani su metodom NGS-a u sklopu koje nije analiziran cijeli genom pacijenata već samo određeni geni za koje se smatra da utječu na pojavu epilepsije, takozvani paneli. Broj i odabir gena u panelu varira ovisno o kriterijima laboratorija u kojem su analiziraju podatci. U sklopu ovog istraživanja DNA ispitanika poslana je u 3 takva laboratorija: Odjel za funkcionalnu genomiku KBC-a Zagreb, CeGaT i Blueprint Genetics. Većina podataka (čak njih 33 od sveukupno 47) obrađena je u Zagrebačkom laboratoriju, 9 u Blueprint Genetics laboratoriju u Helsinkiju i svega 5 u Njemačkom laboratoriju CeGaT. 145 gena rutinski se obrađuje u sklopu panela za epilepsiju u KBC-u Zagreb te 195 gena je zahvaćeno u Blueprint Genetics Beyond Pediatric Epilepsy panelima. CeGaT u svojem laboratoriju za genetsko testiranje pokriva 670 različitih gena povezanih s epilepsijom te metaboličkim i neurorazvojnim poremećajima. Broj testiranih gena ovisi o pacijentovom

fenotipu i mogu biti zatraženi individualno ili u kombinaciji s drugim setovima gena. Kao dodatak moguće je i testiranje mtDNA pacijenta.

#### **4. REZULTATI**

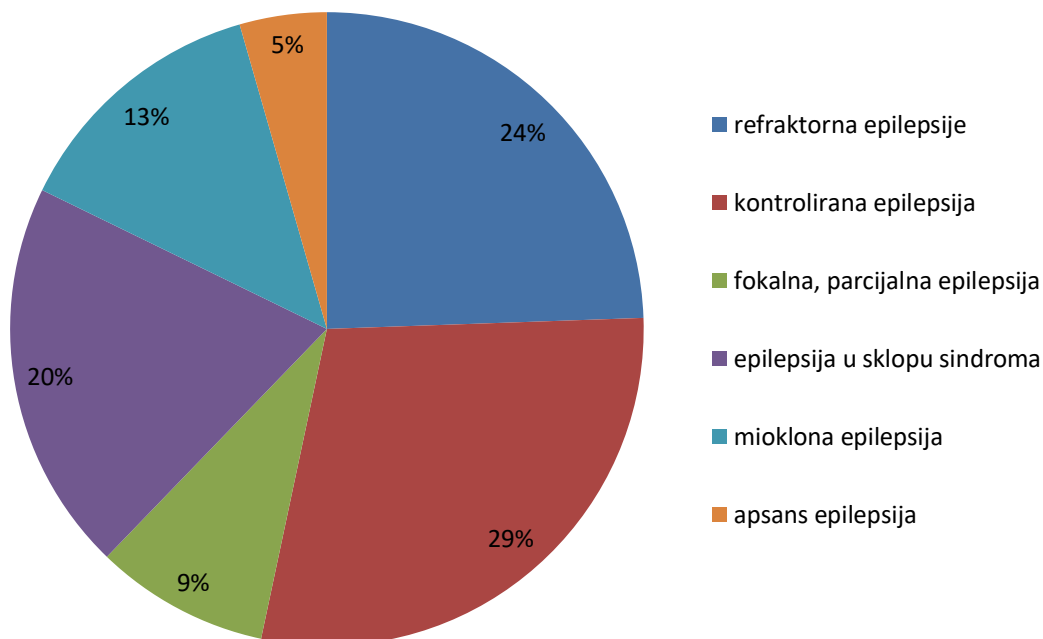
Tijekom razdoblja od 2 i pol godine, počevši od prvog prikupljenog uzorka uključenog u ovo istraživanje 17. studenog 2016. godine, uzeto je sveukupno 47 uzoraka za gensku analizu. U vrijeme pisanja ovog rada rezultati su pristigli za 31 (66%) uzorak u vremenu pisanja ovog rada.

Godine ispitanika znatno variraju i uključuju raspon od najmlađeg ispitanika s 4 mjeseca do najstarijeg s 18 godina i 6 mjeseci. Od 47 ispitanika, 5 (11%) je dojenčadi (ispod jedne godine života), 33 (70%) ih je mlađe od 10 godina i sukladno s tim 14 (30%) starije od 10 godina.

Najčešća postavljena dijagnoza ispitanika bila je refraktorna epilepsija s incidencijom od 23% (11 slučajeva). Drugu najčešća dijagnozu čine kontrolirane epilepsije s pojavnošću u 8 slučajeva (17%). Sve dijagnoze ispitanika mogu se vidjeti u priloženom grafikonu.



## Podjela klinički dijagnosticiranih epilepsija



Slika 1 : Podjela epilepsija pronađenih u istraživanju s obzirom na kliničku dijagnozu.

U 19 ispitanika (61%) ovom metodom utvrđeno je postojanje genskih promjena dok u njih 12 (39%) nije utvrđena nikakva promjena u genetskom materijalu. Od sveukupnog broja ispitanika u kojih je uočena promjena gena za njih 12 (63%, što je detektabilnost od 39%) smatra se da imaju mutaciju koja je povezana s pojavom epilepsije, dok se u njih 7 (37%) smatra se da imaju mutacije nepoznatog kliničkog značaja. Od osoba u kojih su utvrđene genske promjene koje utječu na pojavu epilepsije u 6 (50%) njih su nađene multiple genske promjene u odabranim panelima od kojih se barem za jednu varijaciju smatra da utječe na epileptogenost.

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je petero djece dojenačke dobi u kojih je postavljena dijagnoza epilepsije. Rezultati su pristigli za četvero njih od kojih se u dvoje (50%) našla neka genska promjena za koju se smatra da uzrokuje epileptičke napadaje.

Nakon obrade podataka pronađeno je 14 varijanti za koje se smatra da uzrokuju epilepsiju kroz 11 različitih mutiranih gena u 12 ispitanika. Na temelju danih podataka, dijagnostički prinos panela, u ovom istraživanju, iznosi 39%. Patogeno promijenjeni geni su: SLC2A1 (n=1), VARS2 (n=2), CACNA1A (n=1), KCNMA1 (n=1), RELN (n=1), CDKL5 (n=2), KCNA2 (n=1), KCNQ2 (n=1), POLG (n=2), SCN8A (n=1) i COG7 (n=1). Među danim genima identificirano je 11 pogrešnih varijanti (79%) te po jedna s pomakom okvira čitanja, besmislena i delecijaska varijanta

Pregled svih detektiranih varijanti nalazi se u tablici 3.

Tablica 3. Pregled patoloških mutacija poredanih po dobi pacijenata

| <b>SPOL</b> | <b>DOB</b> | <b>ZAHVAĆEN GEN</b> | <b>PATOLOŠKA VARIJANTA</b>      | <b>CDNA</b>                  |
|-------------|------------|---------------------|---------------------------------|------------------------------|
| m           | 4m         | KCNMA1              | pogrešna                        | c.34A>G                      |
| ž           | 8m         | VARS2               | pomak okvira čitanja i pogrešna | c.603_606dupGATG i c.1100C>T |
| m           | 1g1m       | COG7                | pogrešna                        | c.2266C>T                    |
| m           | 2g4m       | CACNA1A             | delecija                        | c.976-69_1082+70             |
| ž           | 3g1m       | CDKL5               | pogrešna                        | c.745-1G>C                   |
| ž           | 3g2m       | KCNA2               | pogrešna                        | c.298C>T                     |
| ž           | 3g7m       | POLG                | 2 pogrešne                      | c.926G>A i c.2209G>C         |
| ž           | 3g11m      | RELN                | pogrešna                        | NM_005045.3                  |
| ž           | 10g7m      | SCN8A               | pogrešna                        | c.1475G>A                    |
| m           | 11g1m      | KCNQ2               | besmislena                      | c.1741C>T                    |
| m           | 12g7m      | SLC2A1              | pogrešna                        | c.694c>T                     |
| m           | 13g        | CDKL5               | pogrešna                        | c.533G>A                     |

Većina mutiranih gena pronađenih u ovom istraživanju spadaju među najučestalije mutirane gene u patogenezi epilepsije i učestalo se pronalaze u mnogim drugim radovima (12-16). Neke od takvih mutacija su zasigurno one koje zahvaćaju SCN8A i KCNQ2 gene koji su pronađeni i u ovom istraživanju. Pacijentici sa između ostaloga, perinatalnim inzultom detektiran je mutiran SCN8A gen (c.1475G>A) te heterozigot za danu mutaciju. Genetskom analizom uočena je ista mutacija u oca koji je isto heterozigot za danu mutaciju. S druge strane, jedina besmislena varijanta pronađena u ovom istraživanju zahvaća KCNQ2 gen (c.1741C>T). Ona rezultira translacijskim stop kodonom KCNQ2 gena uzrokujući abnormalnu funkciju proteina, odnosno neonatalne konvulzije.

Pogrešna varijanta pronađena je SLC2A1 (c.694c>T) genu u pacijenta s prethodno dijagnosticiranom refraktornom apsans epilepsijom. Ovakav nalaz ukazuje na idiopatsku generaliziranu epilepsiju koja se autosomno dominantno nasljeđuje i ima nepotpunu penetrantnost, što korelira s prethodno dijagnosticiranim kliničkim nalazom.

CDKL5 gen je jedini gen čije dvije patogene varijante su nađene u 2 različita ispitanika ( c.745-1G>C i c.533G>A). Ujedno, obje detektirane varijante su heterozigotne pogrešne varijante nastale de novo. Jedna od osoba zahvaćena mutacijom je trogodišnja djevojčica s opterećujućim kliničkim statusom koji obuhvaća: epileptičke napadaje te motornu, govornu i kognitivnu zaostalost. Koristeći genske panele u pacijentice nije uočena mutacija. Nakon takvog nalaza podvrgnuta je sekvenciranju egzoma gdje je uočena mutacija već spomenutog gena (c.745-1G>C) te je naknadno potvrđena Sangerovim sekvenciranjem. Druga osoba zahvaćena mutiranim CDKL5 genom (c.533G>A) je trinaestogodišnji dječak s pogrešnom varijantom koja je utjecala na pojavu rane epileptičke encefalopatije.

Pronađena heterozigotnost za deleciju c.976-69\_1082+70 u CACNA1A genu egzona 7 smatra se da je uzrok pacijentovih mioklonično-atoničnih napadaja s ataksijom, hemiparezom

i zaostalošću u govornom razvoju. Delecija obuhvaća 242 parova baza i rezultirala je gubitkom funkcije gena. U obitelji se ne nalaze navedene tegobe.

U četvero-mjesečnog dječaka, prethodno dijagnosticiranog sa Otahara sindromom kojeg prati intelektualna zaostalost i hipotonija, sekvenciranjem gena uključenih u panel detektirana je heterozigotna pogrešna varijanta KCNMA1 gena (c.34A>G). Ona se povezuje s generaliziranom epilepsijom i paroksizmalnom diskinezijom koja nastaje zbog bržeg „okidanja“ neurona usred mutacije kalcijevog kanala.

Po dvije patogene mutacije jednog gena u iste osobe pronađene su u dvije pacijentice. Mutacije POLG gena pronađene su u trogodišnje pacijentice s miocerebrohepatalnim spektrom poremećaja. Zanimljivo je da su obje patogene varijante heterozigotne pogrešna mutacije: c.926G>A i c.2209G>C te da svaka potječe od jednog roditelja (c.926G>A od majke, a c.2209G>C od oca). Pronađene mutacije, povišene transaminaze, patološki EEG te gubitak govornih sposobnosti visoko su indikativni za pacijentičin opisan sindrom. S druge strane, heterozigotne varijante c.603\_606dupGATG i c.1100C>T VARS2 gena pronađene su u osmomjesečne pacijentice s progresivnom epileptičkom encefalopatijom, zastojem u razvoju, hipertrofičnom kardiomiopatijom, nistagmusom, mikrocefalijom, hipotonijom i ostalo. Kao i u prethodne pacijentice jedna varijanta naslijeđena je od majke (c.603\_606dupGATG, mutacija pomaka okvira čitanja), a druga od oca (a c.2209G>C, pogrešna mutacija).

Jedina homozigotna varijanta opisana je u trinaestomjesečnog dječaka sa COG7 pogrešnom mutacijom gena (c.2266C>T) gdje su oba roditelja bili heterozigotni nosioci ove varijante. Uz ovu mutaciju pronađeno je dodatnih 6 varijanti mutacija kroz 3 različita gena (DNAH17, FLNB i XYLT1) za koje se ne može isključiti patogenosti te njihov doprinosi teškom fenotipu djeteta. Naime, ova bialelna patogena varijanta COG7 gena, potencijalno s

ostalim pronađenim mutacijama, uzrok je poremećaja glikozilacije koja se klinički manifestira s atrofijom mozga, hipertrofijom lijeve klijetke, respiratornim distresom i slično.

U trogodišnje djevojčice s familijarnom povijesti epilepsije, klinički je dijagnosticirana mioklona epilepsija. Primjenjujući slikovne metode pretrage mozga uočena je njegova atrofija uz demijelinizaciju. Ovakav nalaz rezultat je multiplih pronađenih mutacija od kojih se samo ona na KCNA2 genu smatra patološkom. Riječ je o heterozigotnoj varijanti (c.298C>T) koja uzrokuje uranjenu pojavu STOP kodona i pri tome stvara disfunkcionalni kalcijev proteinski kanal koji se inače normalno eksprimira u centralnom živčanom sustavu.

Na kraju, identificirana je heterozigotna pogrešna varijanta RELN gena koja se povezuje s familijarnom epilepsijom temporalnog režnja 7. Ova mutacija pronađen je u trogodišnje pacijentice i korespondira s kliničkom slikom pacijentice, manifestirajući se s fokalnim epilepsijama i slušnim aurama.

## **5. RASPRAVA**

Ovim istraživanjem željelo se prikazati udio i presjek genetskih promjena u epilepsiji dječje dobi dobivenih metodom NGS-a u periodu od 2 i pol godine na Klinici za pedijatriju u Rijeci te usporediti rezultate istoimene Klinike s rezultatima dobivenim u drugim sličnim istraživanjima.

U ovom istraživanju sudjelovalo je 40 pacijenata sa različitim tipovima epilepsija u kojih se sumnjalo na genetsku podlogu bolesti. Koristeći genetske panele uočene su patogene varijante mutacija u 39% ispitanika. U usporedbi ovih rezultata s rezultatima već provedenih sličnih istraživanja zaključeno je da rezultati istraživanja značajno variraju iznoseći između 10 i 48% detektabilnosti (12-16). Usprkos tako različitim rezultatima, može se zaključiti da su

dobivene vrijednosti ovog istraživanja unutar okvira referentnih vrijednosti drugih radova. Štoviše spadaju u njegov gornji dijagnostički spektar detektabilnosti što se može pridodati dobrom odabiru pacijenata u kojih može biti korisno genetsko testiranje te korištenju panela triju priznatih Europskih laboratorija. Razlog tako velikih odnaka u rezultatima može se pripisati značajnim razlikama u broju ispitanika među studijama te korištenju različitih panela gena u svakom istraživanju.

U ovom istraživanju nađene su patološke varijante u ovim genima: SLC2A1, VARS2, CACNA1A, KCNMA1, RELN, CPT2, CDKL5, KCNA2, KCNQ2, POLG i SCN8A. Svi od ovih gena već su opisani kao uzroci epilepsija pedijatrijske dobi.

Većina citoplazmatskih i mitohondrijalnih aminoacil-tRNA sintetaza kodiraju nuklearni geni. Jedan od takvih je i VARS2 gen zaslužan upravo za kodiranje mitohondrijske valin-tRNA sintetaze. Ovaj enzim važan je u procesu mitohondrijske translacije katalizirajući povezanost Valina sa tRNA. Mutacija u VARS2 genu uzrokuje defekte u oksidativnoj fosforilaciji i rani razvoj progresivne autosomno recesivne mitohondrijalne encefalopatije popraćene sa psihomotornim zaostajanjem u razvoju, facijalnom dismorfijom, mikrocefalijom i slično. U ove osmomjesečne djevojčice pronađena je varijanta pomaka okvira čitanja naslijeđena od majke te pogrešne varijante naslijeđena od oca. Za ove mutacije smatra se da su obje patogene iako varijanta pomaka okvira čitanja (c.603\_606dupGATG) nije do sada opisana. pogrešna varijanta (c.1100C>T) naslijeđena je od oca koji je heterozigotni nosioc. Ova varijanta opisana je u nekolicini radova. U jednom od njih pronađena je u homozigotičnog pacijenta koji je razvio psihomotornu zaostalost, facijalni dismorfizam, mikrocefaliju te epileptičke napadaje (17). U drugom radu pronađena je u heterozigota uz dodatnu pogrešnu varijantu. Taj pacijent je razvio fokalne epileptičke napadaje te se prezentirao sa mikrocefalijom, hipoplazijom corpus callosa i cerebelluma te teškom hipertrofičnom kardiomiopatijom (18). Slična klinička slika našla se u ispitanice koju

obuhvaća ovaj rad, prezentirajući se sa slikom epileptičkih napadaja popraćenih s hipertrofičnom kardiomiopatijom, hipotonijom, dismorfijom lica, mikrocefalijom te zaostajanjem u razvoju. Izgleda da mutacija ovog gena utječe na razvoj teške kliničke slike koja između ostaloga uključuje progresivni razvoj epilepsije, mentalnu retardaciju u pacijenta, dismorfije lica i slično. Ujedno, pošto su oba roditelja nositelji mutiranog gena potrebno je predložiti gensko savjetovanje roditelja prilikom mogućih sljedećih trudnoća.

Postojanje bolesti koje se nemaju nikakvu specifičnu kliničku sliku, elektroencefalografski ili slikovni prikaz, predstavlja panele kao najbolji prikaz razumijevanja patofiziološkog mehanizma nastanka epilepsije. Takve bolesti uključuju promjene na genima odgovornim za izmjenu iona na membranama stanica. Gena koji su odgovorni za nastanak kanalopatija, a pronađeni su mutirani u ovom istraživanju te se smatraju odgovornim za klinički fenotip pacijenta su: KCNA2, CACNA1A, SCN8A, KCNQ2 i KCNMA1 gen. Kao što je prikazano pet od sveukupno jedanaest mutiranih gena odgovornih za nastajanje epilepsije otkriveno je ovim istraživanjem. Čineći gotovo polovinu (45%) mutiranih patoloških gena lako je zaključiti važnost njihovog pravilnog funkcioniranja u patogenezi epilepsije te se stoga ovi, a i brojni drugi geni odgovorni za kanalopatije redovno uključuju u ciljane genske panele. Pronađena su 3 mutirana gena odgovorna za stvaranje kalijevog naponskog kanala eksprimiranog u središnjem živčanom sustavu: pogrešne mutacije za KCNA2, KCNMA1 te KCNQ2 gena. Mutacija KCNA2 gena je kanalopatija koja utječe na pojavu epilepsije u ranoj dječjoj dobi, u ovom slučaju s 3 godine i 2 mjeseca. U ove trogodišnje djevojčice uz ovu heterozigotnu pogrešnu mutaciju pronađena je i delecija AMT gena nepoznate važnosti. Dane mutacije popraćene su atrofijom mozga uz pojavu demijelinizacije. Navodi se da je u obitelji postojala sklonost epilepsiji no ona nije dalje istražena. Pronađena mutacija rezultira uranjenom pojavom stop kodona koji dovodi do gubitka funkcije proteina. Naime, protein koji se sintetizira je alfa-podjedinica i dio je Kv1

obitelji kalijevih kanala odgovornih za repolarizaciju stanice nakon prolaska akcijskog potencijala. Epilepsije koje se javljaju ovim poremećajem prvi put se uočavaju između 5 i 17 mjeseci i nestaju u periodu između 4 i 15 godina. Nadalje, one se dobro kontroliraju antiepileptičkim lijekovima no znaju biti popraćene zaostajanjem u razvoju koji ostaje i nakon prolaska epilepsije zajedno uz ataksiju, tremor, mioklonus i zaostajanjem u govoru (19).

Othara sindrom, nazvan i rana epileptička encefalopatija, encefalopatija je rane dječje dobi koja se manifestira s pojavom toničko-kloničkih grčeva u prvim mjesecima života i karakterističnim EEG zapisom. Napadaji su često farmakorezistentni i nerijetko se javljaju u serijama. Iako se za ovaj sindrom katkad ne može naći uzrok, najvjerojatniji uzroci su malformacije mozga, metabolički poremećaji te mutacije gena. Potonje je uzrok sindrom u djeteta obuhvaćenog u ovom istraživanju. Naime, pogrešna mutacija KCNMA1 gena, koji kodira kalijeve kanale u membrani stanica, smatra se da utječe na ispitanikovu pojavu epilepsije i uzrokuje Otahara sindrom. Varijanta koja je pronađena u ovog četveromjesečnog dječaka povezuje se s izrazito ranom pojavom generalizirane epilepsije i paroksizmalne diskinezije (20). Pronalazak ovakav nalaz ne mijenja protokol liječenja niti služi za dijagnostiku Otaharinog sindroma, ali zato nudi bolji uvid u razumijevanje bolesti, kako roditeljima djeteta, tako i kliničarima te znanstvenicima.

Kao i prijašnji gen, KCNQ2 je zadužen za kodiranje kalijevih naponskih kanala u mozgu. Mutacije ovog gena uzrokuju autosomno dominantno naslijeđene novorođenačke epilepsije koje su u ovom istraživanju pronađene u jedanaestogodišnjeg dječaka. Pogrešna varijanta ovog gena djeluje na preuranjenu pojavu translacijskog stop kodona uzrokujući abnormalnu funkciju proteina. Mutacije u KCNQ2 genu su mnogobrojne uzrokujući pritom širok spektar heterogenog fenotipa, no svima je zajednička neonatalna prisutnost epilepsija. Kao i u ovog ispitanika, konvulzije koje se javljaju mutacijama ovog gena obično prolaze nakon prve godine života sa i bez terapije (21). Usprkos takvom saznanju, epilepsije nastale mutacijom



ovog gena mogu se kontrolirati sa retigabinom. Radi se o lijeku iz nove skupine antikonvulziva koji je savršeni predstavnik gen-specifične terapije te čini genetsko testiranje izrazito korisnim u bolesniku za kojih se sumnja na mutacije ovog gena.

CACNA1A gen odgovoran je za stvaranje alfa-1 podjedinice kalcijevog kanala nazvane CaV2.1 koja stvara prolaz u kanalu kroz koju prolaze ioni kalcija. Upravo oni odgovorni su za komunikaciju između neurona djelujući na kontrolu otpuštanja neurotransmitera. Nepravilan razvitak kanala dovodi do širokog spektra kliničkih nalaza; od ataksije do epilepsije. U ovom istraživanju pronađena je de novo delecija 7. kromosoma c.979-69\_1082+70 koja je uzrokovala mutaciju u CACNA1A genu rezultirajući pojavom epilepsije već u 3. godini života. Ovakva varijanta mutacije do sada još nije opisana, a potvrđena je koristeći kvantitativni PCR. Opisane su druge varijacije istog gena koje su dovele do pojave epilepsija. U jednom od objavljenih istraživanja u troje braće i sestara, uočena je drugačija varijacija mutiranog CACNA1A gena u kojoj su se epileptički napadaji javili u značajnije kasnijoj dobi, do 20. godine života (22). To se može pripisati blažem obliku mutacije koja se pojavljuje u danom istraživanju naspram one pronađene u ovom istraživanju gdje je zbog ovako velikog pomaka okvira čitanja, usred delecije, potpuno izgubljena funkcija gena. Patologija koju isplavljava mutacija CACNA1A gena nasljeđuje se autosomno dominantno zbog čega svako dijete nositelja mutacije ima 50% šanse da naslijedi ovakvu varijantu. Ususret ovakvim saznanjima, genetsko savjetovanje i testiranje članova obitelji treba biti preporučeno.

Natrij predstavlja jedan od ključnih iona središnjeg živčanog sustava. Njegov prelazak u živčane stanice iz vanstaničnog medija predstavlja glavni mehanizam stvaranja električnog potencijala kao i njegov prolazak duž njenih živčanih završetaka. Jedina kanalopatija koja zahvaća natrijski transport nastala je mutacijom SCN8A gena (c.1475G>A) pronađena u desetogodišnje pacijentice sa širokim kliničkim nalazom i povijesti bolesti. Uz perinatalni

inzult, parezu lijeve ruke, trombofiliju i toničko-kloničke napadaje na MRu je pronađen smanjen kortikalni volumen, uz smanjene strukture mozga poput corpus callosa, nucleusa chordatae talamusa i povećanog prostora u kojem se nalazi cerebrospinalni likvor. NGSom su otkrivene mutacije 3 gena: SCN8A, HTRA1 i SPTAN1 gena od kojih se jedino heterozigotna pogrešna mutacija SCN8A gena smatra kao jedina koja potencijalno uzrokuje ovaj fenotip. Ona je naslijeđena od oca koji je isto heterozigot za danu mutaciju, a do sada nije zabilježena niti jedna ista varijante mutacije danog gena.

Nekoliko proteina odgovorno je za migraciju živčanih stanica odnosno za normalan razvoj i funkciju mozga. Dva gena koja su zadužena za formiranje takvih proteina pronađena su mutirana u ovom istraživanju. Heterozigotna pogrešna varijanta RELN gena pronađena u genskom testiranju odgovorna je za pojavu familijarne epilepsije temporalnog režnja tipa 7 u djevojčice s nepune četiri godine. Relin, protein koji kodira RELN gen, odgovoran je za normalan razvoj mozga. Njegova mutacija uzrokuje brojne kliničke sindrome uključujući i mioklonalno-distonični, koji je pronađen u ove pacijentice. Druga pacijentica isto je razvila epileptički sindrom tijekom četvrte godine života, no on je uzrokovan mutacijom CDKL5 gena (c.745-1G>A) na X kromosomu, čineći je X vezanom bolešću. Zanimljivo je da su u 90 posto slučajeva zahvaćene osobe ženskog spola što je i ovdje slučaj. Identična varijacija nije pronađena u literaturi i bazama podataka no opisane su slične mutacije. Defekt ovog gena uzrokuje epileptičke napadaje koji počinju u ranom djetinjstvu te je popraćena sa značajnim zastojima u mnogim aspektima razvoja. Napadaji se mijenjaju ovisno o dobi, obično po već dobro poznatoj šablona te su nerijetko farmakorezistentni. Nažalost, do danas nije nađena pravilna terapija u pacijenata s ovom mutacijom (23).

Najstariji pacijent za kojeg su utvrđene patološke varijante gena unutar panela, a za koje se sumnja da utječu na pojavu epilepsije ima 13 godina i prethodno mu je dijagnosticirana refraktorna epileptička encefalopatija. Panelima mu je utvrđena pogrešna varijanta CDKL5

gena koji je prethodno opisan. Ova varijanta prethodno je opisana u literaturi kao de novo mutacija povezana s ranom epileptičkom encefalopatijom (24).

Očuvani oligomerni Golgijev kompleks (eng. conserved oligomeric Golgi complex-COG) sudjeluje u glikozilacijskim reakcijama i vezikalnom transportu. Mutacija u COG7 genu stvara defektnu podjedinicu COG kompleksa onemogućujući opisani proces. Jednogodišnjak u kojeg je detektirana ova mutacija (c.2266C>T) homozigot je za danu mutaciju. Ona je nadalje, potvrđena u oba roditelja koji su njeni heterozigotni nositelji. Uz ovu varijaciju pronađeno je 6 varijacija kroz 3 mutirana gena: DNAH17, FLNB i XYLT1 za koje se ne zna da li utječu na kliničku sliku pacijenta. Prvenstveno mutacija u COG7 genu, a potencijalno i u ostalima, uzrokuje tešku kliničku sliku u ovog pacijenta prezentirajući se sa: glomerulonefritisom s nefrotičkom proteinurijom, povećanom jetrom, hipotonijom, hipertrofijom lijeve strane srca, intersticijskim promjenama pluća, displastičnom eritropoezom, epileptogenim nalazom na EEGu i kortikalnom atrofijom na MRu.

SLC2A1 je gena odgovornog za kodiranje proteina (GLUT1) važnog u transmembranskom transportu glukoze i to prvenstveno na krvno-moždanoj barijeri te glija stanicama. Upravo mutacija toga gena pronađena je u dvanaestogodišnjeg dječaka kojem je prethodno dijagnosticirana farmakorezistentna (refraktorna) epilepsija. Primjer ovakve mutacije reprezentativan je primjer izvrsnosti korištenja panela u poboljšanju kliničkog tijeka bolesti. Naime, pacijenti u kojih je rano dijagnosticiran ova gensku mutacija u mogućnosti su započinjanja promptnih mjera reguliranja glukoze poput ketogene dijeta koje značajno utječu na njihov neurorazvojni ishod. Osim SLC2A1 gena brojni paneli uključuju sekvenciranje mnogih drugih gena čije mutacije također uzrokuju metaboličko-epileptičke sindrome koji se mogu liječiti, ali i druga stanja koja uzrokuju epilepsiju.

Djevojčica s 3 godine imala je poremećaj u razvoju govora i jezika. Uz ovaj nalaz i povećane jetrene enzime te epileptogeni zapis na EEG-u dijagnosticiran je miocerebrohepatalni sindrom. U panelima su nađene dvije naslijeđene pogrešne mutacije POLG gena obje naslijeđene od roditelja. POLG gen odgovoran je za replikaciju humane mitohondrijske DNA kodirajući katalitičku podjedinicu mitohondrijske DNA polimeraze  $\gamma$ . Imajući na umu da je to jedini enzim koji je aktivan u mitohondriju, a da može replicirati mitohondrijsku DNA, njegova mutacija uzrokuje široki spektar mitohondrijskih bolesti u pacijenata svih životnih dobi. Mutacija ovog gena uzrokuje brojna stanja kojima su zajednički mnogi simptomi i znakovi koji uključuju mišićne, živčane i moždane funkcije (25) Varijanta naslijeđena od majke (c.925G>A) prethodno je u literaturi opisana kao varijanta povezana s disfunkcijom jetre i encefalopatijom (26) i kao takva mogla bi biti glavni uzrok patologije pacijentice. Varijanta naslijeđena od oca (c.2209G>C) isto je prethodno opisana kao uzrok encefalopatije u brojnim stanjima koja se povezuju s ovim genom poput Alpers-Huttenlocherovog sindroma, ataksijsko neuropatijskim spektrom bolesti i slično.

Manjak genske mutacije odgovorne za pojavu bolesti pronalazi se u ovom istraživanju u 67% slučajeva što se prepisuje tome da uzročni geni nisu obuhvaćeni u odabranim panelima, uzrok koji se pronalazi poligenskom nasljeđivanju, kromosomskim aberacijama, CVV-a ili se sumnja da određena postojana mutacija ne korelira s pacijentovim fenotipom. Imajući takve rezultate na umu, potrebno je spomenuti da u usporedbi s prethodno već provedenim sličnim istraživanjima ovaj rezultat prikazuje usporedne dijagnostičke mogućnosti genskih panela (12-16).

Imajući na umu nemogućnost obrade svih gena panelima već samo najučestalije postavljaju se pitanje valjanost upotrebe WGS-a u određivanju genske podloge epilepsije u pedijatriji. Pregledavajući objavljene radove uočena je široka dijagnostička vrijednost otkrivanja patogene mutacije, krećući se ovisno o istraživanju između 11% i 72%. Iz ovih podataka ipak

se može iščitati veća vjerojatnost pronalaženja gena odgovornih za patološki mehanizam nastanka epilepsije u odnosu na korištenju panela gdje je nađena najviša detektabilnost u istraživanjima iznosila 48% (12). Jasno je da WGS doprinosi točnijem pronalasku uzroka epilepsije, ali njegove trenutačne mane, u vidu težeg interpretiranja nalaza s obzirom na veću učestalost mutacija nepoznatog značaja i znatno veće cijene, istiskuju panele kao metodu izbora. Ipak, korištenje WGS-a doprinosi boljem razumijevanju uzroka epilepsije i kao takvo omogućuje identificiranje novih gena kandidata za uzrok epilepsije koji bi se trebali svrstati u panele. Ujedno, njegova prednost leži u dijagnosticiranju kompleksnih genetskih poremećaja obuhvaćajući gene koji nisu uključeni u panele.

Ovo istraživanje podržava rezultate dijagnostičkih mogućnosti panela u pacijenata s epilepsijom iznesenih u posljednjim istraživanjima (12,14). Nadalje, zbog nemogućnosti klasificiranja određenog broja epilepsija paneli predstavljaju idealnu metodu za istraživanje bez hipoteze nudeći pri tome objektivne nalaze.

## **6. ZAKLJUČAK**

U ovom retrospektivnom istraživanju etiologije epilepsije genetski uzroci odgovorni za njenu pojavu otkriveni su u 39% slučajeva. Kao uzrok etiologije epilepsije u ovom istraživanju zahvaćeno je 11 gena u kojih se samo u 2 pacijenta nalaze mutacije na istom genu, ukazujući na potencijalnu široku etiologiju epilepsije kao genske bolesti. Iako za većinu genetskih mutacija povezanih s epilepsijom ne postoji specifično liječenje za neke koje su uočene i u ovom istraživanju ipak postoji. Stoga, rano identificiranje gena odgovornih za pojavu epilepsije u pedijatrijskih pacijenata nudi bolji uvid u prognozu bolesti te individualizirani terapijski pristup. Sekvenciranjem cijelog genoma i egzoma bi najvjerojatnije povećali dijagnostički prinos u ovih pacijenata no zbog skupocjenosti i

dugotrajnosti još uvijek nisu pristupačni. Usprkos nevedenome njihovim korištenjem konstantno se pronalaze novi geni odgovorni za epilepsiju koji se naknadno uvrštavaju u panele gena. Otkrivanjem podležećih genskih uzroka dobivamo nove uvide u patogenezu epilepsije, čime se omogućuje razvoj ciljanih neuroprotektivnih terapijskih lijekova koji bi značajno mogli popraviti ishode u pacijenata s epilepsijom

## 7. SAŽETAK

**Uvod.** 1982. godine pronašla se je dugo pretpostavljena poveznica između epilepsije i njene genske podloge. Od tada, napredokom ostalih genetičkih metoda, a prije svega NGS-a, otkriva sve veći broj gena odgovornih u etiologiji epilepsije

**Svrha rada.** Ovim istraživanjem željelo se prikazati udio i presjek genetskih promjena u epilepsiji dječje dobi dobivenih metodom NGS-a u periodu od 2 i pol godine na Klinici za pedijatriju u Rijeci te usporediti rezultate istoimene Klinike s rezultatima dobivenim u drugim sličnim istraživanjima.

**Metode.** Istraživanje je provedeno retrospektivno tijekom razdoblja od 2 i pol godina počevši s prvim uzimanjem podataka za analizu 17. studenog 2016. godine sa zaključno zadnjim prikupljenim podatkom 3. svibnja 2019. godine. Tijekom ispitivanog razdoblja broj ispitanika koji je sudjelovao u ovom istraživanju iznosi 47 od kojih su za vrijeme pisanja rada pristigli rezultati za njih 31. Ispitanicima je uzorkovana krv, odakle je poslana u 3 laboratorija za genetska testiranja: Odjel za funkcionalnu genomiku KBC-a Zagreb, CeGaT i Blueprint Genetics.

**Rezultati.** Analiziran je uzorak krvi od 31. ispitanika pri čemu je uredan nalaz od njih 12 dok se u 19 nalazi genska promjena od kojih se za 12 smatra da utječe na pojavu epilepsije.

Ukupni dijagnostički prinos genskih panela kao dijagnostičke metode korištene u ovom istraživanju iznosi 39%.

**Zaključak.** Uporaba panela predstavlja solidnu metodu koja doprinosi dijagnosticiranju epilepsije, čijom se sve češćom primjenom zajedno s WES-om i WGS-om konstantno povećava njen dijagnostički prinos. Ovom metodom omogućuje se korištenje gen-specifične terapije koja znatno pridonosi pacijentovom ishodu te omogućuje razvitak nove.

## 8. SUMMARY

**Introduction.** In 1982, a long-supposed link between epilepsy and its genetic background was found. Since then, the advancement of other genetic methods, primarily NGS, reveals an increasing number of genes responsible for the etiology of epilepsy

**Aim.** The aim of this research was to show the share and the cross section of genetic changes in the epilepsy of children during the period of 2 and a half years at the Pediatric Clinic in Rijeka, as well as to compare these results with those obtained in other similar studies.

**Methods.** The research was conducted retrospectively over a period of 2 and a half years starting from November 17, 2016, and finishing on 3 May 2019. During the study period, the number of respondents who participated in this study was 47 out of which at the time of writing results came for 31 of them. The sample for genetic analysis was obtained from blood and then sent to 3 genetic testing laboratories: Functional Genomic Department of KBC Zagreb, CeGaT and Blueprint Genetics.

**Results.** Blood samples were analyzed from 31 subjects, with no findings in 12 while in 19 genetic changes have been found. In 12 subjects genetic mutations responsive for appearance

of epilepsy were found. The total diagnostic yield of the genetic panels, as diagnostic method used in this study, is 39%.

**Conclusion.** The use of the panel represents a solid method in contribution to diagnosis of epilepsy. Its frequent application, together with WES and WGS, raises its diagnostic yield. This method allows the use of gen-specific therapy that significantly contributes to the patient's outcome and enables the development of a new one.

## 9. LITERATURA

1. England MJ, Liverman CT, Schultz AM, Strawbridge LM. Epilepsy across the spectrum: promoting health and understanding. Washington DC: National Academies Press; 2012.
2. Ingrid E. Scheffer Samuel Berkovic Giuseppe Capovilla Mary B. Connolly Jacqueline French Laura Guilhoto i sur. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 2017;58(4):512-521.
3. Annegers JF, Hauser WA, Anderson VE, Kurland LT. The risks of seizure disorders among relatives of patients with childhood onset epilepsy. *Neurology*. 1982;32:174–179.
4. Hildebrand MS, Dahl HH, Damiano JA, Smith RJ, Scheffer IE, Berkovic SF. Recent advances in the molecular genetics of epilepsy. *J Med Genet*. 2013;50:271–279.
5. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, et al: Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51:676-685. (2010).



6. Poduri A., Rosen Sheidley B., Shostak S. i Ottman R. Genetic testing in the epilepsies —developments and dilemmas. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(5):293–299.
7. Lehmann A, Speight BS, Kerzin-Storarr L. Extended family impact of genetic testing: the experiences of X-linked carrier grandmothers. *J Genet Couns.* 2011;20:365–373.
8. Douglas HA, Hamilton RJ, Grubs RE. The effect of BRCA gene testing on family relationships: a thematic analysis of qualitative interviews. *J Genet Couns.* 2009;18:418–435.
9. Jacoby K, Jacoby A. Epilepsy and insurance in the UK: an exploratory survey of the experiences of people with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2004;5:884–893.
10. Burke W, Pinsky LE, Press NA. Categorizing genetic tests to identify their ethical, legal, and social implications. *Am J Med Genet.* 2001;106:233–240.
11. National Institute for Health and Care Excellence. Epilepsies: diagnosis and management (Internet). April 2018. (citirano 6. Lipnja 2019.). Dostupno na: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg137/chapter/Key-priorities-for-implementation>
12. Laura Ortega-Moreno , Beatriz G. Giráldez , Victor Soto-Insuga, Rebeca Losada-Del Pozo, María Rodrigo-Moreno, Cristina Alarcón-Morcillo i sur. Molecular diagnosis of patients with epilepsy and developmental delay using a customized panel of epilepsy genes. *PloS ONE*, 2017;12(11)
13. Johannes R. Lemke Erik Riesch Tim Scheurenbrand Max Schubach Christian Wilhelm Isabelle Steiner i sur. Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia*, 2012;53(8):1387-1398.
14. Møller R.S., Larsen L.H.G. Johannesen K.M, Talvik I., Talvik T., Vaher U. I sur. Gene Panel Testing in Epileptic Encephalopathies and Familial Epilepsies. *Mol Syndromol*, 2016;7:210-219.

15. Hirofumi Kodera , Mitsuhiro Kato, Alex S. Nord, Tom Walsh, Ming Lee, Gaku Yamanaka i sur. Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia*, 2013;54(7):1262-1269.
16. Gemma L Carvill, Sinéad B Heavin, Simone C Yendle, Jacinta M McMahon, Brian J O'Roak, Joseph Cook i sur. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nature genetics*, 2013;45:825-830.
17. Diodato D., Melchionda L., Haack T. B., Dallabona C., Baruffini E., Donnini C. I sur. VARS2 and TARS2 mutations in patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Human Mutation* 2014;35: 983–989.
18. Baertling F., Alhaddad B., Seibt A., Budaeus S., Meitinger T., Strom T. M., i sur. Neonatal encephalocardiomyopathy caused by mutations in VARS2 . *Metabolic Brain Disease* 2017.;32(1):267–270.
19. Syrbe S., Hedrich UBS., Riesch E., Djémié T., Müller S., Møller RS i sur. De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet.* 2015;47(4):393-399.
20. Zhang, Z.-B., Tian, M.-Q., Gao, K., Jiang, Y.-W., Wu, Y. De novo KCNMA1 mutations in children with early-onset paroxysmal dyskinesia and developmental delay. *Mov. Disord.* 2015.;30: 1290-1292.
21. Plouin P, Neubauer BA. Benign familial and non-familial neonatal seizures. In Bureau M, Genton P, Dravet C, et al. (Eds) *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. Montrouge: John Libbey Eurotext, 2012:77–88.
22. Yee-Cheun Chana , Jean-Marc Burgunder, Einar Wilder-Smith, Soh-Eng Chew, Karen M.J. Lam-Mok-Sing i sur. Electroencephalographic changes and seizures in

- familial hemiplegic migraine patients with the CACNA1A gene S218L mutation. *Journal of clinical neuroscience*. 2008;15(8):891-894.
23. Müller A, Helbig I, Jansen C, Bast T, Guerrini R, Jähn J i sur. Retrospective evaluation of low long-term efficacy of antiepileptic drugs and ketogenic diet in 39 patients with CDKL5-related epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016;20(1):147-151.
24. Liang JS., Shimojima K., Takayama R., Natsume J., Shichiji M., Hirasawa K. i sur. CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders. *Epilepsia* 2011;52:1835–1842.
25. Genetics Home Reference. POLG gene (Internet). 28. Svibnja 2019. (citirano 6. Lipnja 2019.). Dostupno na: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/POLG>
26. Horvath R, Hudson G, Ferrari G, Fütterer N, Ahola S, Lamantea E i sur. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain*. 2006;129(Pt 7):1674-1684.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Ivan Jurković rođen je 30.6.1994. u Zagrebu. Završio je Osnovnu školu Rapska 2009., te VII. opću gimnaziju u Zagrebu 2013. sa odličnim uspjehom. Iste godine upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Fakultet je završio u redovnom roku, a za vrijeme fakultetskog obrazovanja sudjelovao je na brojnim kongresima, organizacijskim odborima edukacijskih događaja te vodio demonstrature u sklopu Kabineta vještina u Rijeci.