

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Sanja S. Dimitrijević

**Utvrđivanje stepena genetičke
homozigotnosti i varijabilnosti i
učestalost polimorfizama *TRPV1* i *KCC2*
gena kod osoba sa febrilnim napadima**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Sanja S. Dimitrijević

**Determination degree of genetic
homozygosity and variability and
frequency in polymorphisms of *TRPV1*
and *KCC2* gene in individuals with
febrile seizures**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTORI

dr Dimitrije Nikolić, vanredni profesor Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

dr Suzana Cvjetićanin, redovni profesor Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

dr Ivana Novaković, redovni profesor Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

dr Biljana Jekić, vanredni profesor Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

dr Stojko Vidović, redovni profesor Univerzitet u Banja Luci - Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____ 2019. godine

ZAHVALNICA

Mentoru Dimitriju Nikoliću na nesebičnoj podršci tokom prikupljanja uzorka, kao i same izrade doktorata, koji me je usmeravao savetima i konstruktivnom kritikom, a najviše svojim primerom.

Suzani Cvejticanin, komentoru, dragoj profesorki koja mi je još kao studentu omogućila da se upoznam sa inovativnom metodom, koja mi je proširila vidike. Koja je bila uvek tu, i u svakom trenutku imala vremena za sva moja pitanja, ali i rešenje za njih. Koja je svoje znanje nesebično delila, i pored svega, koja je divna osoba.

Biljani Jekić dugujem neizmernu zahvalnost, jer mi otkrila "svet molekularne medicine", i bila velika pomoć tokom izrade ovog doktorata.

Profesorki Ivani Novaković, koja je našla vremena za mene i omogućila veliki deo sredstava za izradu ovog doktorata. Svaki savet koji mi je nesebično dala bio je od izuzetne važnosti na ovom putu.

Mojim kolegama iz Bolnice za cerebralnu paralizu i razvojnu neurologiju i direktorki Mirjani Bošković i načelnici Tatjani Arežini, ne samo sada, veliko hvala na svakodnevnoj podršci, bez koje ovaj rad ne bih mogla da finaliziram.

Mojim sestrama i bratu koji su me trpeli sve vreme i bili bezrezervna podrška.

Mojim roditeljima i porodici uvek i zauvek...

Posvećeno Ivi, Srni i Dimitriju

Utvrđivanje stepena genetičke homozigotnosti i varijabilnosti i učestalost polimorfizama *TRPV1* i *KCC2* gena kod osoba sa febrilnim napadima

SAŽETAK

Uvod Febrilni napadi (FN) predstavljaju najčešće neurološko oboljenje u detinjstvu. Upravo zbog visoke incidence obolevanja, uzrasta koji obuhvataju i tendencije ponavljanja, predstavljaju svojevrsan izazov u pedijatrijskoj praksi. Etiologija FN je i dalje predmet brojnih istraživanja i poznato je da može zavisiti od genetske predispozicije.

Cilj Cilj istraživanja je bio analizirati povezanost polimorfizama *TRPV1* i *KCC2* gena sa pojavom FN i odrediti stepen genetičke homozigotnosti i varijabilnosti kod dece sa FN i u kontrolnoj grupi ispitanika.

Materijal i metode U studiju je bilo uključeno 150 pacijenata sa dijagnostikovanim FN koja su podeljena u četiri grupe: jednostavni febrilni napadi (JFN), složeni febrilni napadi (SFN), deca sa epilepsijom (EFN) i deca bez epilepsije (BFN). Nakon kliničkog i neurološkog pregleda, utvrđivano je prisustvo homozigotno-recesivnih osobina (HRO) uz pomoć HRO testa. Kontrolnu grupu činilo je 121 "zdravo " dete iz iste populacije, sličnog uzrast i pola. U ispitivanim grupama sprovedena je analiza genskih polimorfizama u genima *KCC2* i *TRPV1*.

Rezultati Genotip CC polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena je značajno češće zastupljen u kontrolnoj grupi nego u grupi dece sa FN ($p=0.003$) kao i alel C ovog polimorfizma ($p=0.045$). Takođe, genotip CC *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena je statistički značajno više zastupljen u kontrolnoj grupi u odnosu na grupu dece sa SFN ($p=0.000$). Ustanovljeno je postojanje značajnog uvećanja recesivne homozigotnosti i smanjene varijabilnosti za testirane genske lokuse ne samo u grupi pacijenata sa FN, već i u svim ispitivanim podgrupama dece (SFN, JFN, EPI, BFN) u poređenju sa kontrolnom grupom. Sa rastom stepena težine ispoljenosti FN utvrđeno je kako povećanje u stepenu recesivne homozigotnosti tako i smanjenje varijabilnosti za testirane lokuse.

Zaključak Dobijeni rezultati nam ukazuju da bi CT i CC genotipovi, kao i C alel *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena mogli biti predisponirajući faktor na nastanak FN,

pre svega CT genotip. Značajno uvećana recesivna homozigotnost kao i umanjena varijabilnost za ispitivane osobine kod osoba sa FN verovatno dovode organizam u specifično stanje genetičko-fizološke homeostaze koje bi moglo da predstavlja izvesnu predispoziciju za pojavu FN.

Ključne reči: febrilni napad, genski polimorfizam, *KCC2* gen, *TRPV1* gen, HRO test

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

Determination degree of genetic homozygosity and variability and frequency in polymorphisms of *TRPV1* and *KCC2* gene in individuals with febrile seizures

ABSTRACT

Introduction. Febrile seizures (FN) are the most common neurological disease in childhood. It is precisely because of the high incidence of the disease, the age that includes the tendency of repetition, to pose a particular challenge in pediatric practice. The etiology of FN is still the subject of numerous studies and it is known that it can depend on genetic predisposition.

The aim of the study was to determine the association of *TRPV1* and *KCC2* gene polymorphisms with the occurrence of FN and to determine the degree of genetic homozygosity and variability in children with FN and in the control group of the examinees.

Material and Methods. The study included 150 patients diagnosed with FN divided into four groups: simple febrile seizures (JFN), complex febrile seizures (SFN), children with epilepsy (EFN) and children without epilepsy (BFN). After clinical and neurological examination, the presence of homozygous-recessive characteristics (HRC) was determined using the HRC test. The control group consisted of 121 "healthy" children from the same population, of similar age and gender. In the examined groups, we analyzed genetic polymorphisms of *KCC2* and *TRPV1* genes.

Results. The genotype CC polymorphism *rs2297201* of the *KCC2* gene is significantly more common in the control group than in the group of children with FN ($p = 0.003$) and allele C of this polymorphism ($p = 0.045$). Also, the genotype CC *rs2297201* of the polymorphism of the *KCC2* gene was statistically significantly higher in the control group compared to the group of children with SFN ($p = 0.000$). The existence of a significant increase in recessive homozygosity and reduced variability for the tested gene loci was established not only for a group of patients with FN, but also in all tested subgroups of children (SFN, JFN, EPI, BFN) compared to the control group. With the increase in the severity of FN expression, it was found that the increase in the degree of recessive homozygosity and the decrease in variability for the tested loci.

Conclusion. The obtained results indicate that CT and CC genotypes, as well as C allele *rs2297201* polymorphisms of the *KCC2* gene, could be a predisposing factor in the development of FN, above all CT genotype. Significantly increased recessive homozygosity as well as reduced variability for the investigated characteristics in individuals with FN are likely to lead the organism to a specific state of genetic-physiological homeostasis which could pose a predisposition to the occurrence of FN.

Key words: febrile seizure, gene polymorphism, *KCC2* gene, *TRPV1* gene, HRC test

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. FEBRILNI NAPADI	1
1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA	1
1.1.2. DEFINICIJA, PODELA I DIJAGNOZA FN	2
1.1.3. ETIOLOGIJA FN	3
1.1.4. PATOFIZIOLOŠKI MEHANIZMI NASTANKA FN	3
1.1.5. GENETIČKI FAKORI RIZIKA ZA POJAVU FEBRILNIH NAPADA	5
1.1.6. FAKTORI RIZIKA ZA POJAVU FEBRILNIH NAPADA	16
1.1.7. RAZVOJ EPILEPSIJE NAKON FEBRILNOG NAPADA I DRUGE KOMPLIKACIJE	16
1.2. POPULACIONO-GENETIČKA ISTRAŽIVANJA	18
2. CILJEVI RADA	21
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. DIZAJN STUDIJE I SELEKCIJA ISPITANIKA	22
3.2. MOLEKULARNO-GENETIČKA ISTRAŽIVANJA	23
3.2.1. IZOLACIJA DNK	23
3.2.2. IZOLACIJA DNK-a IZ BUKALNE SLUZNICE	24
3.2.3. METODA PCR U REALNOM VREMENU (<i>Real time</i> PCR)	25
3.2.4. ANALIZA <i>rs2297201</i> POLIMORFIZMA <i>KCC2</i> I <i>rs222747</i> POLIMORFIZMA <i>TRPV1</i> GENA	27
3.3. UTVRĐIVANJE STEPENA GENETIČKE HOMOZIGOTNOSTI I VARIJABILNOSTI (HRO-TEST)	28
3.4. STATISTIČKA ANALIZA	30
4. REZULTATI	31
4.1.1. Analiza polimorfizma <i>rs2297201 KCC2 (SLC12A5)</i> gena	37
4.1.2. Analiza učestalosti polimorfizma <i>rs222747 TRPV1</i> gena	41
4.2.1. Varijabilnost homozigotno recesivnih osobina kod ispitanika sa jednostavnim febrilnim napadom (JFN) i složenim febrilnim napadom (SFN)	48
4.2.2. Varijabilnost homozigotno recesivnih osobina u kontrolnom uzorku ispitanika i kod ispitanika sa febrilnim napadima i epilepsijom	52
4.2.3. Varijabilnost homozigotno recesivnih osobina između polova u kontrolnom uzorku ispitanika i pacijenata sa febrilnim napadima	55
5. DISKUSIJA	62
6. ZAKLJUČCI	74
7. LITERATURA	76

1. UVOD

1.1. FEBRILNI NAPADI

Oko 8% ljudi tokom života doživi bar jedan epileptički napad i približno polovina tih napada čine febrilni napadi (FN) (1). Febrilni napadi predstavljaju najčešće neurološko oboljenje u detinjstvu. Upravo zbog visoke incidence obolevanja, uzrasta koji obuhvataju i tendencije ponavljanja, predstavljaju svojevrsan izazov u pedijatrijskoj praksi. Iz tih razloga, poslednjih godina se budi veća svest o potencijalnim komplikacijama FN kao i intervenciji tokom napada. Javljaju se kod 5% dece, sa razlikama u njihovoj prevalenci u različitim populacijama (2).

1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA

Podaci iz studija u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i Zapadnoj Evropi govore u prilog tome da 2-5 % dece mlađe od 5 godina doživi bar jedan epileptički napad tokom febrilnosti, sa najvećom incidencom javljanja u uzrastu između 12-18 meseca. (1,3,4,5).

Incidenca FN u Azijskoj populaciji je nešto veća, pa je učestalost u Indijskoj populaciji 5-10% (6), dok je u Japanskoj populaciji 6-9% (7). Najveća učestalost FN se javlja kod stanovnika Gvama i iznosi 14% (8).

Što se tiče istraživanja na teritoriji Srbije, studije Pavlovića i saradnika rađene 1999. godine su pokazale da je incidenca FN u srpskoj populaciji približno 3 na 1000 živorođene dece (9). Razlika obolevanja među polovima je i do 1.6 u korist dečaka (4, 10).

Istraživanja su ukazala na to da je pojava FN češća kod dece koja imaju niži ekonomsko-socijalni status, što se može pripisati neadekvatnom pristupu medicinskoj nezi (4).

1.1.2. DEFINICIJA, PODELA I DIJAGNOZA FN

U kliničkoj praksi najčešće se koristi definicija FN Američke akademije za pedijatriju (AAP) na osnovu koje su FN napadi udruženi sa povišenom temperaturom jednakom ili višom od 38°C izmerenom bilo kojom metodom, u odsustvu infekcije centralnog nervnog sistema, kod dece uzrasta od 6 do 60 meseci (3). Prema karakteristikama FN se dele na: jednostavne (proste ili tipične) i kompleksne (složene ili atipične febrilne napade) (3).

Međunarodna liga za borbu protiv epilepsije (International League Against Epilepsy- ILAE) definiše FN kao napade u detinjstvu posle 6. meseca života, udružene sa febrilnom bolešću koja nije uzrokovana infekcijom centralnog nervnog sistema (CNS), bez prethodne pojave neonatalnih ili afebrilnih napada, a ne ispunjavaju kriterijume za ostale akutne simptomatske napade. (11)

Jednostavni febrilni napadi (JFN) se karakterišu primarno generalizovanim napadima koji traju kraće od 15 minuta i ne ponavljaju se tokom 24 sata. Javljaju se u uzrastu od 6 meseci do 5. godine života, kod dece bez neurološkog deficita (deca sa urednim psihomotornim razvojem i bez prethodne pojave afebrilnih napada (11).

Kompleksni febrilni napadi (SFN) se manifestuju fokalnim napadima ili epileptičkim statusima, (jednakim ili dužim od 15 minuta), pri telesnoj temperaturi nižoj od 38°C. Javljaju se van tipičnog uzrasta i ponavljaju se tokom 24h (mogu se javljati tri i više puta). EEG nalaz tokom ili između napada može biti izmenjen. U grupu kompleksnih febrilnih napada ubrajaju se i febrilni napadi kod dece sa prethodnim neurološkim deficitom i napadi sa postiktalnim neurološkim abnormalnostima (11).

Dijagnoza FN se postavlja na osnovu anamneze i kliničkog pregleda (nivo dokaza I) (12,13) ali je veoma važno identifikovati osnovno oboljenje koje je izazvalo febrilnost.

Diferencijalna dijagnoza FN može biti sinkopa tokom febrilnosti (14) ili abnormalne motorne manifestacije, kao što su drhtanje i distoničan napad, akutni konvulzivni napad u toku meningitisa i encefalitisa (14). Većina FN su jednostavni febrilni napadi, a samo 15-20% su složeni febrilni napadi (1,7).

1.1.3. ETIOLOGIJA FN

Etiologija FN je složena i još uvek je tema brojnih istraživanja. FN se javljaju unutar porodica ili kao sporadični slučajevi, što ukazuje na to da su za njihov nastanak odgovorni i genetski faktori i faktori okoline, tj. ukazuje na njihovu multifaktorijalnu etiologiju (14). Smatra se da FN nastaju kao rezultat vulnerabilnosti mozga tokom maturacije na efekte groznice, a u kombinaciji sa genetskom predispozicijom i faktorima okoline (14). FN predstavlja uzrasno zavisani odgovor nezrelog mozga na hipertermiju uzokovanu infekcijom (15).

1.1.4. PATOFIZIOLOŠKI MEHANIZMI NASTANKA FN

Savremena saznanja o mogućim patofiziološkim mehanizmima nastanka FN se prevashodno baziraju na izučavanjima koja se sprovode na animalnim modelima (16). Studije sprovedene na animalnim modelima su pokazale da postoje geni čije promene i mutacije mogu da utiču na ekscitabilnost nezrelog mozga tokom febrilnosti, pri čemu je utvrđeno da većina tih gena ima svoje homologe u humanom genomu (16).

Dosadašnja istraživanja su opisala nekoliko mogućih patofizioloških mehanizama koji doprinose pojavi FN:

I Povećanje temperature mozga,

II Hipertermijom indukovana hiperventilacija i alkalozna,

III Oslobođanje medijatora inflamacije.

1.1.4.1. ULOGA HIPERTERMIJE U RAZVOJU FN

Istraživanja su pokazala pro-konvulzivni uticaj hipertermija kod eksperimentalnih životinja i kod dece (17). Ako je telesna temperatura dovoljno visoka, dovešće do pojave FN kod svih sojeva miševa (16-20). Međutim, različiti sojevi miševa (različiti genetski materijal) razvijaju napade pri različitoj visini temperature (temperatura okidanja napada) (20) što ukazuje na to da je genetička osnova veoma važan faktor za nastanak FN.

U istraživanjima na animalnim modelima je dokazano da produžena hipertermija izaziva hronične promene u hiperpolarizaciji nekih jonskih kanala i GABA-energičke transmisije (21,22). Dokazano je i da akutno povećanje temperature može izazvati epileptiformna pražnjenja u hipokampusu nezrelih neurona (23). Međutim, ostaje nedovoljno razjašnjeno kako porast temperature izaziva generisanje napada u mozgu koji je u razvoju *in vivo* (24). Hipertermija verovatno indukuje ekscitirajući učinak tako što suprimira mehanizam blokade akcionog potencijala povezan sa smanjenjem ulaska kalcijuma i povećanjem sinaptičke transmisije. Rast temperature u mozgu menja brojne funkcije neurona, uključujući i funkciju jonskih kanala koji su osetljivi na temperaturu (25-29). Porast temperature aktivira kanale tranzitornog receptorskog potencijala, podfamilije V, grupe 1 (TRPV1) (27). Upravo te promene bi mogle da utiču na neuronsku aktivnost sa mogućom pojavom masivne sinhronizovane aktivnosti tj. napada.

1.1.4.2. HIPERTERMIJOM UZROKOVANA HIPERVENTILACIJA I ALKALOZA

Još od 1920. poznato je da respiratorna alkalozna može indukovati napade (30,31). Ovo je verovatno posledica toga što alkalozna može da poveća neuronsku ekscitabilnost (31) i indukuje spontanu epileptiformnu aktivnost u mozgu (32). Zapravo, pokazano je da acidoza izaziva smanjenje epileptiformnih pražnjenja temporalnog dela hipokampusa kod pacova (32). Miševi koji su imali deficit karbon anhidraze II, koja utiče na pH ekstracelularne sredine tako što je smanjuje, imaju smanjenu podložnost pojave napada u odnosu na miševe bez deficita ovog enzima (33). Respiratorna alkalozna može se smatrati potencijalnim uzročnikom nastanka FN, upravo jer povećanje telesne temperature uzrokovane infekcijom dovodi do ubrzanog disanja, pogotovo kod dece (34,35). Ubrzano disanje dovodi do respiratorne alkaloze sa posledičnim smanjenjem praga za pojavu napada (36,37). Do sada je nekoliko studija pokazalo vezu između hipertermijom uzrokovane respiratorne alkaloze i FN (37,38,39). Morimoto i saradnici su dokazali da miševi koji hiperventiliraju tokom temperature, imaju skraćenu latencu pojave FN (38). Dalja istraživanja na životinjama su pokazala da izloženost suvom vrelom vazduhu dovodi do hiperventilacije i smanjenog praga za pojavu FN, zbog respiratorne intracerebralne

alkaloze (36,40). U skladu sa dosadašnjim istraživanjima na životinjama, pokazano je da deca sa FN češće imaju udruženu respiratornu alkalozu u poređenju sa decom sa temperaturom bez pojave FN, koja imaju tendenciju nastanka metaboličke acidoze (39). Ove studije ukazuju na potencijalnu vezu između respiratorne alkaloze i FN, međutim, precizan mehanizam nastanka nije poznat.

1.1.4.3. OSLOBADANJE MEDIJATORA INFLAMACIJE

Smatra se da medijatori inflamacije mogu imati prokonvulzivni efekat na mozak koji je u razvoju (41). U prilog tome idu studije na miševima koji nisu imali receptore za određene citokine. Kod njih su bile potrebne mnogo više temperature da izazovu hipertermičke napade (42).

Medijatori inflamacije imaju ulogu pirogena. Oni dovode do povećanja temperature, tako utiču na hipotalamus i podižu baždarnu tačku temperature, prednji hipotalamus to "čita" kao sniženu temperaturu tela i aktivira mehanizme za stvaranje toplote (43,44). Kliničke i eksperimentalne studije su pokazale da su povećani nivoi IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF povezani sa neuronskom hiperekscitabilnošću i da se nalaze kod pacijenata koji imaju FN i epilepsiju (45-47). Pored toga, dokazano je da IL-1 β povećava neuronsku ekscitabilnost preko glutamata i GABA-e *in vivo*. Ovim mehanizmom IL-1 β povećava verovatnoću za pojavu napada (46).

1.1.5. GENETIČKI FAKTORI RIZIKA ZA POJAVU FEBRILNIH NAPADA

U prilog uloge genetskih faktora u nastanku FN govori činjenica da osobe sa ovim entitetom pokazuju familijarnu agregaciju. Trećina dece sa FN ima pozitivnu porodičnu anamnezu (48). Rizik od pojave FN je veći kod dece čiji su roditelji imali FN u detinjstvu, u odnosu na onu decu čiji su dalji rođaci imali FN (49). Stope konkordantnosti koje su opisane u različitim studijama se kreću oko 35-69% kod monozigotnih i 14-20% kod dizigotnih blizanaca (49).

Interesantno je to da je veća konkordantnost javljanja ne samo FN, već i određenog subtipa FN (jednostavnog i kompleksnog FN) kod monozigotnih blizanaca u odnosu na dizigotne blizance (49). Ova činjenica ukazuje da postoji snažan genetski

doprinos za pojavu FN, ali i postojanje različitih genetskih faktora koji utiču na to da li će se ispoljiti određeni tip FN (49). Na osnovu GWAS studija 11 lokusa (FEB 1-FEB 11) se dovodi u vezu sa FN:1q31, 2q23-34, 3p24.2-23, 3q26.2-26.33, 5q14-15, 5q34, 6q22-24, 8q13-21, 18p11.2, 19p13.3, 19q i 21q22 (50-52).

1.1.5.1 DNK POLIMORFIZMI

Varijacije u naslednoj osnovi čoveka koje se normalno sreću u humanim populacijama sa učestalošću većom od 1% se nazivaju polimorfizmi. Unutar određene vrste, jedna osobina se može ispoljavati kao dve ili više jasno različitih formi (fenotipova). Opisani polimorfizam se naziva fenotipski. Polimorfizam može biti i genotipski (53). Ako postoji više od jedne alelske varijante nekog gena u populaciji on se naziva polimorfni genom. Polimorfizmom se smatra ona varijanta gena čija se alelska forma javlja sa učestalošću većom od 1%, odnosno kada je učestalost heterozigota u populaciji veća od 2% (53). Pojam polimorfizam često se pogrešno tumači, tako na primer kada imamo neki gen koji ima dve polimorfne varijante, jedna je normalna, a druga mutirana. Međutim, obe varijante mogu biti normalne samo je jedna češća, a druga ređa u populaciji i zbog toga se uvodi tačnija terminologija, a to je alelska varijanta. Ako jedinka ima dve iste alelske varijante nekog gena na osnovu genotipa, ona je homozigot za tu alelsku varijantu, a ukoliko su različite onda je heterozigot (53). Ako posmatramo više gena, kombinacija njihovih alela na jednom hromozomu naziva se haplotip (53). Postoje tri osnovna tipa DNK polimorfizama: polimorfizmi pojedinih nukleotida (*SNP – Single Nucleotide Polymorphism*), inserciono delecioni (*I/D*) polimorfizmi i polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka (*VNTRs – Variable ili SNTR Small Number Tandem Repeats*) (53). Polimorfizmi jednog nukleotida (*SNP*) predstavljaju polimorfizme na nivou jednog nukleotida u DNK, koji biva zamenjen drugim. Prisustvo jednog od ta dva nukleotida se označava kao jedna, a prisustvo drugog na istom mestu kao druga alelna varijanta. Ukoliko se nalaze u kodirajućem regionu gena ove zamene mogu da ne dovode do promene aminokiseline u proteinu, što znači da najverovatnije ne dovode ni do promene funkcije proteina, a samim tim ni do fenotipske promene. Ove zamene mogu da menjaju i aminokiselinu u proteinu, a to može dovesti do promene funkcija proteina. Besmislene (“*nonsense*”)

promene dovode do zamene kodona za aminokiselinu sa jednim STOP kodonom, što znači da dovodi do prevremenog prekida sinteze proteina i njihov efekat zavisi od pozicije SNP-a u genu. Ukoliko se nalaze u nekodirajućim regionima genoma mogu uticati na različitu ekspresiju genskog produkta, ili uticati na promene u obradi primarnog prepisa gena. SNP polimorfizmi čine 90% svih polimorfizama u humanom genomu i oni se nalaze duž celog genoma, u intronima, egzonima, promotorima, pojačivačima itd (53).

Poslednjih godina se sve više istražuje uloga DNK polimorfizama kao markera genetičke predispozicije za razvoj određenih poremećaja. To se pre svega odnosi na bolesti sa multifaktorskom etiologijom koje nastaju kao rezultat sadejstva većeg broja gena i faktora sredine. Studijom asocijacije možemo utvrditi da li neki polimorfizam predstavlja predispoziciju za nastanak poremećaja. U ovim studijama se analizira korelacija ispitivanog entiteta sa određenim genskim varijantama. Posebna pažnja se posvećuje ispitivanju veze polimorfizama različitih gena sa specifičnim bolestima, uključujući i neurološke bolesti, u koje spadaju epileptički i febrilni napadi (45,51,54,55,56).

Veliki broj istraživanja se odnosi na ulogu genetičkih varijanti u nastanku epileptičkih napada uključujući i nastanak febrilnih napada kod dece (54-56). Zbog izuzetne kompleksnosti ovih bolesti, čijem nastanku doprinose kako faktori sredine, tako i genetički faktori, identifikovanje gena i genetičkih varijanti koje doprinose etiopatogenezi ovih poremećaja predstavlja veoma zahtevan zadatak. Stoga, tokom izučavanja potencijalnih gena kandidata u razvoju FN, posebna pažnja se obraća na gene koji kodiraju jonske kanale koji imaju bitnu ulogu u ekscitabilnosti nezrelog mozga. Do sada je dokazano da geni koji kodiraju natrijumske kanale, kalcijumske kanale i GABA receptore, mogu doprineti nastanku FN (52). Populacione studije asocijacije ispitivale su povezanost genetskih polimorfizama sa pojavom FN. Pokazale su postojanje bar jedne pozitivne asocijacije za 14 od 41 ispitivanih gena do sada (52).

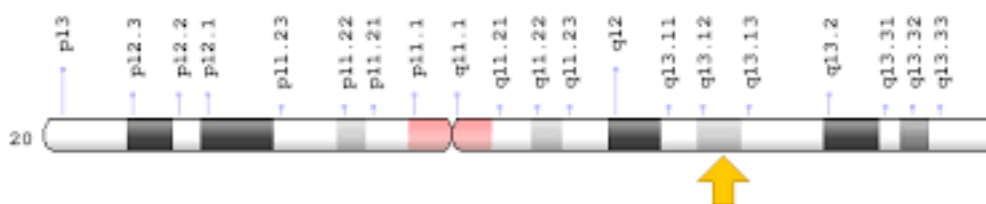
1.1.5.2. UTICAJ *KCC2* GENA NA POJAVU FEBRILNIH NAPADA

KCC2 (*SLC12A5*) gen koji kodira neurospecifičan kalijum-hlor transporter (*KCC2* (*SLC12A5*)) nalazi se na *hromozomu 20q13.12* (Genomic coordinates

(GRCh38): 20:46,021,689-46,060,149) (Slika 1). *KCC2* kanali su prisutni u najvećoj koncentraciji u najrazvijenim delovima mozga sisara (piramidalni neuroni CA1-CA2 hipokampusa, granuliranim ćelijama, Purkinje neuronima cerebeluma), a veoma ih je malo ili ih čak i nema u perifernom nervnom sistemu (PNS) i glija ćelijama (57-61).

Do skoro se veoma malo znalo o ulozi i funkciji proteina koji kodira ovaj gen, međutim, poslednjih godina istraživanje ovog gena doživljava pravu ekspanziju. Savremena saznanja o mogućim funkcijama *KCC2* kanala se prevashodno baziraju na izučavanjima koja se sprovode na animalnim modelima (62-68).

KCC2 kanal je zadužen za regulaciju gradijenta jona hlora u neuronima, tj. održava niske koncentracije Cl unutar ćelije (62-68). On je ključan medijator sinaptičke inhibicije, ćelijske zaštite od ekscitotoksičnosti, a može da deluje i kao modulator neuroplastičnosti (69,70).

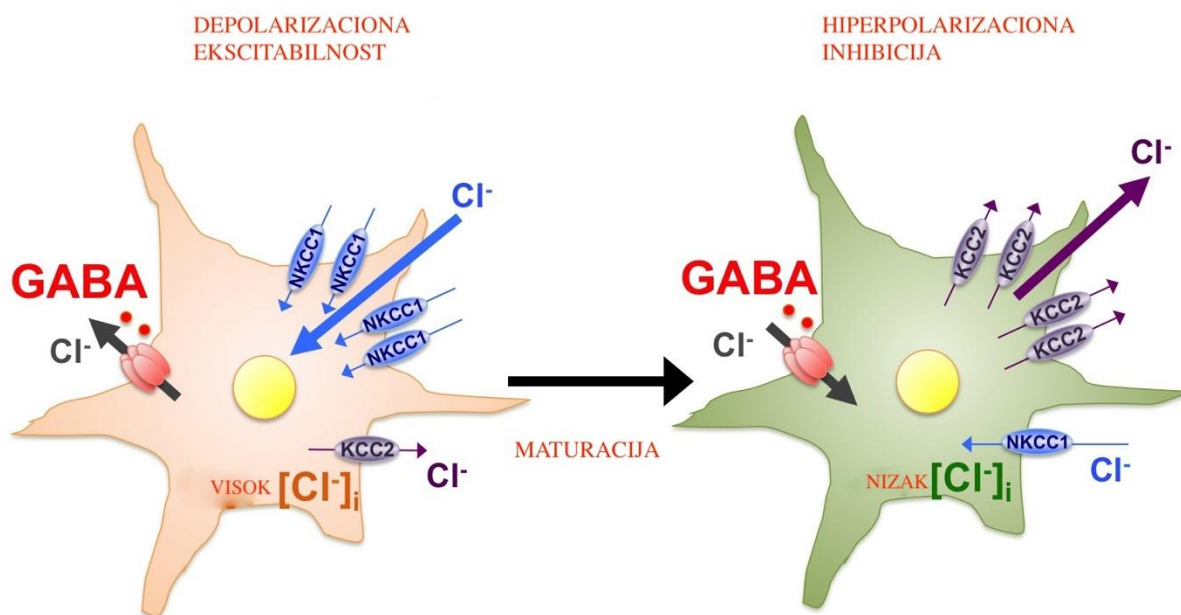


Slika 1. Prikaz lokacije *KCC2* (*SLC12A5*) gena (označeno žutom strelicom) na hromozomu broj 20. (preuzeto sa sajta www.ghr.nlm.nih.gov)

1.1.5.2.1. HOMEOSTAZA KONCENTRACIJE HLORA U NEURONU

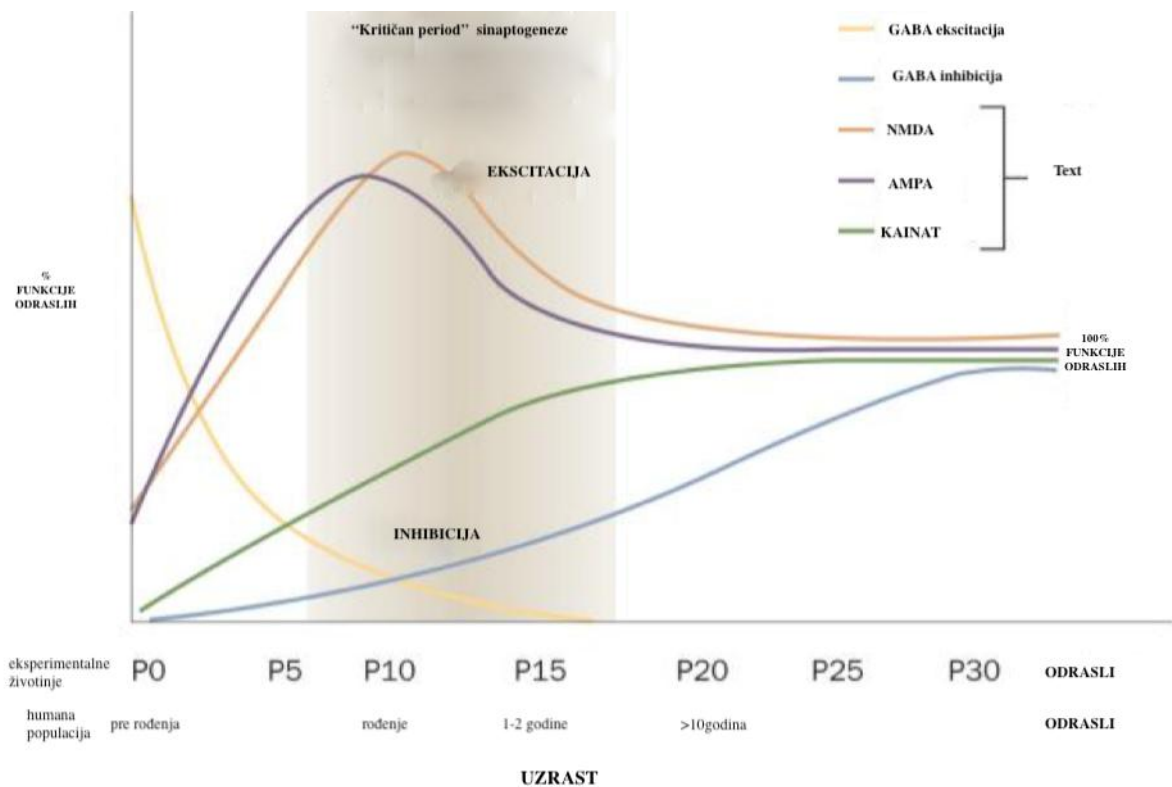
Koncentracija Cl⁻ u zrelih neuronima se održava u relativno niskim granicama, oko 5 mmol, dok koncentracija Cl⁻ u ekstracelularnom prostoru iznosi oko 110mmol (Slika 2). Potencijal hloridne ravnoteže je negativniji od membranskog potencijala, tako da će hloridne struje imati hiperpolarizujući (inhibitorni) efekat na membranski potencijal. *KCC2* kotransporter koji se nalazi u membrani neurona je zadužen za održavanje niske koncentracije Cl⁻ unutar neuronske ćelije. *KCC2* omogućava izlazak jona Cl⁻ nasuprot njegovog koncentracionog gradijenta (63). ATP zavisna K-Na ATP-

aza održava visoku koncentraciju jona kalijuma unutar ćelije koja je potrebna da bi se ovaj proces ostvario (66). KCC2 se tako ponaša kao hloridna pumpa koja predstavlja pokretačku snagu za ulazak jona Cl⁻ i postsinaptičku hiperpolarizaciju membrane nakon oslobađanja GABA neurotransmitera (71). U normalnim okolnostima, koncentracija Cl⁻ je dovoljno niska, tako da aktivacija GABA_A receptora dovodi do povećane propustljivosti membrane neurona za jone Cl⁻ koji ulaze u neuron, što dovodi do hiperpolarizacije postsinaptičkog membranskog potencijala. Ovo smanjuje verovatnoću okidanja akcionog potencijala u postinaptičkom neuronu pa se naziva inhibitornim efektom GABA-energičke signalizacije. Ponovljena GABA signalizacija dovodi do ponovnog ulaska jona Cl⁻ u neuron, što dovodi do povećanog opterećenja neurona hlorom (72). Ulazak Cl⁻ u neuron može se povećati ako se postsinaptički neuron depolarizuje tokom trajne ekscitatorne aktivnosti. Sa povećanjem intracelularne koncentracije Cl⁻, elektrohemijski gradijent postaje sve manji, što dovodi do smanjenja inhibitornog uticaja GABA signalizacije na postsinaptički neuron. S obzirom na to da su reverzni potencijal GABA-e i mirovni membranski potencijal (MMP) neurona relativno blizu, mali porast Cl⁻ može dovesti do promene GABA-energičkog odgovora sa hiperpolarizacije na depolarizaciju. Upravo ovo naglašava važnost održavanje niske koncentracije Cl⁻ unutar neurona (73). Da bi se oporavili od velikog opterećenja hlorom i da bi se održao hiperpolarizujući efekat GABA-e, joni hlorom se kontinuirano izbacuju iz neurona posredstvom KCC2 kotransportera. Aktivnost KCC2 određuje brzinu oporavka koncentracije Cl⁻ unutar neurona nakon intenzivne GABA-energičke signalizacije. Pri malom smanjenju KCC2 aktivnosti dolazi do produženog povećanja koncentracije jona Cl⁻ u neuronu nakon GABA signalizacije, što kompromituje inhibitorni efekat GABA-e. U normalnim okolnostima KCC2 posredovan izlazak Cl⁻ predstavlja efikasan način oporavka koncentracije Cl⁻.



Slika 2. Prikaz funkcije KCC2 kanala u neuronu (Preuzeto sa sajta www.atlasofsince.com)

Za razliku od zrelih neurona, koncentracija Cl^- u nezrelim neuronima je visoka (Slika 2), što dovodi do promene elektrohemijskog gradijenta Cl^- u suprotnom smeru. Pri aktivaciji GABA A receptora nezrelog neurona dolazi do izlaska Cl^- , što izaziva depolarizaciju postsinaptičkog neurona (74). Smatra se da depolarizacijski efekat GABA-energičke signalizacije ima promotivni uticaj na rast i razvoj i da je bitan za rano uspostavljanje neuronskih krugova (75). Glavni medijator depolarizacijskog efekta GABA trasičtera u nezrelim neuronima je KCC2 transporter, čija je ekspresija u tom periodu smanjena. Tokom sazrevanja nivo ekspresije KCC2 se povećava, što rezultira malom količinom Cl^- unutar zrelog neurona (76). Karakteristična povećana ekspresija KCC2 tokom neurorazvojnog perioda često se naziva **ekcitatorno-inhibitorna GABA sekvenca ili KCC2 šift**.



Grafikon 1. Šematski prikaz promena u funkciji glutamatnih i GABA receptora tokom razvoja mozga kod ljudi i životinja (Skraćenice: AMPA, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionat; GABA, γ - amino buterna kiselina; NMDA, *N*-metil-*D*-aspartat; P, postnatalni dani)

Depolarizacija posredovana GABA receptorima se dešava u različitim razvojnim periodima kod životinja i ljudi. Kod pacova počinje tokom prve postnatalne nedelje, a kod ljudi pre rođenja i u neonatalnom periodu (Grafikon 1). Ovi rezultati ukazuju na razlike u obrascima ekspresije među vrstama, koje bi trebalo imati u vidu prilikom upređivanja studija koje su koristile različite modele. Razvojni pad koncentracije Cl⁻ je specifičan za neurone CNS-a i ne dešava se u ostalim ćelijama (70,71) (Grafikon 1).

U određenim patofiziološkim stanjima može doći do disregulacije koncentracije jona Cl⁻ što utiče na GABA-energičku inhibiciju (77). Istraživanja pokazuju da disregulacija jona Cl⁻ jona leži u osnovi širokog spektra neuroloških i psihijatrijskih poremećaja (72), među kojima su FN, ali sam mehanizam promene GABA energičke signalizacije tokom razvoja nije u potpunosti shvaćen. Istraživanja na životinjama su

pokazala da miševi bez *KCC2* gena imaju učestale generalizovane napade i umiru ubrzo po rođenju (63,78), dok su oni sa heterozigotnom delecijom *KCC2* gena imali snižen prag za pojavu napada (78). U humanoj populaciji su opisane mutacije ovog gena kod dece koja su imala FN (79), kao i dece koja su obolela od epilepsije (80,81).

Kod pacijenata sa rezistentnom epilepsijom temporalnog reznja (TLE) primećen je porast kaplena (82), enzima koji je zadužen za degradaciju *KCC2* kanala (83).

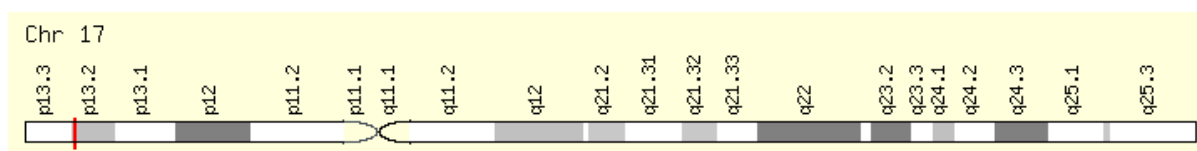
Rezultati nekih istraživanja ukazuju da infekcija u nezrelom mozgu miševa sa ili bez ispoljavanja FN može dovesti do dugotrajnih molekularnih promena i povećane ekscitabilnosti u hipokampusu odraslih pacova, kao i da su promene izraženije ako je infekcija praćena FN (29). Pored ovoga, dokazano je da povećanje temperature utiče na smanjenu funkciju *KCC2* kanala (28).

Dosadašnja istraživanja su opisala deficijenciju *KCC2* u različitim neurološkim i psihijatrijskim bolestima, kao što je epilepsija (83), autistični spektar poremećaja (84), Daunov sindrom (85), febrilni napadi (78,86,87) i neuropatski bol (88). Ova istraživanja potkrepljuju značajnu ulogu *KCC2* u homeostazi hloridnih jona u neuronima kao i u funkcionisanju GABA posredovane inhibicije.

Polimorfizam *KCC2* gena *rs2297201* je lociran u intronu *KCC2* gena. Njegova uloga može biti značajna u nastanku FN, obzirom na funkciju kanala koju ovaj gen kodira, kao i na to da su mutacije *KCC2* gena dokazane kod dece sa FN.

1.1.5.3. UTICAJ *TRPV1* GENA NA NASTANAK FEBRILNIH NAPADA

TRPV1 gen je lociran na kratkom kraku hromozoma 17, u regionu *17p13.2*. i veličine 32 Kb i sadrži 18 egzona (90) (Slika 3).

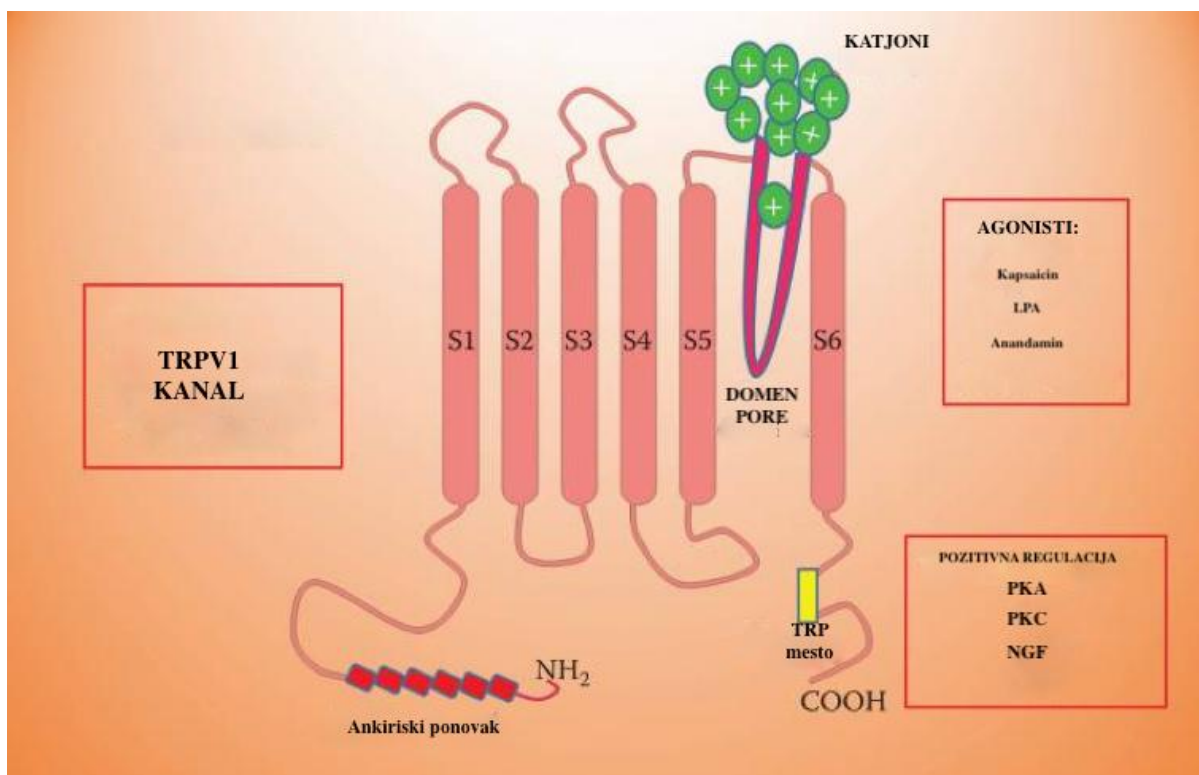


Slika 3. Prikaz lokacije *TRPV1* gena (obeleženo crvenom bojom) na hromozomu 17. (Preuzeto sa sajta www.genecards.org)

Kanali tranzitornog receptorskog potencijala, podfamilija V (TRPV) se još nazivaju i vaniloidni receptori. U njih se svrstavaju 6 različitih kanala (TRPV1-TRPV6). TRPV1-TRPV4 funkcionišu kao polimodalni hemosenzori širokog spektra endogenih i sintetičkih liganda. Kanal tranzitornog receptorskog potencijala, podfamilija V, član 1 (TRPV1) je najpoznatiji član TRPV familije predominantno eksprimiran u mozgu, i kontroliše razne funkcije neurona i glija, uključujući razvojne i homeostatske funkcije mozga, kao što su termoregulacija i sinaptička transmisija (91). On je kodiran od strane *TRPV1* gena. TRPV1 kanal je neselektivni katjonski kanal, koji može biti aktiviran od strane različitih hemijskih i fizičkih stimulusa. Aktiviraju ga određeni endogeni molekuli, kao što je anadamin (endokanabinoid) (92-95), kiseli rastvori (pH <6,5), produkti inflamacije, kapsaicin iz čili papričica, azot oksid (NO), oksidativni stres (96), hidrogen peroksid i temperatura (>42°C) (93).

TRPV1 kanal je izolovan 1997. godine iz noniceptora pacova koji su stimulisani kapsaicinom i temperaturom (92). Studije koje su usledile su potvrdile teoriju o postojanju kapsaicinskog receptora i utvrđena su specifična vezujuća mesta za vaniloid (97). Početnom devedesetih Bevan i saradnici su otkrili kapsazepin kao prvog kapsaicinskog antagonistu (92). Sve ove studije su pružile odličnu osnovu za dalju preciznu identifikaciju ovih receptora. Tokom 2000. godine Hayes i saradnici su klonirali i identifikovali *TRPV1* gen kod ljudi (92).

Strukturu TRPV1 kanala čini 6 transmembranskih domena (TM) sa intracelularnim amino (N) i karbokslnim (C) krajevima i region pore koji se nalazi između TM 5 i TM 6, na kojima se nalaze mesta koja su važna za aktivaciju i selektivnost kanala (Slika 4). Na N- i C- krajevima nalaze se domeni koji regulišu osetljivost zidova TRPV1 kanala. Na N-kraju nalazi se najmanje tri ankirin ponavljajuća segmenta (98) koja imaju važnu ulogu u funkcionisanju kanala (92). U TRPV1 kanalu pod uticajem visoke temperature dolazi do konformacionih promena koji utiču na njegovu permeabilnost, i dovode do njegovog otvaranja. U normalnim okolnostima samo temperatura preko 42 °C aktivira TRPV1 kanale, međutim, ovaj prag se smanjuje na 35-37°C nakon acidifikacije medijuma (99). Ovaj fenomen je veoma važan tokom inflamacije, jer inflamacija drastično smanjuje pH (do pH 6.4) i brzo aktivira TRPV1.



Slika 4. Struktura TRPV1 kanala (preuzeto iz knjige Neurobiology of TRP Channels. 2nd edition. Leon D. Islas 2017).

Otkrivanje TRPV kanala doprinelo je shvatanju molekularnih mehanizama epilepsije. Poznato je da neurotransmiter glutamat igra važnu ulogu u etiologiji epilepsije. Dokazano je da aktivnost TRPV1 kanala povećava oslobađanje glutamata i signalizaciju posredovanu glutamatom kod ljudi i eksperimentalnih životinja (100,101). Tako se produžava trajanje postsinaptičke stimulacije aktivacijom TRPV1 kanala u glutaminičkim sinapsama (102). Upravo zbog toga TRPV1 može biti potencijalna meta u regulisanju neuronske aktivnosti u epilepsiji (103).

Nasuprot brojnim istraživanjima u ulozi TRPV1 kanala u nastanku epilepsije, do sada se veoma mali broj istraživanja bavio ulogom TRPV1 kanala u nastanku FN (104-106). Ove studije su pokazale vezu između TRPV1 kanala i pojave FN na eksperimentalnim modelima, međutim, slična istraživanja u humanoj populaciji nisu do sada rađena (104-106). Utvrđeno je da antagonisti TRPV1 kanala u zrelim neuronima imaju antikonvulzivni efekat, dok TRPV1 agonisti u nezrelim neuronima animalnih modela imaju pro-convulzivni efekat (104-106).

Pored toga TRPV1 kanal je uključen u regulaciju respiratornog odgovora na povišenu temperature koja uključuje hipotalamus i srednji mozak (107,108), karotidni sinus i X kranijalni nerv (*n. vagus*) (105). Nedavna studija na životinjama je pokazala da vagalna aktivacija TRPV1 kanala ima pro-konvulzivne efekte, u uslovima alkaloze koja je posledica hiperventilacije uzrokovane povišenom temperaturom (109).

Zanimljivo je da aktivacija TRPV1 utiče na smanjenje produkcije pro-inflamatornih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α i HMGB1) u hipokampusu i korteksu miševa (109).

Dosadašnja istraživanja koja su istraživala ulogu TRPV1 kanala u nastanku FN su opisala različite moguće patofiziološke mehanizme nastanka FN (102-106), a koji su posledica uloge TRPV1 kanala u brojnim fiziološkim mehanizmima, među kojima je ekscitabilnosti mozga, inflamacija i termosenzibilnosti.

Uočeno je da hipokampus i korteks pacijenata sa mezijalnom temporalnom sklerozom (MTS) imaju veći nivo ekspresije TRPV1 (109).

Do sada je opisano oko 150 SNP polimorfizama u humanom TRPV1 genu (90). Podaci dobijeni transfekcijom HEK ćelija sa DNK ljudi sa humanim SNP su pokazala da neki od njih utiču na funkcionalna svojstva TRPV1 kanala (110). SNP *rs222747* je lokalizovan u regionu ponavljajućeg domena ankirina (Slika 4). Ovaj polimorfizam ima dve alelne varijante C i G koje se javljaju u Evropskoj populaciji sa učestalošću 24,7% i 75,3%. Alel G ovog polimorfizma utiče na povećanu ekspresiju TRPV1 gena, tako da bi osobe koje imaju ovu varijantu trebalo bi da poseduju veću funkcionalnost ovog kanala (110). Istraživanja Morija i saradnika 2012. su pokazala ulogu ovog polimorfizma u regulaciji kortikalne ekcitabilnosti kod ljudi (111). Homozigoti za G alel ovog polimorfizma imaju povećanu sinaptičku transmisiju glutamata i povećanu ekscitabilnost neurona (111). Alel C se dovodi u vezu sa većim maksimalnim odgovorom na agoniste kaspacin i anadamin (110). Uočena je asocijacija polimorfizma *rs222747 TRPV1* gena sa neželjenim odgovorom na terapiju interferonom kod pacijenata sa multiplom sklerozom (112), sa bolnim stanjima (113), i sa smanjenjem odgovora krvnog pritiska na statičke vežbe (114).

Sve ovo ukazuje na to da promene u *TRPV1* genu koje utiču na povećanu funkciju kanala mogu predstavljati predispoziciju za ispoljavanje FN. Kako je za polimorfizam *rs222747* dokazano da doprinosi povećanoj funkciji kanala u humanoj

populaciji, želeli smo da ispitamo njegovu ulogu kod dece sa FN. Ovo je prvo istraživanje polimorfizma *rs222747* kod dece sa FN.

1.1.6. FAKTORI RIZIKA ZA POJAVU FEBRILNIH NAPADA

U literaturi se pominju više faktora rizika za pojavu **prvog** FN. Pozitivna porodična anamneza FN kod bližih srodnika predstavlja jedan od najvažnijih faktora rizika. Drugi opisani faktori rizika su visoka temperatura (što je veća temperatura veći je i rizik) (115-118), postojeće kašnjenje u psihomotornom razvoju, boravak u kolektivima i neonatalna nega duža od 28 dana (115).

Faktori rizika za **recidive** FN su:

1. pojava prvog FN u ranom uzrastu (prva godina života);
2. javljanje prvog FN tokom niže febrilnosti;
3. FN kod članova uže porodice;
4. Epilepsija kod članova uže porodice;
5. Kompleksni karakter prvog FN (115).

Rizik za pojavu recidiva FN kreće se od 30 do 40% (15). Oko 10% dece sa FN koja nemaju faktore rizika imaju rekurentne FN, dok verovatnoća pojave ponovnog napada raste kod dece sa fakorima rizika (1 ili 2 fakora rizika, povećavaju za 25-50% rizik za pojavu recidiva; 3 ili više faktora rizika, povećavaju za 50-100% rizik za pojavu recidiva) (118).

1.1.7. RAZVOJ EPILEPSIJE NAKON FEBRILNOG NAPADA I DRUGE KOMPLIKACIJE

Zbog dramatične kliničke slike FN su često uzrok anksioznosti i zabrinutosti roditelja (119). Febrilni napadi mogu izazvati nepotrebnu paniku kod roditelja, koji mogu biti pod utiskom da im dete može umreti tokom napada i da je oštećenje mozga neizbežno u slučaju da ono preživi (120,121).

Međutim FN predstavljaju benigni poremećaj i veoma retko se javljaju kod dece starije od 5 godina. Podaci iz literature pokazuju da većina dece sa FN ima odličnu prognozu, i da mali procenat dece razvija dugoročne posledice. Deca sa JFN imaju

zanemarljivo veći rizik od pojave epilepsije (1%) u odnosu na opštu populaciju (0.5%) (122). Međutim, novije retrospektivno istraživanje koje uključivalo preko 7500 dece sa FN i 30000 dece bez FN, pokazalo je da je pojava epilepsije u populaciji dece sa FN češća za 11.4 puta u odnosu na učestalost u zdravoj populaciji (123). Rizik za nastanak epilepsije kod dece sa SFN je veći i iznosi 4-6%, u zavisnosti od broja rekurentnih FN (123,124).

Epidemiološke studije su opisale **faktore rizika za pojavu epilepsije** posle FN: a) abnormalni neurološki i razvojni status pre prvog FN, b) pojava afebrilnih napada u porodici i c) kompleksni karakter FN (125-128).

Istraživanja na ljudima i životinjama su pokazala da su FN kratkog trajanja benigni. Međutim, da li produženi FN i febrilni epileptički status dovodi do razvoja epilepsije i dalje je nejasno. Generalno, prospektivne epidemiološke studije daju malo dokaza u prilog uloge FN u epileptogenezi (129), međutim u studijama koje su pacijente sa FN pratile duži vremenski period ishod epilepsije je učestaliji (129). Veliku učestalost osoba sa TLE koje su u svojoj istoriji bolesti imali pojavu SFN-s, ukazuje na potencijalni doprinos FN epileptogenezi. Studije na animalnim modelima pružaju mogućnost da se bolje razjasne navedeni podaci koji nisu potpuno dosledni.

U studiji na animalnim modelima uočeno je da je 30% životinja koje su imale produžene FN razvile TLE, a interiktalna pražnjenja su primećena kod 88,2% životinja (129). Nasuprot tome, kod modela kod kojih su sprečeni napadi nisu uočene nikakve EEG abnormalnosti. Ovi nalazi podržavaju epileptogenu prirodu FN. Mehanizam pomoću kojeg status epileptikus ili produženi FN doprinosi razvoju epilepsije nije poznat (129).

Epilepsija se javlja kod 13-25% dece sa svim tipovima FN (130). Međutim, retrospektivne studije su pokazale da preko 70% pacijenata koji imaju epilepsiju temporalnog režnja (TLE), koja predstavlja formu veoma komplikovane epilepsije često rezistentne na farmakološku terapiju, u svojoj anamnezi imaju pojavu produženih febrilnih napada (131-133). Febrilni napadi, pogotovo rekurentni i produženi mogu izazvati trajne promene u ravnoteži ekscitatornih i inhibitornih odgovora u hipokampalnim neuronskim krugovima, kao i mezijalnu temporalnu sklerozu, što može dovesti do epileptogeneze nakon FN (131-133).

Encefalopatija je retka komplikacija FN. Skorija istraživanja ukazuju na to da

određene promene u *SCNI* genu mogu predisponirati decu za pojavu produženih FN (mutacija u genu za natrijumske kanale SCN1a i 2a) (133).

Produženi FN mogu uzrokovati poremećaj maturacije bele mase mozga, što utiče na da njenu neuroplastičnost i mikrostukturalnu reorganizaciju (134). Generalno se smatra da deca sa JFN nisu u povećanom riziku za kasniji razvoj neurološkog deficita, niti je poremećen razvoj inteligencije i kognitivnih funkcija kod te dece (135,136).

Nekoliko studija uključujući i meta analize su pokazale kontradiktorne podatke u vezi profilaktičke primene antiepileptika (137-139). Profilaktička primena antiepileptika se koristi samo u slučaju rekurentnih FN koji su se javili u kratkom vremenskom roku (3 ili više napada u toku 6 meseci, 4 ili više napada u toku godinu dana) i kod FN koji su trajali duže od 15 min (122). Rektalna upotreba Diazepam predstavlja prvi izbor terapije (nivo dokaza I) (137).

1.2. POPULACIONO-GENETIČKA ISTRAŽIVANJA

Homozigot ili homozigotnost podrazumeva prisustvo istih genskih alela na paru homologih hromozoma. U slučaju prisustva različitih alela, genotip je označen kao heterozigot (140).

Dominatno-recesivno nasleđivanje se odnosi na interakciju alela jednog gena, pri čemu preovladava osobina jednog alela nad drugim, odnosno dominantni alel se ispoljava u fenotipu i u homozigotnom ili heterozigotnom stanju, a recesivni alel samo kod recesivnog homozigota (141).

Za relativno mali broj biohemijskih karakteristika je poznato mesto gena čiji aleli kodiraju specifične procese. Upravo zbog toga utvrditi genetičku homozigotnost u humanoj populaciji nije ni malo jednostavan zadatak. Za određen broj morfo-fizioloških osobina koje su kontrolisane od strane jednog ili veoma malog broja gena, utvrđeno je da se ispoljavaju kao kvalitativne fenotipske karakteristike, na osnovu njihovog nasleđivanja i tipa varijabilnosti. Treba istaći da regulatorni geni mogu imati uticaja na ekspresiju ovih osobina (141,142).

Da bi se odredio stepen genetičke homozigotnosti različitih parova hromozoma koji nose odgovarajuće grupe gena bitno je identifikovati prisustvo izvesnog broja morfo-fizioloških karakteristika u homozigotno-recesivnom obliku (143).

Distribucija i način nasleđivanja osobina koje se nasleđuju autozomno-dominantno su opisani u istraživanjima iz oblasti populacione genetike. Studije koje su proučavale zastupljenost i raspodelu brojnih, jasno ispoljenih recesivnih osobina pokazale su signifikantne razlike u prisustvu ovih osobina kod različitih grupa ispitanika, kako unutar populacije, tako i među različitim populacijama (143-147). Populaciono-genetičke studije koje su do sada rađene utvrdile su prisustvo uvećane recesivne homozigotnosti i smanjene varijabilnosti za testirane genske lokuse u različitim grupama bolesnika: moždani udar, balkanska endemska nefropatija, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, tuberkuloza pluća, kao i alkoholičara (148-151).

Do sada u pedijatrijskoj populaciji istraživanja rađena kod dece sa spinalnim disrafizmom i razvojnim poremećajima kuka su takođe pokazala uvećanu recesivnu homozigotnost, kao i da je uvećan stepen genetičke homozigotnosti u korelaciji sa ozbiljnijim stepenom izraženosti bolesti (152-157).

Razlike u stepenu genetičke homozigotnosti su primećene i među različitim grupama zdravih ispitanika koji pokazuju određene talente i sklonosti (143,158,159). Umanjen stepen recesivne homozigotnosti i uvećana varijabilnost koja je identifikovana u ovim grupama ispitanika dovodi organizam u specifično stanje genetičko-fiziološke homeostaze koje bi moglo predstavljati izvesnu predispoziciju za njihovo ispoljavanje (158,159).

Najnovija istraživanja kod pacijenta sa ishemičnim moždanim udarom i koronarnim arterijskim bolestima su utvrdila smanjenu varijabilnost i uvećanu recesivnu homozigotnost u odnosu na kontrolnu grupu (148,150,151). Rezultati navedenih istraživanja upućuju na to da uvećana recesivna homozigotnost verovatno podrazumeva i uvećanje genetičkih opterećenja što bi moglo predstavljati vid predispozicije za lakše ispoljavanje bolesti.

Obzirom da su FN genetički determinisani i imajući u umu rezultate prethodnih istraživanja, pretpostavljeno je da bi uvećan stepen genetičke homozigotnosti i smanjena

varijabilnost u grupi dece sa FN takođe mogla predstavljati vid predispozicije za lakše ispoljavanje ovog stanja tj. mogu biti u korelaciji sa pojavom FN.

2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog istraživanja bili su sledeći:

1. Ustanoviti frekvencu javljanja jednostavnih febrilnih napada (JFN) i složenih febrilnih napada (SFN) u ispitivanoj grupi dece sa FN;
2. Odrediti učestalosti alela i genotipova *rs2297201* polimorfizma *KCC2 (SLC12A5)* gena i *rs222747* polimorfizma *TRPV1* gena u grupi osoba sa FN i kontrolnoj grupi, kao i da se ispita da li postoji razlika u učestalosti alela i genotipova polimorfizama datih gena između ispitanika sa i bez FN, kao i između dece sa JFN i SFN;
3. Utvrditi stepen genetičke homozigotnosti i varijabilnosti kod ispitanika sa FN i kontrolne grupe, kao i korelaciju stepena genetičke homozigotnosti i varijabilnosti između ispitanika sa JFN i SFN.

3.MATERIJAL I METODE

3.1. DIZAJN STUDIJE I SELEKCIJA ISPITANIKA

Istraživanje je sprovedeno kao randomizovana studija preseka u periodu od 1. marta 2014. do 31. decembra 2017. godine na Univerzitetskoj dečijoj klinici u Beogradu. Molekularno-genetička ispitivanja urađena su u laboratoriji Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (revidirana verzija iz 1983. godine). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U studiju je bilo uključeno 150 pacijenata sa dijagnostikovanim FN, uzrasta od 1 do 16 godina hospitalizovanih ili lečenih ambulantno u Univerzitetskoj dečijoj klinici u Beogradu. Za svakog pacijenta dijagnoza FN je postavljena na osnovu definicije ILAE (11). Glavni kriterijum za uključivanje u studiju je bila pojava FN bez prethodne pojave afebrilnog napada.

I Pacijenti su na osnovu tipa FN, a prema definiciji ILAE podeljeni u dve grupe (11):

1. Grupa pacijenata sa jednostavnim febrilnim napadom (JFN) (N=98)
2. Grupa pacijenata sa složenim febrilnim napadom (SFN) (N=52)

Kod 26 pacijenata pored pojave FN postojala je i dijagnoza epilepsije. Dijagnoza epilepsije je postavljena na osnovu pojave najmanje dva afebrilna napada (izuzimajući pojavu jednog afebrilnog napada i neonatalnih napada) praćeni specifičnim EEG epileptiformnim promenama. Pacijenti sa dokazanom intrakranijalnom infekcijom ili metaboličkim disbalansom, kao i pacijenti sa nepotpunim podacima su isključeni iz studije.

II Na osnovu prisustva epilepsije pacijenti su podeljeni u dve grupe:

1. Grupa pacijenata sa epilepsijom (N=26)
2. Grupa pacijenata bez epilepsije (N=124)

Svaki ispitanik tj. njihov roditelj/staratelj je dao pismeni pristanak za učešće u studiji, predhodno odobren od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kontrolnu grupu činilo je 121 ispitanik stariji od 5 godina. Kontrolna grupa je birana uz pomoć računara metodom slučajnih brojeva iz evidencije kartona predškolskih i školskih dispanzera sa teritorije Beograda, iz grupe dece koja u svojoj anamnezi nisu imali pojavu febrilnih i afebrilnih napada. Ispitanici u kontrolnoj grupi su bili slične polne distribucije, poticali su iz iste sredine i bili su sličnih socijalno-epidemioloških karakteristika, kao i pacijenti koji su bili uključeni u ispitivanje. Oboleli ispitanici i pojedinci iz kontrolne grupe predstavljaju pripadnike iste populacije (Srpska populacija).

Svi relevantni anamnestički podaci su se koristile iz istorija bolesti ili ambulantnih kartona pacijenata. Nakon neurološkog pregleda ispitanicima je direktnim posmatranjem utvrđeno prisustvo homozigotno-recesivnih osobina (HRO) prema HRO testu (152,154) i uziman im je uzorak krvi ili bris bukalne sluznice u cilju izolacije DNK. Molekularno-genetičke analize su urađene kod 229 dece (112 dece sa FN-ma i 117 ispitanika u kontrolnoj grupi).

3.2. MOLEKULARNO-GENETIČKA ISTRAŽIVANJA

3.2.1. IZOLACIJA DNK

U studiji je korišćena DNK pacijenata izolovana iz leukocita periferne krvi i bukalne sluznice.

3.2.1.1. IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI

Iz leukocita periferne krvi DNK je izolovana metodom isoljavanja (engl. *salting out*), prema Milleru i saradnicima (158). Hemijski sastav pufera korišćenih pri izolaciji DNK prikazan je u tabeli 1.

Uzorak krvi od 5 ml sa antikoagulansom (natrijum-citrat, etilendiamintetraacetatna kiselina - EDTA) meša se sa istom količinom pufera za lizu nakon čega se 15 do 20 minuta drži na temperaturi od +4 °C. Zatim se centrifugira 15

minuta na 2000 rpm. Supernatant se odbacuje, a talog se resuspenduje u 5 do 10 ml fiziološkog pufera. Uzorak se ponovo centrifugira 15 minuta na 2000 rpm. Postupak se ponavlja dok talog ne pobeli. Posle poslednjeg ispiranja supernatant se odbacuje, a talogu se dodaje 3 ml pufera A, 30 μ l 10% proteinaze K i 200 μ l 10% SDS (natrijum-dodecisuulfat). Uzorak se temeljno resuspenduje i inkubira tokom noći na 37 °C. Sledećeg dana se dodaje 1 ml 6M NaCl, energično promućka i centrifugira na 3000 rpm 15 minuta. Supernatant se prenosi u čiste epruvete i centrifugira na 4000 rpm 15 minuta. Nakon toga, u čistu graduisanu epruvetu se preliva supernatant u koji se dodaje ista zapremina izopropanola. Blagim mućkanjem, izdvaja se končić DNK beličaste boje. Končić se pažljivo pokupi staklenim štapićem i potapa u 70% etanol tokom 30 sekundi. DNK se na staklenom štapiću suši na vazduhu i potom se rastvara u 300 μ l destilovane vode (160).

Tabela 1. Sastav pufera korišćenih za izolaciju DNK metodom isoljavanja.

Pufer za lizu*	Fiziološki pufer	Pufer A	TE pufer
0.32M saharoza	0,075 M NaCl	10mM TRIS HCl ^	10 mM TRIS HCl^
10 mM TRIS HCl^	0,025M EDTA pH8	400 ml NaCl	1mM EDTA
1% TRITON x 100		2 mM EDTA	
5 mM MgCl₂			

*autoklavirati i čuvati na temperaturi od +4 °C; ^ pH 7.5

Koncentracija DNK merena je spektrofotometrom na 260 nm, a čistoća uzorka određivana je na osnovu apsorbance na 260 i 280 nm.

3.2.2 IZOLACIJA DNK-a IZ BUKALNE SLUZNICE

Za izolaciju DNK iz bukalne sluznice koristili smo fenol-hloroform metodu izolacije. Brisevi bukalne sluznice se dobro osuše. Pažljivo se makazama skinu što veći deo vate sa briseva i stavi u plastične epruvete sa poklopcima i doda 280 μ l TNS pufera i

20 μ l proteinaze K. Uzorak se spusti na dno epruvete, a nakon toga se ostavi u vodenom kupatilu na 56°C tokom noći.

Sutradan se uzorci centrifugiraju na 4000 rpm 30 sekundi. Potom se vata uzme pincetom i ocedi o zidove epruvete i prebaci u probušenu epruvetu od 0,5ml. Ovu epruvetu stavljamo u veću epruvetu od 2ml. Ponovo centrifugiramo na 4000 rpm 1 minut, vadimo manju epruvetu od 0,5ml i u oborenu tečnost u većoj epruveti dodajemo 300 μ l suspenzije fenol:hloroform:izoamil alkohol u odnosu 25:24:1. Obrtanjem epruvete izmešamo njen sadržaj. Centrifugiramo na 4000 rpm 7 minuta. U dobijeni supernatantu dodamo 300 μ l rastvora hloroform:izoamil alkohol u odnosu 24:1. Centrifugira se ponovo 7 minuta, nakon čega gornju fazu prebacimo u novu epruvetu. Na kraju se doda 30ml 3 MNaCl i 600 μ l u apsolutnog etanola sa leda, pomeša se i ostavi se na ledu tokom noći.

Treći dan se centrifugiraju uzorci na 15000 obrtaja 30 minuta. Odlije se alkohol, a uzorak se ispira 70% etanolom. Uzorci se suše u termostatu dva sata na 37°C. Potom se doda 50 μ l destilovane vode i ostavi da se rastvara preko noći.

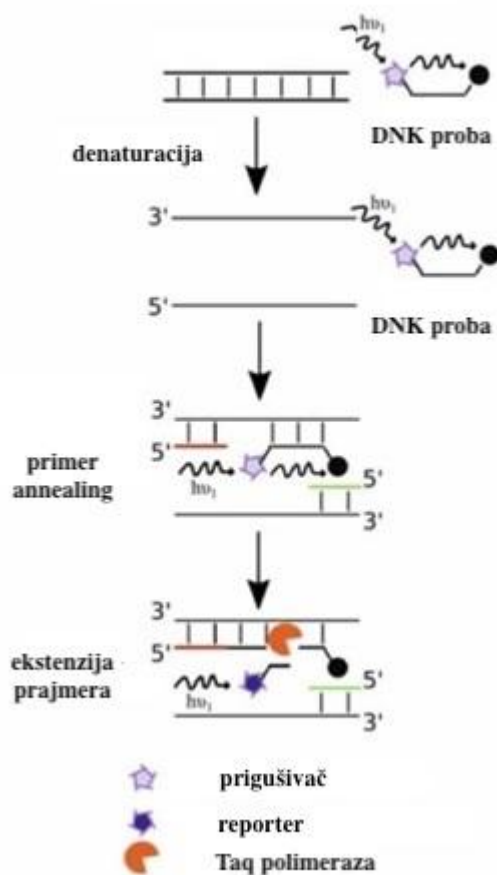
Za detekciju polimorfizma primenili smo reakciju lančane polimerizacije (PCR).

3.2.3. METODA PCR U REALNOM VREMENU (*Real time* PCR)

Za određivanje genotipova analiziranih polimorfizama koristi se više metoda, među kojima je i PCR u realnom vremenu (*real time* PCR) sa primenom TaqMan eseja. Poznat je i pod nazivom kvantitativni PCR. Ova metoda je nastala modifikacijom konvencionalnog PCR-a, tako da se dinamika umnožavanja DNK fragmenta meri u realnom vremenu nakon svakog ciklusa reakcije. Tokom ove reakcije pored prajmera, koristi se i alel specifične oligonukleotidne probe koje su na 5' kraju obeležene određenim fluorescentnim bojama (*reporter* boje npr. VIC i FAM), dok se na 3' kraju nalazi *prigušivač* (*quencher*) čija je uloga blokiranje emisije fluorescencije. Jedna od proba se po principu komplementarnosti vezuje se za ciljanu sekvencu DNK u fazi vezivanja prajmera. Tokom PCR reakcije do uklanjanja probe dolazi kada Taq polimeraza dodaje nove nukleotide pomoću 5'-3' egzonukleazom aktivnosti enzima. Prvo dolazi do odvajanja 5'nukleotid sa reporterskom bojom usled udaljavanja

prigušivača i fluoresciranja ove boje što aparat za *real time* PCR registruje. Intenzitet fluorescencije raste tokom svakog ciklusa i omogućava nam praćenje dinamike reakcije u realnom vremenu (Slika 5).

Nakon završetka PCR reakcije, povećanje fluorescencije obe boje ukazuje na heterozigotnost ispitivanog alela. Povećanje fluorescencije samo jedne boje ukazuje na homozigotno stanje. Prednost *real time* PCR-a je mogućnost istovremene analize velikog broja uzoraka, kao i to što se kompletna analiza odvija u jednoj reakcionoj tubi. Rezultati reakcije se obrađuju u odgovarajućem programu i tabelarno prikazuju.



Slika 5. Faze *real time* PCR reakcije (pruzeto sa sajta www.bitesizebio.com)

3.2.4. ANALIZA *rs2297201* POLIMORFIZMA *KCC2* i *rs222747* POLIMORFIZMA *TRPVI* GENA

Analiza i detekcija polimorfizama *KCC2* i *TRPVI* gena u genomu pacijenata sa FN izvršena je TaqMan metodom korišćenjem komercijalno dostupnih smeša oligonukleotida, #C_16186074_10 za *rs2297201* polimorfizam *KCC2* gena i #C_1093688_20 za *rs222747* polimorfizam *TRPVI* gena (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom urađena je pomoću navedenih smeša komercijalnih oligonukleotida i Maxima™ Probe qPCR 2X Master Mix, (Fermentas, Vilnius, Litvanija) prateći preporuke proizvođača reagensa. Amplifikacija je vršena u optičkim pločama sa PCR, 8 x 12 bunarčića (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), u koje su sipane reakcione smeše od kojih je svaka sadržala 5 µl 2 x Real Master Mix, (Fermentas, Vilnius, Litvanija), 0.25 µl komercijalne smeše oligonukleotida za detekciju nevedenih polimorfizama i 4.75 µl ispitivanog DNK uzorka (4ng/µl). Ploče su zatim zatvarane lepljenjem optičkog filma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i smeštene u termoblok Realplex2 PCR aparata (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka). Ploče su pre amplifikacije inkubirane u termobloku 4 minuta na 95 °C kako bi se aktivirala DNK polimeraza. Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sekundi, zatim 60°C 1 minut sa 39 ponavljanja. Fluorescencija je merena u svakom ciklusu na 60°C. Nakon završene amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

Kod analize polimorfizama *KCC2* gena VIC boja odgovarala je alelu C, a je FAM boja odgovarala alelu T, dok je kod polimorfizma *TRPVI* gena VIC boja odgovarala alelu C, a FAM boja alelu G.

3.3. UTVRĐIVANJE STEPENA GENETIČKE HOMOZIGOTNOSTI I VARIJABILNOSTI (HRO-TEST)

Korišćenjem originalnog HRO-testa kao metode, autora akademika Dragoslava Marinkovića i profesorke Suzane Cvjetičanin (143), u našem istraživanju utvrđivali smo nivo genetičke homozigotnosti i varijabilnosti kod pacijenata sa FN i u kontrolnom uzorku „zdrave” dece.

Popunjavanje HRO testa je podrazumevalo notiranje prisustva 20 homozigotno-recesivnih osobina (HRO). HRO su kvalitativne spoljašnje osobine koje ispitivač beleži tokom pregleda od kojih je 10 osobina u regionu glave, a ostatak vezan za gornje ekstremitete (Tabela 2). HRO testom se određuje procenat homozigotno-recesivnih osobina kod pojedinca koji može ukazati na eventualno prisustvo genetičkih opterećenja, a koja utiču na kapacitet razvoja, uz mogućnost da oni koji pripadaju ekstremnim varijantama mogu imati sklonosti za pojavu specifičnih svojstava uključujući povećanu ili smanjenu otpornost na pojavu određenih bolesti (143).

Na osnovu prisustva kvalitativnih HRO možemo utvrditi da li je u pitanju prevalencija heterozigotnih ili homozigotnih lokusa na različitim hromozomima humanog kariotipa. Utvrđeni broj HRO nam omogućava da utvrdimo stepen gensko-hromozomske homozigotnosti. Stepenski gensko-hromozomske homozigotnosti ispoljava, kako individualnu tako i grupnu varijabilnost (143-159).

Neke HRO u regionu glave su: plave oči (genska lokacija 15q12, 15q13, OMIM 227220; 5p13 OMIM 227240; 14q32.1, OMIM 210750; 9q23 OMIM 612271), vezan ušni režanj (*Online Mendelian Inheritance in Man* broj 128900), ravan skalp (OMIM broj 194000), dva cveta u kosi, obrnuta orijentacija kose u cvetu (OMIM broj 139400), prava (1q21.3, OMIM 139450), meka, plava kosa (lokacija gena 15q12, 15q13, OMIM 227220; 14q32.1, OMIM 210750; 12q21.3, OMIM 611664; 11q13.3, OMIM 612267), daltonizam (genska lokacija Xq28, OMIM broj 303800) i nesposobnost poprečnog i uzdužnog savijanja jezika (OMIM broj 189300). Recesivne osobine prisutne na ekstremitetima su: kažiprst duži ili kraći od četvrtog prsta (OMIM broj 136100), proksimalna i distalna hiperekstenzibilnost palca, način preklapanja šaka (OMIM broj 139800), levorukost (lokacija gena 2p12-q22, OMIM broj 139900) itd (90).

Tabela 2. Test homozigotno recesivnih osobina (HRO-test)

HRO-test
1. Svetla kosa
2. Prava kosa
3. Dva cveta u kosi
4. Obratan cvet u kosi
5. Meka kosa
6. Ravan skalp
7. Vežan ušni režanj
8. Uho bez Darvinove kvрге
9. Plave oči
10. Slepilo za boje
11. Govorne mane
12. Nesposobnost poprečnog savijanja jezika
13. Nesposobnost uzdužnog savijanja jezika
14. Desni palac preko levog
15. Palac pod uglom većim od 45°
16. Ubacivanje palca u zglobu
17. Hiperekstenzibilnost palca
18. Tri tetive u korenu šake
19. Levorukost
20. Kažiprst duži od 4 prsta kod muškog pola, obratno kod ženskog pola

Prilikom prikupljanja podataka ispitivanje je obavljala ista osoba, radi što veće objektivnosti. Recesivnim osobinama smatrane su samo ekstremno izraženi fenotipovi (izuzetno meka i prava kosa, izrazito plava kosa i plave oči, izrazita hiperekstenzibilnost zglobova i sl.). Pseudohromatska tablica (Ishiaras Tests for Color-Blidenes) je korišćena za utvrđivanje sposobnosti razlikovanja boja (163).

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

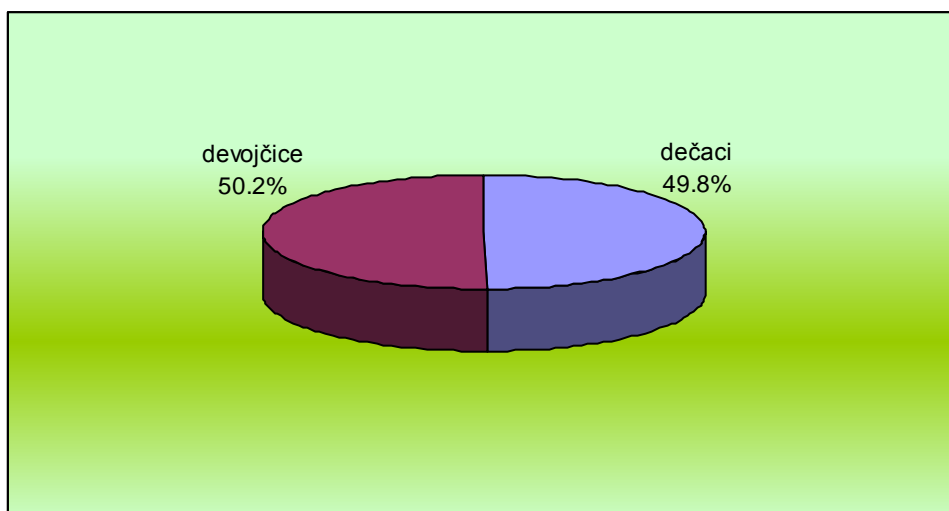
U okviru deskriptivne statistike korišćeni su: grupisanje, tabeliranje, grafičko prikazivanje i poređenje (kružni, stubičasti i linijski dijagram), relativni brojevi (pokazatelji strukture - %), mere centralne tendencije (aritmetička sredina - \bar{x} , medijana - med, mod - mod), mere varijabiliteta (interval varijacije - I, standardna devijacija - sd, koeficijent varijacije - V, standardna greška - SE). Od metoda analitičke (inferencijalne) statistike u radu su našli primenu Kolmogorov-Smirnov metod (ZKS), t test (t), hi-kvadrat test (χ^2) kao test slaganja i tablice kontigencije, jednofaktorska analiza varijanse (F).

Statistička obrada je izvršena u programu IBM SPSS Statistics 20.

4. REZULTATI

U našu studiju je bilo uključeno 271 ispitanik, od kojih je 135 (49.8%) ispitanika bilo muškog, a 136 (50.2%) ženskog pola (Grafikon 2).

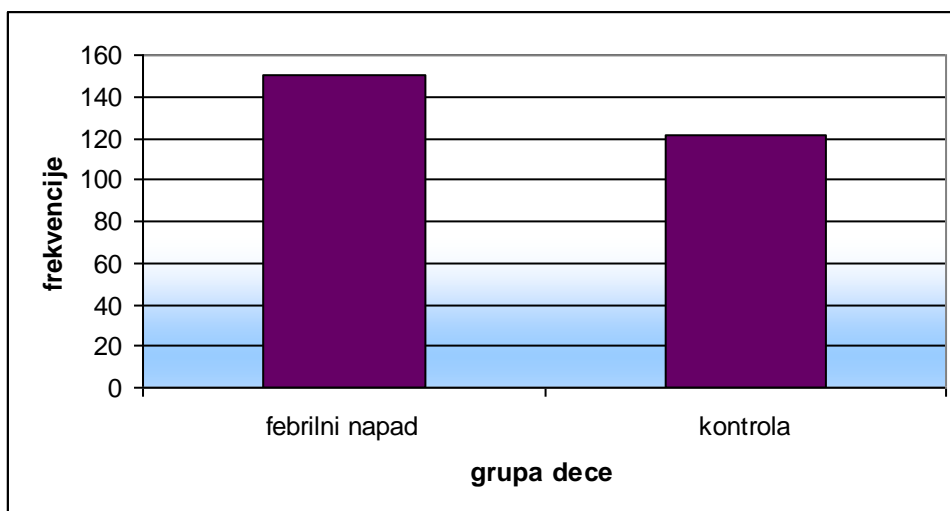
Grafikon 2. Učestalost ispitanika po polu



Učestalost ispitanika po polu se statistički značajno ne razlikuje u odnosu na opštu populaciju ($\chi^2=0.135$; $p=0.713$) (Muškarci = 48.7%, žene = 51.3% na osnovu procene stanovništva u R. Srbiji za 2014. godinu – prema podacima Instituta za Javno zdravlje Srbije dr Milan Jovanović Batut).

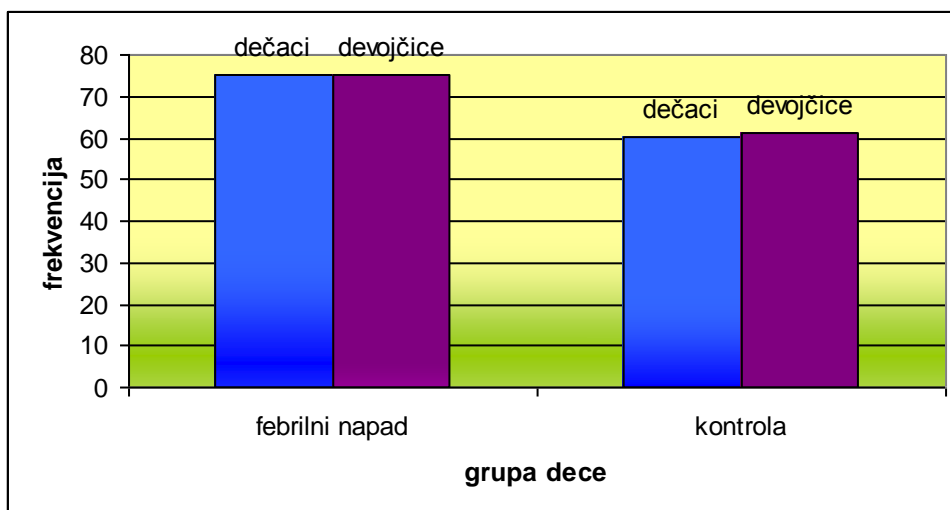
Ispitanici su bili podeljeni u dve grupe: grupu dece sa FN (150, odnosno 55.4%) i kontrolnu grupu – zdravi ispitanici (121, odnosno 44.6%) (Grafikon 3).

Grafikon 3. Učestalost dece sa FN i zdrave dece (kontrola)



U grupi dece sa FN bio je jednak broj dečaka i devojčica (po 75 ispitanika, tj. 50%), dok je u kontrolnoj grupi bilo 60 dečaka (49.6%) i 61 devojčica (50.4%) (Grafikon 4).

Grafikon 4. Učestalost ispitanika po polu u grupi dece sa febrilnim napadima i kontrolnoj grupi

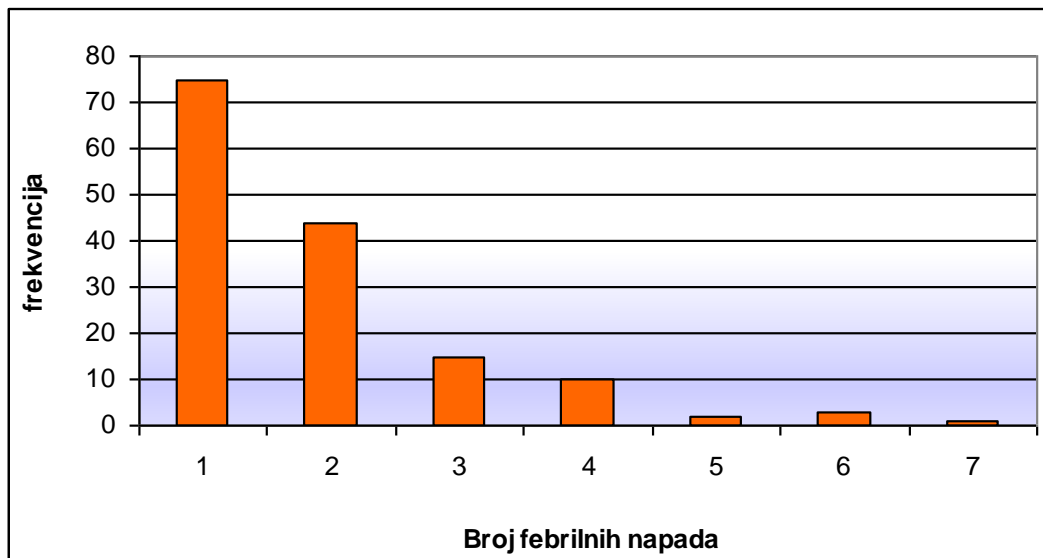


Najmlađi ispitanik u grupi dece sa FN imao je 7 meseci, a najstariji 16 godina. Prosečna starost dece sa FN bila je 7.038 ± 4.29 godina. Medijana (srednja vrednost) godina starosti dece sa FN je $med=6.000$ godina, a mod (najčešća vrednost) godina starosti $mod=4.000$ godine.

Deca su prvi FN dobijala između 5 i 61 meseca starosti. Prosečna starost dece u momentu javljanja prve konvulzije bila je 19.97 ± 10.85 meseci. Srednja vrednost uzrasta dece sa prvom konvulzijom je 17.50 meseci (med=17.50). Prvu konvulziju deca su najčešće dobijala u uzrastu od 18 meseci (mod=18).

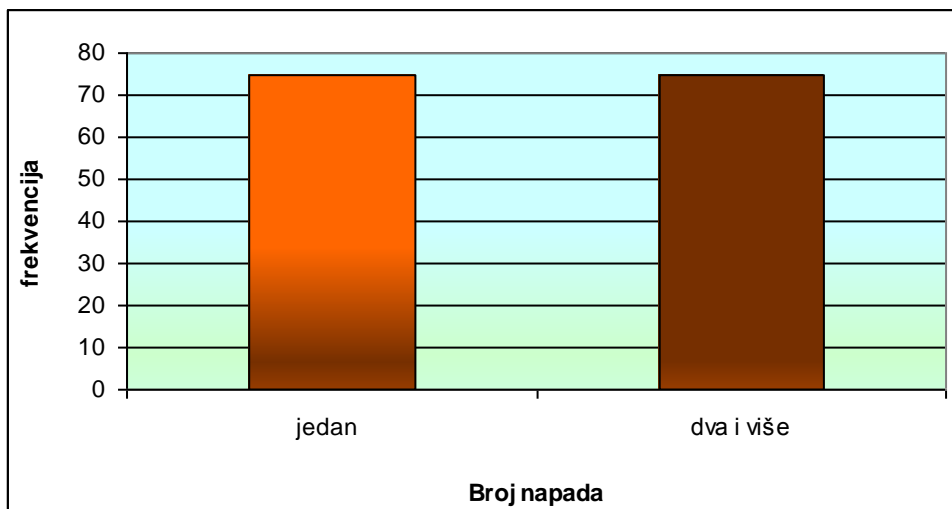
Broj FN koji su deca imala je tokom perioda ispitivanja bio je različit. Sa porastom broja FN učestalost dece se smanjuje. Naši ispitanici (N=150) imali su između jednog i sedam FN (Grafikon 5). Najveći broj dece imao je samo jedan FN (75, odnosno 50.0%), a zatim dva (44, odnosno 29.3%). Dalje, sa povećanjem broja napada učestalost dece se naglo smanjuje. Tri FN imalo je 15 dece (10.0%), a četiri 10 dece (6.7%). Sa pet FN bilo je dvoje dece (1.3%), sa šest troje (2.0%), a sedam je imalo svega jedno dete (0.7%) (Grafikon 5).

Grafikon 5. Učestalost dece prema broju FN



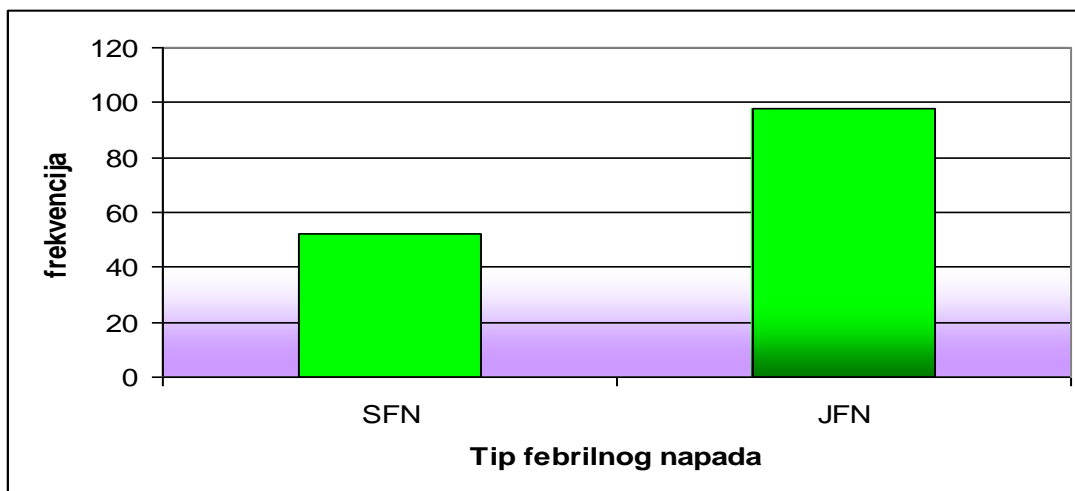
Međutim, broj dece sa jednim FN (75, odnosno 50%) jednak je broju dece koja su imala dva ili više FN tokom života (Grafikon 6).

Grafikon 6. Učestalost dece sa jednim i dva i više febrilna napada



Od 150 dece sa FN, 98 dece (65.3%) imalo je jednostavan febrilni napad (JFN), a 52 SFN (34.7%) (Grafikon 7).

Grafikon 7. Učestalost dece prema vrsti FN

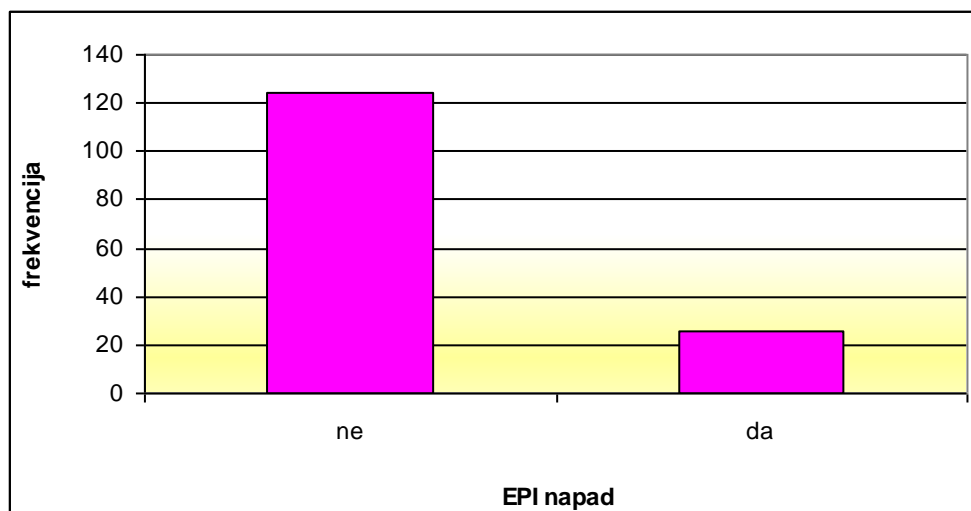


Visoko statistički značajno više bilo je dece sa JFN u odnosu na broj dece sa SFN ($\chi^2=14.629$; $p=0.000$).

Od 150. dece sa FN, kod njih 26 (17.3%) se razvila epilepsija, a veći broj dece nije imao epilepsiju (124, odnosno 82.7%) (Grafikon 8). Visoko statistički značajno

manje dece je razvilo epilepsiju u odnosu na broj dece koja je nisu razvila ($\chi^2=64.027$; $p=0.000$).

Grafikon 8. Učestalost dece prema razvoju epilepsije



Složeni febrilni napad (SFN), kao i JFN se sa podjednakom učestalošću javljaju kod oba pola ($\chi^2 =0.265$; $p=0.607$) (Tabela 3).

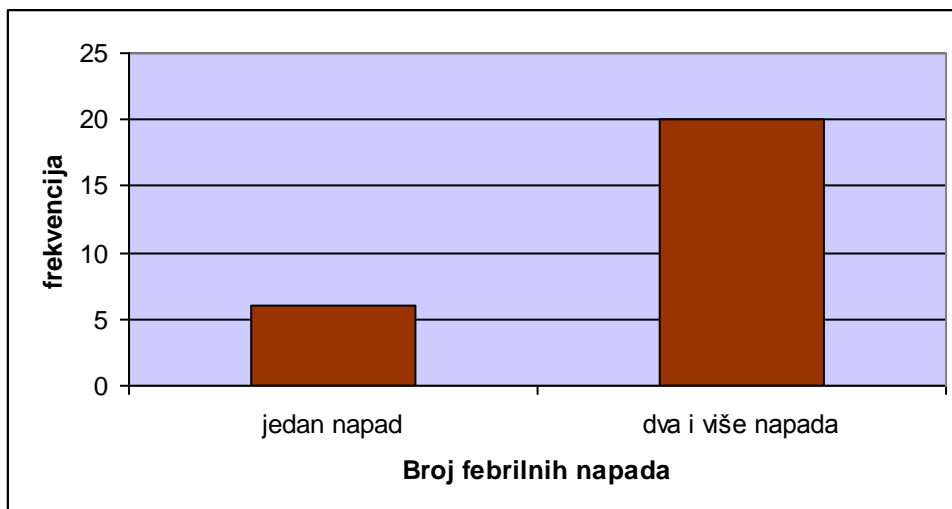
Tabela 3. Značajnost razlike tipa napada prema polu

Tip napada	Pol		Ukupno	χ^2	df	p
	muški	ženski				
SFN	28	24	52	0.121	1	0.728
JFN	47	51	98	0.011		0.917
Ukupno	75	75	150	0.265		0.607

Na tabeli 3 je prikazana učestalost tipa FN prema polu. SFN je približno zastupljen i kod dečaka i kod devojčica ($\chi^2=0.121$; $p=0.728$), kao i JFN ($\chi^2=0.011$; $p=0.917$).

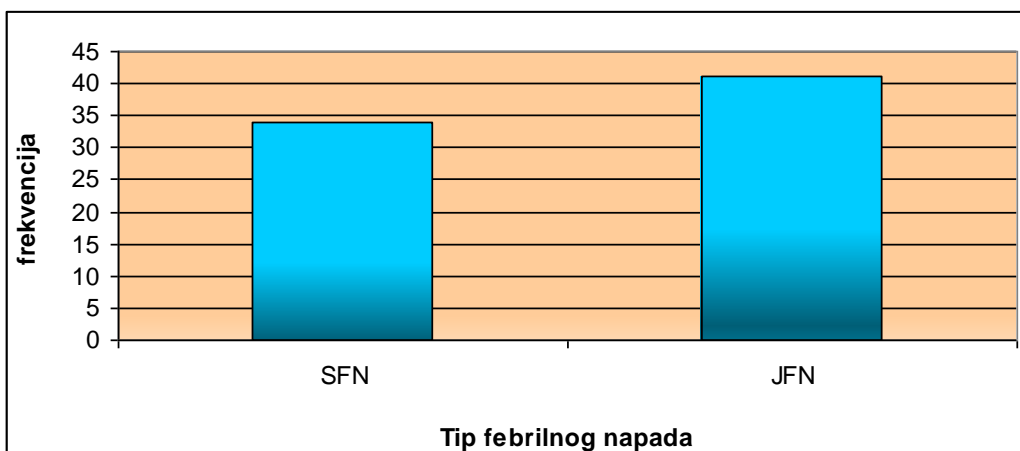
Od 26 dece sa epilepsijom, njih 6 (23.1%) nije imalo ponovljene FN, dok su se FN ponavljali dva ili više puta kod 20 dece (76.9%) (Grafikon 9). Visoko značajno veći broj dece sa epilepsijom imalo je dva ili više FN u odnosu na broj dece sa jednim FN ($\chi^2 = 7.538$; $p = 0.006$).

Grafikon 9. Učestalost rekurentnih FN (dva ili više) kod dece sa epilepsijom



Od ukupno 26 dece sa epilepsijom, po 13 dece (50.0%) je imalo JFN i SFN. Ponovljene FN (dva ili više) imalo je 75 dece, od čega je SFN imalo 34 dece (45.33%), a JFN 41 (54.67%) dete (Grafikon 10). Ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti ponovljenih FN kod dece sa SFN i JFN ($\chi^2 = 0,653$; $p = 0,419$).

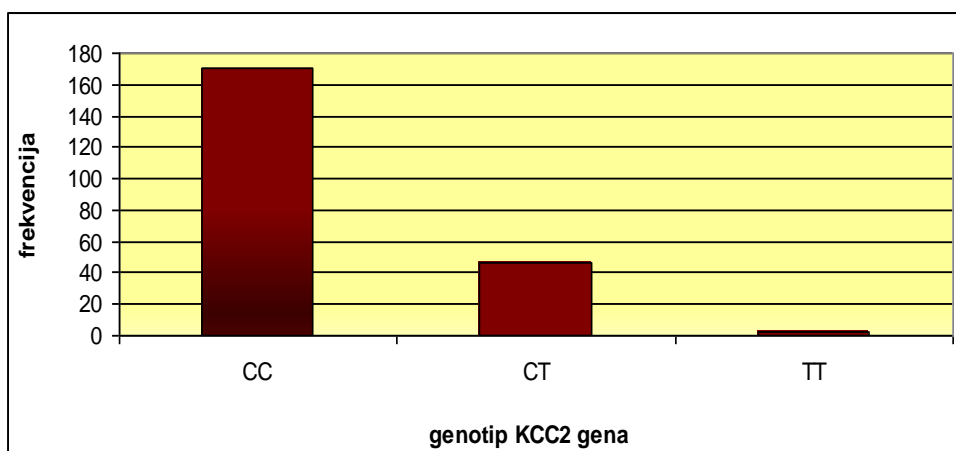
Grafikon 10. Učestalost ponovljenih napada kod dece sa SFN i JFN



4.1.1. ANALIZA POLIMORFIZMA *rs2297201 KCC2 (SLC12A5)* GENA

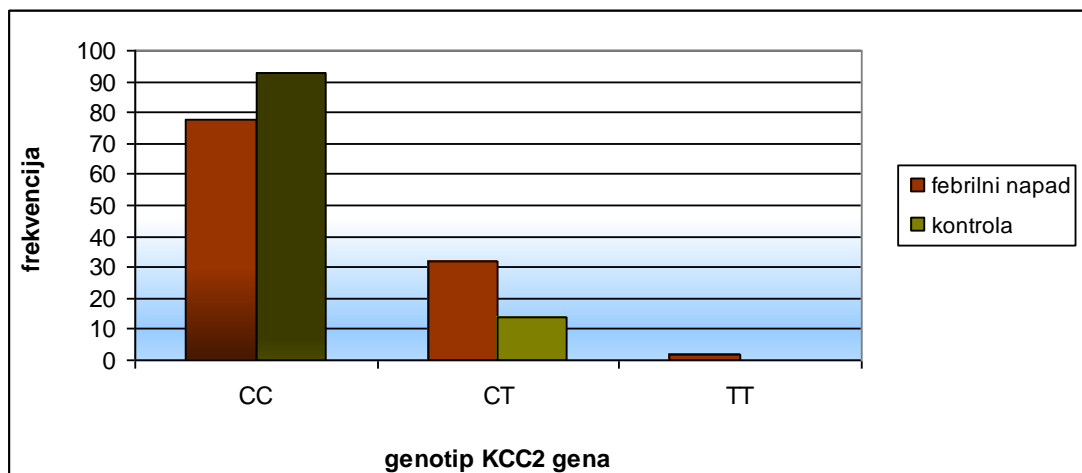
Od 219 dece obe grupe (kontrola i ispitanici sa FN) kod kojih je urađena genotipizacija za *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena, genotip CC imalo je najveći broj dece (171), odnosno 78.1%), zatim genotip CT (46, odnosno 21.0%), a svega dvoje dece genotip TT (0.9%) (Grafikon 11).

Grafikon 11. Distribucija genotipova polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena u ukupnom uzorku



Od ukupnog boja dece kod kojih su analizirani genotipovi polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena, njih 112 je imalo FN (51.1%), a 107 (48.9%) su bili zdravi ispitanici. Među decom FN najzastupljeniji (više od 2/3) je bio genotip CC (78 dece, tj. 69.6%). Genotip CT je bio prisutan kod 32 (28.6%) dece, a svega 1.8% dece (dvoje dece) imalo je genotip TT (Grafikon 12). Među zdravom decom genotip TT nije imalo ni jedno dete. I kod zdrave dece genotip CC je bio najzastupljeniji (93, odnosno 86.9%), a genotip CT je imalo svega 14 dece (13.1%).

Grafikon 12. Distribucija genotipova *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena kod dece sa FN i kontrole



Svi ispitivani genotipovi kod dece sa FN su u Hardy -Veinberg ravnoteži . Učestalosti genotipova i alela polimorfizma *rs2297201* i njihove razlike između FN i kontrolne grupe prikazane su u tabeli 4. Utvrđena je statistički značajna razlika između grupe dece sa FN i kontrolne grupe dece u učestalostima sve tri vrste genotipova polimorfizma *rs2297201* *KCC2* gena ($\chi^2 = 8.557$; $p = 0.003$) (Tabela 4).

Tabela 4. Distribucija genotipova i alela polimorfizma *rs2297201* *KCC2* gena kod dece sa FN i kontrolnoj grupi

Genotip	Grupa		Ukupno %		χ^2	df	p
	FN	%	Kontrola	%			
CC	78	69.64	93	86.92	8.557	1	0.003
CT+TT	34	30.36	14	13.08			
Ukupno	112	100.00	107	100.00			
Aleli %					4.017	1	0.045
C	83.93		93.46				
T	16.07		6.54		11.42		

Genotip CC polimorfizma *rs2297201* *KCC2* gena u grupi dece sa FN (69.64%) je značajno manje zastupljen nego u kontrolnoj grupi (86.92%) (Tabela 4), dok je

genotip CT i TT značajno češće imaju deca sa FN (30.36%) u odnosu na kontrolnu grupu zdrave dece (13.08%) (Tabela 4).

Nije primećena statistički značajna razlika u učestalostima genotipova polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena između dece sa epilepsijom i kontrolne grupe dece ($\chi^2 = 2.471$; $p = 0.116$) (Tabela 5).

Tabela 5. Razlika u učestalosti genotipova polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena između kontrolne grupe i grupe dece sa epilepsijom

Genotip	EPI		Kontrola		χ^2	df	p
	n	%	n	%			
CC	14	70.0	93	86.9	2.471	1	0.116
CT	6	30.0	14	13.1			
Ukupno	20	100.0	107	100.0			

Niti za jedan genotip (CC i CT) polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena nema značajne razlike u učestalosti između grupe dece koja su razvila epilepsiju i kontrolne grupe ($p > 0.05$) (Tabela 5).

Od ukupnog boja dece sa FN kod kojih je analiziran *rs2297201* polimorfizam *KCC2* gena, SFN imalo je 44 (39.3%) dece, a JFN 68 (60.7%) dece. Genotip CC *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena imalo je 26 (59.1%) dece sa SFN i 52 (76.5%) dece sa JFN. Genotip CT imalo je 32 dece. Među njima SFN je imalo je 17 (38.6%), a JFN 15 (22.1%) dece. Genotip TT imalo je po jedno dete i sa SFN (2.3%) i JFN (1.5%) (Tabela 6). Nema značajne razlike u učestalosti ispitivanog polimorfizma između dece sa JFN i SFN ($\chi^2 = 3.824$; $p = 0.148$) (Tabela 6).

Tabela 6. Distribucija genotipova *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena kod JFN i SFN

Genotip	Tip napada				Ukupno	%	χ^2	df	p
	SFN	%	JFN	%					
CC	26	59.1	52	76.5	78	69.6	3.824	2	0.148
CT	17	38.6	15	22.1	32	28.6			
TT	1	2.3	1	1.5	2	1.8			
Ukupno	44	100.0	68	100.0	112	100.0			

Postoji visoko statistički značajna razlika u učestalostima genetičkih varijanti *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena u grupi dece sa SFN i kontrolne grupe ($\chi^2 = 12.836$; $p = 0,000$) (Tabela 7). U kontrolnoj grupi značajno češće je zastupljen genotip CC *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena (86.9%) u odnosu na grupu dece sa SFN (59.1%). Genotip CT i TT su značajno češće zastupljeni u grupi dece sa SFN (40.9%) u odnosu na kontrolnu grupu (13.1%) (Tabela 7).

Tabela 7. Značajnost razlike učestalosti genotipova *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena između dece sa SFN i kontrolne grupe.

Genotip	Grupa				Ukupno	%	χ^2	df	p
	SFN	%	Kontrola	%					
CC	26	59.1	93	86.9	119	78.8	12.836	1	0.000
CT+TT	18	40.9	14	13.1	32	21.2			
Ukupno	44	100.0	107	100.0	151	100.0			

Nije uočena značajna razlika u učestalosti genotipa *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena između dece sa JFN i kontrolne grupe ($\chi^2 = 2.501$; $p = 0.114$) (Tabela 8).

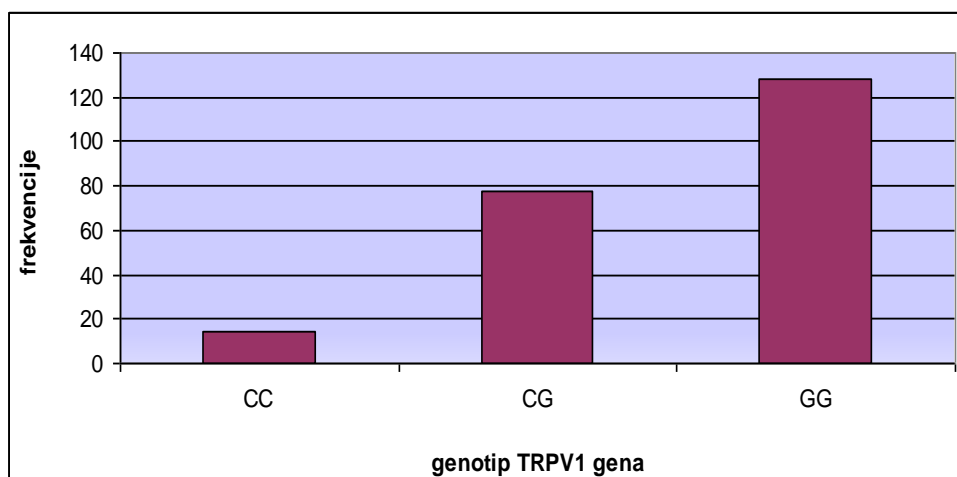
Tabela 8. Distribucija genotipa *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena u grupi dece sa JFN i kontrolnoj grupi

Genotip	Grupa				Ukupno	%	χ^2	df	p
	JFN	%	Kontrola	%					
CC	52	76.5	93	86.9	119	78.8	2.501	1	0.114
CT+TT	16	23.5	14	13.1	32	21.2			
Ukupno	68	100.0	107	100.0	151	100.0			

4.1.2. Analiza učestalosti polimorfizma *rs222747* TRPV1 gena

Od ukupno 220 dece obe grupe (deca sa FN i kontrola), kod kojih je urađena genotipizacija *rs222747* polimorfizma *TRPV1* gena, genotip CC imalo je 14 (6.4%), genotip CG 78 (35.5%), a genotip GG najveći broj dece – njih 128 (58.2%) (Grafikon 13).

Grafikon 13. Distribucija učestalosti *rs222747* polimorfizma TRPV1 gena u ukupnom uzorku



Određivanje vrste genotipova *rs222747* polimorfizma gena *TRPV1* rađeno je kod 220 dece. Od tog broja 111 (50.5%) ispitanika pripadalo je grupi FN, a 109 (49.5%) je pripadalo kontrolnoj grupi. Među decom sa FN genotip CC imalo je najmanji broj, svega 10 (9.0%), genotip CG 37 (33.3%), a najveći broj dece - više od polovine (64, odnosno 57.7%) genotip GG (Grafikon 14) (Tabela 9). U kontrolnoj grupi takođe je

najzastupljeniji bio genotip GG (više od polovine dece, 64, tj. 58.7%), zatim CG (41, tj. 37.6%), a najmanji broj dece, svega 4 (3.7%) je imalo genotip CC (Grafikon 14) (Tabela 9).

Grafikon 14. Distribucija genotipova *rs222747* polimorfizma *TRPV1* gena kod dece sa FN i kontrolnoj grupi

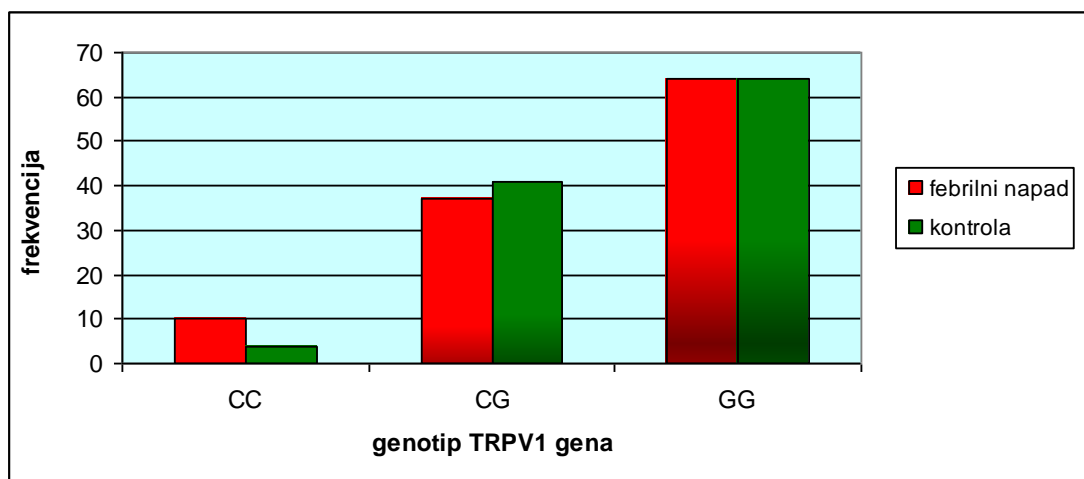


Tabela 9. Distribucija genotipova i alela *rs222747* polimorfizma *TRPV1* gena kod dece sa FN i u kontrolnoj grupi

Genotip	Grupa						χ^2	df	p
	FN	%	Kontrola	%		%			
CC	10	9.0	4	3.7	14	6.4	2.759	2	0.252
CG	37	33.3	41	37.6	78	35.5			
GG	64	57.7	64	58.7	128	58.2			
Ukupno	111	100.0	109	100.0	220	100.0			
Aleli %									
C	25.68		22.48		24,09		0.161	1	0.688
G	74.32		77.52		75,91				

Između grupe dece sa FN i kontrolne grupe nije uočena statistički značajna razlika u učestalostima genotipova i alela *rs222747* polimorfizma gena *TRPVI* ($\chi^2=2.759$; $p=0.252$) (Tabela 9).

Od 20 dece koja su imala epilepsiju, troje (15.0%) je imalo genotip CC, osmoro (40.0%) genotip CG, a devetoro dece (45.0%) genotip GG (Tabela 10). U kontrolnoj grupi takođe je najmanji broj (njih četvoro, tj. 3.7%) imalo genotip CG, 41 dete (37.76%) genotip CG, a najveći broj, više od polovine dece (64, odnosno 58.7%) genotip GG (Tabela 10).

Između grupe dece sa epilepsijom i kontrolne grupe dece ne postoji statistički značajna razlika u učestalostima u tri vrste genotipa *rs222747* polimorfizma *TRPVI* gena ($\chi^2 =4.85$; $p=0.101$) (Tabela 10).

Tabela 10. Distribucija genotipova *rs222747* polimorfizma *TRPVI* gena između dece sa epilepsijom i kontrolne grupe

Genotip	EPI		Kontrola		χ^2	df	p
	n	%	n	%			
CC	3	15.0	4	3.7	4.585	2	0.101
CG	8	40.0	41	37.6			
GG	9	45.0	64	58.7			
Ukupno	20	100	109	100			

Analiza *rs222747* polimorfizma *TRPVI* genaje urađena za 111 dece sa FN. SFN je imalo je 44 (39.6%) dece, a JFN 67 (60.4%) dece. Genotip CC imalo je četvoro (9.1%) dece sa SFN i šestoro (9.0%) dece sa JFN (Tabela 11). Genotip CG imalo je 37 dece i od toga složen febrilni napad imalo je 12 (27.3%), a JFN 25 (37.3%) dece. Genotip GG od 64 dece imalo je 28 (63.6%) sa SFN, a 36 (53.7%) dece sa JFN (Tabela 11).

Nema statistički značajne razlike u učestalostima genotipova *rs222747* polimorfizma *TRPV1* gena između različitog tipa napada ($\chi^2 = 1.256$; $p = 0.534$) (Tabela 11).

Tabela 11. Zastupljenost genotipova polimorfizma *rs222747 TRPV1* gena u grupi dece sa JFN i SFN

Genotip	Tip napada				Ukupno	%	χ^2	df	p
	SFN	%	JFN	%					
CC	4	9.1	6	9.0	10	9.0	1.256	2	0.534
CG	12	27.3	25	37.3	37	33.3			
GG	28	63.6	36	53.7	64	57.7			
Ukupno	44	100.0	67	100.0	111	100.0			

Nema statistički značajne razlike u učestalostima genotipova polimorfizma *rs222747 TRPV1* gena u grupi dece sa SFN i kontrolne grupe ($\chi^2 = 2.856$; $p = 0.240$) (Tabela 12).

Tabela 12. Distribucija genotipova *rs222747* polimorfizma *TRPV1* gena kod dece sa SFN i u kontrolnoj grupi

Genotip	Tip napada				Ukupno	%	χ^2	df	p
	SFN	%	Kontrola	%					
CC	4	9.1	4	3.7	8	5.2	2.856	2	0.24
CG	12	27.3	41	37.6	53	34.6			
GG	28	63.6	64	58.7	92	60.1			
Ukupno	44	100.0	109	100.0	153	100.0			

Nema statistički značajne razlike učestalosti pojedinih genotipova polimorfizma *rs222747 TRPV1* gena između dece sa JFN i kontrolne grupe ($\chi^2 = 2.223$; $p = 0.329$) (Tabela 13).

Tabela 13. Zastupljenost genotipova polimorfizma *rs222747 TRPVI* gena u grupi dece sa JFN i u kontrolnoj grupi

Genotip	Tip napada				Ukupno	%	χ^2	df	p
	JFN	%	Kontrola	%					
CC	6	9.0	4	3.7	10	5.7	2.223	2	0.329
CG	25	37.3	41	37.6	66	37.5			
GG	36	53.7	64	58.7	100	56.8			
Ukupno	67	100.0	109	100.0	176	100.0			

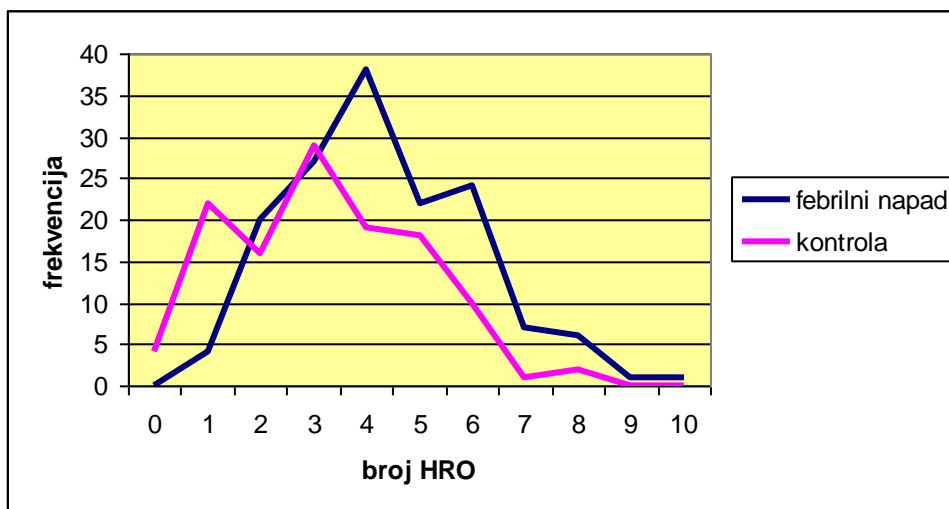
4.2. Varijabilnost homozigotno recesivnih osobina kod osoba sa febrilnim napadima i u kontrolnom uzorku

Nakon izvršenog testiranja, utvrđeno je da se srednje vrednosti prisustva testiranih HRO u grupi osoba sa FN i kontrolnoj grupi pokazuju značajno razlikuju (KN=3.2 ± 0.2, FN=4.3 ± 0.14, t=5,023, p<0.001) (Tabela 14). Prateći distribuciju HRO (Grafikon 15) kod ispitanika sa FN, primećeno je pomeranje vrednosti u desno u odnosu na kontrolnu grupu, što nam pokazuje uvećan stepen genetičke homozigotnosti u grupi FN ispitanika. Najveći broj pacijenata u kontrolnom uzorku imao je tri HRO, dok su deca sa FN u najvećem broju imala četiri HRO, što takođe ukazuje na veći procenat genetičke homozitnosti (Grafikon 15). Varijacioni koeficijent (V) kod ispitanika u kontrolnoj grupi je veći u odnosu na grupu osoba sa febrilnim napadima (KN: V=55,3%; FN: V=41,0%) (Tabela 14), što upućuje na značajno manju varijabilnost u zastupljenosti testiranih osobina u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.

Tabela 14. Zastupljenost i varijabilnost homozigotno recesivnih osobina (HRO) u kontrolnom uzorku i kod ispitanika sa febrilnim napadima (FN)

Grupa	n	x	Sd	SE	V	t	p
Febrilni napad	150	4,31	1,769	0,144	41.044	5,023	0,000
Kontrola	121	3,22	1,782	0,162	55.342		

Grafikon 15. Zastupljenost HRO u kontrolnom uzorku i kod pacijenata sa febrilnim napadima (FN)



Analizirajući zastupljenost pojedinačnih HRO u kontroli i kod pacijenata sa FN uočili smo visoko značajnu razliku ($\sum X^2=96.407$, $p<0.001$)(Tabela 15). Poređenjem ove dve grupe primetili smo da postoji razlika u procentualnoj zastupljenosti gotovo svih HRO, od kojih je 10 karakteristika značajno češće bilo prisutno kod dece sa FN u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 15. Karakteristike br.1,2,5,8,10,12,13,16,18,19). U kontrolnoj grupi ispitanika dve osobine pokazuju veću procentualnu zastupljenost (Tabela 15. Karakteristike broj 9 i 14), koja nije značajna.

Tabela 15. Zastupljenost HRO u kontrolnom uzorku i kod ispitanika sa febrilnim napadima

HRO osobine	Kontrola n=121		Febrilni napad n=150		X ²
	n	%	n	%	
1	9	7,44	20	13,33	4,673*
2	37	30,58	67	44,67	6,491*
3	12	9,92	22	14,67	2,274
4	8	6,61	10	6,67	0,000
5	19	15,70	41	27,33	8,615**
6	32	26,45	40	26,67	0,002
7	9	7,44	18	12,00	2,798
8	9	7,44	21	14,00	5,789*
9	30	24,79	24	16,00	3,119
10	1	0,83	4	2,67	4,098*
11	21	17,36	28	18,67	0,099
12	10	8,26	28	18,67	13,093***
13	17	14,05	46	30,67	19,654***
14	48	39,67	50	33,33	1,012
15	16	13,22	27	18,00	1,726
16	26	21,49	48	32,00	5,143*
17	24	19,83	37	24,67	1,177
18	24	19,83	47	31,33	6,666**
19	7	5,79	19	12,67	8,186**
20	32	26,45	50	33,33	1,794
Ukupno ΣX^2					96,407

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

4.2.1. Varijabilnost homozigotno recesivnih osobina kod ispitanika sa jednostavnim febrilnim napadom (JFN) i složenim febrilnim napadom (SFN)

Upoređivanjem prosečnih vrednosti HRO među ispitanicima sa jednostavnim febrilnim napadom (JFN) i složenim febrilnim napadom (SFN) u odnosu na zdrave ispitanike utvrđene su značajna uvećane vrednosti u obe podgrupe pacijenata (KN=3.2 ± 0.2; JFN: 4.1±0.2; SFN: 4.7±0.3, p<0.001) (Grafikon 16)(Tabela 16), što upućuje na postojanje uvećane recesivne homozigotnosti u ovim grupama ispitanika. Varijacioni koeficijent je u obe podgrupe ispitanika sa FN je bio niži u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, (KN: V=55.3%; JFN: V=42%; SFN: V=38.4%) (Tabela 16), što upućuje na značajno manju varijabilnost za testirane genske lokuse u FN grupama. Takođe, uočava se i da je varijabilnost kod pacijenata sa JFN viša od one kod pacijenata sa SFN. Ovi rezultati upućuju na uvećanje stepena recesivne homozigotnosti i smanjenje varijabilnost za testirane genske lokuse sa izraženijom ekspresijom FN.

Varijacioni koeficijent kod ispitanika sa JFN je bio niži u odnosu na kontrolnu grupu, a viši u odnosu na SFN (KN: V=55.4%; JFN: V=42%; SFN:38.4%) (Tabela 16), što upućuje na značajno manju varijabilnost u zastupljenosti testiranih osobina obe podgrupe.

Tabela 16. Zastupljenost i varijabilnost homozigotno recesivnih osobina (HRO) u kontrolnom uzorku i kod ispitanika sa jednostavnim febrilnim napadima (JFN) i složenim febrilnim napadima (SFN)

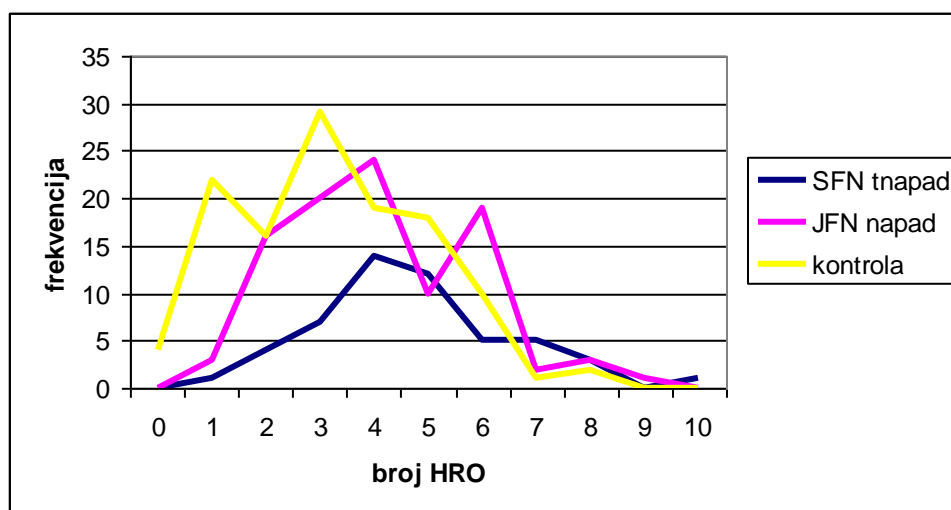
Grupa	n	x	Sd	SE	V	F	p
SFN	52	4.71	1.808	0.251	38.39	14.806	0.000
JFN	98	4.10	1.720	0.174	41.95		
Kontrola	121	3.22	1.782	0.162	55.34		

Upoređivanjem prosečnih vrednosti HRO između ispitanika sa JFN i SFN uočeno je da ne postoji statistički značajna razlika u prisustvu HRO, ali je vrednost viša kod ispitanika sa SFN (JFN: 4.1±0.2; SFN: 4.7±0.3, p=0,135 p>0.05) (Tabela 16), što ukazuje na to da postoji veća recesivna homozigotnost kod ispitanika sa SFN. U obe podgrupe najviše je bilo ispitanika sa 4 HRO, što nam pokazuje da nema razlike u

opštoj genetičkoj homozigotnosti (Grafikon 15). Međutim, varijacioni koeficijent osoba sa SFN je manji u odnosu na ispitanike sa JFN, što upućuje na manju varijabilnost ispitanika sa SFN (Tabela 16).

Posmatrajući distribuciju HRO (Grafikon 16) u kontrolnom uzorku i kod dece sa FN, primećujemo pomeranje vrednosti HRO kod oba uzorka dece sa FN ka višim vrednostima tj. u desno, što ukazuje na uvećan stepen opšte genetičke homozigotnosti u ovim dvema grupama ispitanika.

Grafikon 16. Zastupljenost HRO u kontrolnom uzorku i kod pacijenata sa JFN i SFN



Prateći zastupljenost pojedinačnih HRO kod ispitanika u podgrupama JFN i SFN u odnosu na kontrolni uzorak, primetili smo da postoji razlika u raspodeli ovih karakteristika u obe podgrupe ispitanika (Tabela 17). U podgrupi ispitanika sa JFN 15/20 HRO su bile češće zastupljene u odnosu na kontrolu, od kojih je 8 statistički značajno odstupalo (Karakteristike broj 2,5,8,10,12,13,18,20) (Tabela 17). Sa druge strane HRO koje su bile ređe prisutne u podgrupi ispitanika sa JFN nisu statistički značajno odstupale. Kod ispitanika sa SFN 16 HRO su češće bile u odnosu na kontrolnu grupu, a njih 13 je statistički značajno odstupalo (Karakteristike 1,2,3,5,7,8,9,12,13,15,16,17,19). Manji broj HRO je bio učestaliji u kontrolnoj grupi (4/20), međutim, nijedna od njih nije statistički značajno odstupala. Vrednost ukupnog χ^2 testa ukazuju na statistički značajne razlike ove dve podgrupe u odnosu na kontrolnu grupu (**JFN/KN =84,9***; SFN/KN =195,5*****) (Tabela 17).

Tabela 17. Zastupljenost HRO u kontrolnom uzorku i kod ispitanika jednostavnim febrilnim napadima (JFN) i složenim febrilnim napadima (SFN)

HRO osobine	Kontrola n=121		SFN n=52		JFN n=98		SFN / Kontrola	JFN / Kontrola	SFN / JFN
	n	%	n	%	n	%	X2	X2	X2
1	9	7,44	8	15,38	12	12,24	8,490**	3,106	0,723
2	37	30,58	25	48,08	42	42,86	10,013**	4,930*	0,601
3	12	9,92	11	21,15	11	11,22	12,731***	0,172	6,722**
4	8	6,61	4	7,69	6	6,12	0,177	0,036	0,361
5	19	15,70	17	32,69	24	24,49	18,383***	4,917*	2,403
6	32	26,45	17	32,69	23	23,47	1,475	0,335	3,113
7	9	7,44	8	15,38	10	10,20	8,490**	1,029	2,187
8	9	7,44	8	15,38	13	13,27	8,490**	4,565*	0,315
9	30	24,79	7	13,46	17	17,35	5,179*	2,236	0,996
10	1	0,83	0	0,00	4	4,08	0,826	12,821***	2,041
11	21	17,36	13	25,00	15	15,31	3,367	0,242	4,949*
12	10	8,26	14	26,92	14	14,29	42,125***	4,387*	8,556**
13	17	14,05	16	30,77	30	30,61	19,897***	19,525***	0,001
14	48	39,67	16	30,77	34	34,69	1,997	0,624	0,472
15	16	13,22	13	25,00	14	14,29	10,489**	0,085	6,314*
16	26	21,49	19	36,54	29	29,59	10,542**	3,057	1,476
17	24	19,83	17	32,69	20	20,41	8,335**	0,017	6,005*
18	24	19,83	12	23,08	35	35,71	0,530	12,713***	5,696*
19	7	5,79	9	17,31	10	10,20	22,950***	3,375	3,930*
20	32	26,45	11	21,15	39	39,80	1,059	6,739**	12,581***
Ukupno ΣX2							195,546***	84,914***	69,442***

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

Uočena je statistički značajna razlika u zastupljenosti pojedinačnih HRO u grupi osoba sa SFN u odnosu na osobe sa JFN (Tabela 17) (Karakteristike broj

3,11,12,15,17,18,19,20). Od 8 HRO koje statistički značajno odstupaju, šest HRO su češće zastupljene kod ispitanika sa SFN, što ukazuje na veću homozigotnost ovih ispitanika u odnosu na osobe sa JFN (Tabela 17). Vrednost ukupnog χ^2 testa ($\sum\chi^2=69.4^{***}$) ukazuje na statistički značajno odstupanje među ovim grupama.

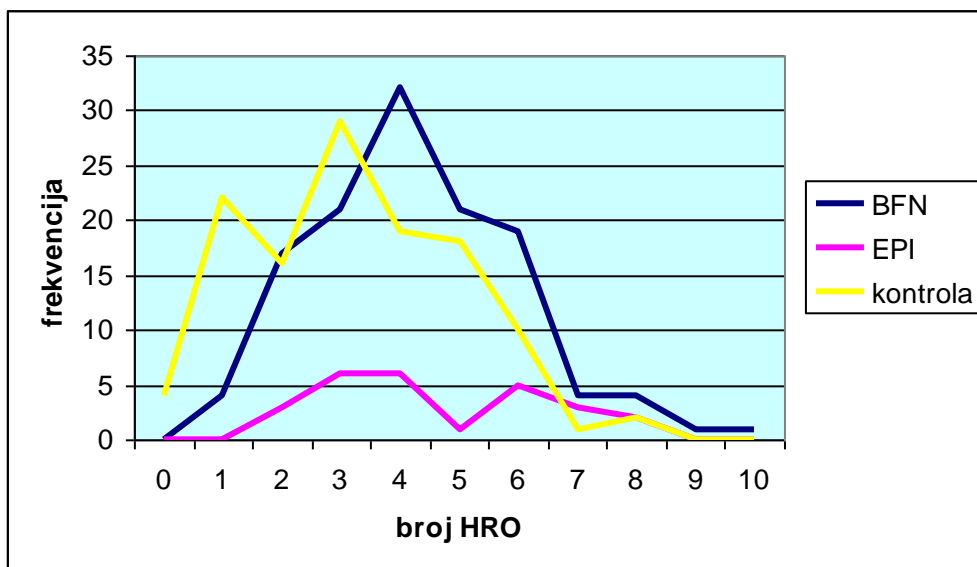
4.2.2. Varijabilnost homozigotno recesivnih osobina u kontrolnom uzorku ispitanika i kod ispitanika sa febrilnim napadima i epilepsijom

Poređenjem prosečnih vrednosti HRO podgrupa dece koja imaju epilepsiju (EPI) i one koja nemaju epilepsiju (BFN) u odnosu na kontrolni uzorak (KN) pokazuju visoko statistički značajnu razliku (KN: 3.2 ± 0.2 ; EPI: 4.6 ± 0.4 ; BFN: 4.3 ± 0.2 ; $p < 0.001$) (Tabela 18)(Grafikon 17), međutim, međusobnim poređenjem ove dve podgrupe nije uočena statistički značajna razlika (EPI: 4.6 ± 0.4 ; BFN: 4.3 ± 0.2 , $p > 0.05$) ali je neznatno veća recesivna homozigotnost kod ispitanika sa EPI (Tabela 18). Varijacioni koeficijent je bio najniži takođe kod ispitanika koji imaju epilepsiju (EPI), što nam ukazuje na najmanju varijabilnost ove grupe ispitanika (Tabela 18).

Tabela 18. Zastupljenost i varijabilnost homozigotno recesivnih osobina (HRO) u kontrolnom uzorku i kod ispitanika sa febrilnim napadima koji imaju epilepsiju (EPI) i ispitanika sa febrilnim napadima koji nemaju epilepsiju (BFN)

Grupa	n	x	Sd	SE	V	F	p
BFN	124	4.25	1.747	0.157	41.10	13.088	0.000
EPI	26	4.62	1.878	0.368	40.69		
Kontrola	121	3.22	1.782	0.162	55.34		

Grafikon 17. Zastupljenost homozigotno recesivnih osobina (HRO) u kontrolnom uzorku i kod pacijenata sa EPI i BFN



Posmatrajući distribuciju pojedinačnih HRO primetili smo da postoji razlika u procentualnoj zastupljenosti svih 20 osobina unutar podgrupa (Tabela 19). U grupi pacijenata sa EPI u odnosu na kontrolu 16 karakteristika su bile češće kod ispitanika sa EFN, od kojih je osam statistički značajno odstupalo (Karakteristike No.1,2,4,10,11,12,16,17,19). Dve HRO su značajno češće bile kod ispitanika iz kontrolne grupe (Karakteristike 4,9). Kod ispitanika iz grupe BFN 16 HRO su bile češće u odnosu na zdrave ispitanike, a osam osobina su statistički značajno odstupale (Karakteristike 1,2,5,8,12,13,18,19) (Tabela 19). Poređenjem podgrupa EPI i BFN uočena je statistički značajna razlika sedam HRO (Karakteristike 4,5,11,12,13,16,17) (Tabela 19), od koji su tri HRO bile češće prisutne u grupi osoba sa epilepsijom. Vrednost ukupnog χ^2 u svim podgrupama je bio visoko statistički značajna (**EPI/KN=194,0*****; **BFN/KN=100,0*****; **EPI/BN=90,4*****; $p < 0.001$) (Tabela 19), s tim da je najveću vrednost imala poređenjem grupe sa epilepsijom u odnosu na kontrolnu, što nam pokazuje visok stepen genetičke homozigotnosti kod ove podgrupe ispitanika.

Tabela 19. Zastupljenost HRO u kontrolnom uzorku i kod ispitanika sa febrilnim napadima koji imaju epilepsiju (EPI) i ispitanika sa febrilnim napadima koji nemaju epilepsiju (BFN)

HRO osobine	BFN		EPI		Kontrola		BFN / Kontrola	EPI / Kontrola	BFN / EPI
	n	%	n	%	n	%	X2	X2	X2
1	16	12,90	4	15,38	9	7,44	4,016*	8,490**	0,439
2	53	42,74	14	53,85	37	30,58	4,838*	17,705***	2,587
3	19	15,32	3	11,54	12	9,92	2,946	0,265	1,088
4	10	8,06	0	0,00	8	6,61	0,319	6,612**	4,032*
5	37	29,84	4	15,38	19	15,70	12,726***	0,006	10,291***
6	31	25,00	9	34,62	32	26,45	0,079	2,523	3,185
7	15	12,10	3	11,54	9	7,44	2,918	2,261	0,026
8	18	14,52	3	11,54	9	7,44	6,736**	2,261	0,690
9	21	16,94	3	11,54	30	24,79	2,490	7,086**	2,122
10	3	2,42	1	3,85	1	0,83	3,070	11,034***	0,685
11	18	14,52	10	38,46	21	17,36	0,464	25,668***	27,204***
12	20	16,13	8	30,77	10	8,26	7,484**	61,282***	10,127**
13	41	33,06	5	19,23	17	14,05	25,735***	1,911	7,870**
14	40	32,26	10	38,46	48	39,67	1,385	0,037	1,097
15	23	18,55	4	15,38	16	13,22	2,145	0,353	0,595
16	37	29,84	11	42,31	26	21,49	3,246	20,173***	4,443*
17	27	21,77	10	38,46	24	19,83	0,190	17,493***	10,015**
18	41	33,06	6	23,08	24	19,83	8,824**	0,530	3,670
19	16	12,90	3	11,54	7	5,79	8,758**	5,722*	0,153
20	41	33,06	9	34,62	32	26,45	1,656	2,523	0,071
Ukupno ΣX2							100,026***	193,933***	90,389***

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

4.2.3. Varijabilnost homozigotno recesivnih osobina između polova u kontrolnom uzorku ispitanika i pacijenata sa febrilnim napadima

Poređenjem prosečnih vrednosti HRO između polova u kontrolnom uzorku uočava se da ne postoji statistički značajna razlika (Tabela 20) (KNm=3.3±0.2, KNž=3.2±0.2, t=0.265, p>0.5). Neznatno veća varijabilnost je bila u kontrolnoj grupi dečaka (Vm=56.8%) Vž=54.0%).

Tabela 20. Zastupljenost i varijabilnost homozigotno recesivnih osobina (HRO) kod osoba muškog i ženskog pola u kontroli

Grupa	n	x	Sd	SE	V	t	p
Kontrola M	60	3.27	1.858	0.24	56.82	0.265	0.791
Kontrola Ž	61	3.18	1.718	0.22	54.03		

Prateći zastupljenost pojedinačnih HRO kod dečaka i devojčica u kontrolnom uzorku ispitanika su primećene razlike. Osam HRO su statistički značajno odstupale (Karakteristike broj 3,4,5,11,12,13,16,19) (Tabela 21) od kojih su četiri HRO bile učestalije kod dečaka (Karakteristike broj 3,4,11,12) (Tabela 21). Vrednost ukupnog χ^2 testa ($\sum \chi^2=203.1^{***}$) ukazuje na značajno odstupanje među ovim grupama, što ukazuje na razliku u varijabilnosti za testirane HRO.

Tabela 21. Zastupljenost HRO u kontrolnom uzorku kod dečaka i devojčica

HRO osobine	Kontrola dečaci (KNm)		Kontrola devojčice (KNž)		Kontrola dečaci / Kontrola devojčice
	n	%	n	%	X2
1	3	5,00	6	9,84	3,533
2	21	35,00	16	26,23	2,565
3	12	20,00	0	0,00	10,000**
4	8	13,33	0	0,00	6,665*
5	3	5,00	16	26,23	53,663***
6	16	26,67	16	26,23	0,007
7	3	5,00	6	9,84	3,533
8	3	5,00	6	9,84	3,533
9	12	20,00	18	29,51	3,793
10	1	1,67	0	0,00	0,835
11	15	25,00	6	9,84	16,275***
12	9	15,00	1	1,64	60,367***
13	4	6,67	13	21,31	21,096***
14	21	35,00	27	44,26	2,194
15	7	11,67	9	14,75	0,728
16	10	16,67	16	26,23	4,483*
17	14	23,33	10	16,39	2,502
18	10	16,67	14	22,95	2,042
19	2	3,33	5	8,20	5,007**
20	15	25,00	17	27,87	0,313
Ukupno ΣX2					203,133***

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

Poređenjem prosečnih vrednosti HRO kod ispitanika sa FN prema polu, uočeno je da nema statistički značajne razlike (FNm=4.2±0.2, FNž=4.5±0.2, t=0.969; p>0.5). Varijabilnost je bila nešto veća u grupi dečaka (Vm=42.0%; Vž=40.2%) (Tabela 22).

Tabela 22. Zastupljenost i varijabilnost homozigotno recesivnih osobina (HRO) kod ispitanika sa febrilnim napadima prema polu

Grupa	n	x	Sd	SE	V	t	p
Febrilni napadi - dečaci	75	4.17	1.75	0.202	41.97	-0.969	0.334
Febrilni napadi - devojčice	75	4.45	1.788	0.206	40.18		

Prateći zastupljenost pojedinačnih HRO kod dečaka i devojčica u grupi dece sa FN, primećeno je da između ova dva uzorka ima razlike (Tabela 23). Tako su 8 od 20 HRO statistički značajno odstupale (Karakteristike 4,5,7,9,11,14,15,20) (Tabela 23), od njih šest HRO su bile češće kod devojčica. Vrednosti ukupnog ΣX^2 testa pokazuju da se ove dve grupe statistički značajno razlikuju, što ukazuje na razliku u varijabilnosti za testirane HRO.

Tabela 23. Zastupljenost HRO uzorku dece sa FN prema polu

HRO osobine	Febrilni napadi - dečaci (FNm)		Febrilni napadi -devojčice (FNž)		FNm /FNž
	n	%	n	%	X2
1	10	13,33	10	13,33	0,000
2	38	50,67	29	38,67	3,283
3	10	13,33	12	16,00	0,489
4	3	4,00	7	9,33	5,079*
5	16	21,33	25	33,33	5,535*
6	20	26,67	20	26,67	0,000
7	5	6,67	13	17,33	11,815***
8	10	13,33	11	14,67	0,127
9	15	20,00	9	12,00	4,267*
10	3	4,00	1	1,33	3,556
11	20	26,67	8	10,67	16,800***
12	16	21,33	12	16,00	1,556
13	26	34,67	20	26,67	2,123
14	19	25,33	31	41,33	8,149**
15	10	13,33	17	22,67	5,188*
16	23	30,67	25	33,33	0,223
17	18	24,00	19	25,33	0,072
18	21	28,00	26	34,67	1,435
19	11	14,67	8	10,67	1,295
20	19	25,33	31	41,33	8,149**
Ukupno ΣX2					79,142***

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

Visoko značajna razlika je uočena između dečaka sa FN i dečaka iz kontrolne grupe (KNm=3.3±0.2, FNm=4.2±0.2, t=2.910, p<0.001) (Tabela 24). Takođe, postoji

statistički značajna razlika među devojkicama sa FN i devojkica iz kontrolne grupe (KNz=3.2±0.2, FNz=4.5±0.2, t=3.76, p<0.001) (Tabela 25).

Varijacioni koeficijent je bio niži kod dečaka sa FN u odnosu na kontrolnu grupu dečaka (Vm=42.0%) (Tabela 24), a takođe i kod devojkica sa FN su vrednosti varijacionog koeficijenta bile manje u odnosu na devojkice iz kontrolne grupe (Vž=40.2%) (Tabela 25), što upućuje na umanjenu varijabilnost za testirane HRO.

Tabela 24. Zastupljenost i varijabilnost homozigotno recesivnih osobina (HRO) dečaka u kontroli i ispitanicima sa febrilnim napadima (FN)

Grupa	n	x	Sd	SE	V	t	p
Febrilni napadi - dečaci (FNm)	75	4,17	1,75	0,202	41,97	2,910	0,004
Kontrola dečaci (KNm)	60	3,27	1,858	0,24	56,82		

Tabela 25. Zastupljenost i varijabilnost homozigotno recesivnih osobina (HRO) devojkica u kontroli i ispitanicima sa febrilnim napadima (FN)

Grupa	n	x	Sd	SE	V	t	p
Febrilni napadi – devojkice	75	4,45	1,788	0,206	40,18	4,203	0,000
Kontrola devojkice	61	3,18	1,718	0,22	54,03		

Posmatrajući distribuciju pojedinačnih HRO među dečacima sa FN i dečacima iz kontrolne grupe primećene su razlike (Tabela 26). Devet HRO su statistički značajno odstupale (Karakteristike broj: 1,2,4,5,8,13,16,18,19) (Tabela 26), od kojih je osam HRO bilo češće kod dečaka sa FN, što ukazuje na veći stepen recesivne homozigotnosti u toj grupi. Vrednost ukupnog χ^2 testa ($\sum \chi^2=282.0^{***}$) pokazuje da postoji visoko statistički značajna razlika među ovim grupama, što upućuje na razlike u varijabilnosti prisustva testiranih HRO.

Poređenjem pojedinačnih HRO među devojkicama sa FN i kontrole, primećena je statistički značajna razlika u osam HRO (Karakteristike broj: 2,7,9,12,15,17,18,20) (Tabela 26). Sedam karakteristika je bilo učestalije u grupi devojkica sa FN, što

govori u prilog veće recesivne homozigotnosti ove grupe. Vrednost ukupnog χ^2 testa ($\sum\chi^2=179.2^{***}$) pokazuje da postoji značajna razlika među ovim grupama (Tabela 26) što upućuje na razlike u varijabilnosti prisustva testiranih HRO.

Tabela 26. Zastupljenost HRO kod dečaka i devojčica u kontrolnom uzorku i u grupi dece sa FN

HRO osobine	Kontrola muški pol (KNm)		FN - muški pol (FNm)		KNm /FNm X2	Kontrola ženski pol (KNž)		Febrilni napadi - ženski pol (FNž)		KNž /FNž X2
	n	%	n	%		n	%	n	%	
1	3	5,00	10	13,33	13,889***	6	9,84	10	13,33	1,243
2	21	35,00	38	50,67	7,013**	16	26,23	29	38,67	5,897*
3	12	20,00	10	13,33	2,222	0	0,00	12	16,00	0,000
4	8	13,33	3	4,00	6,533*	0	0,00	7	9,33	0,000
5	3	5,00	16	21,33	53,356***	16	26,23	25	33,33	1,924
6	16	26,67	20	26,67	0,000	16	26,23	20	26,67	0,007
7	3	5,00	5	6,67	0,556	6	9,84	13	17,33	5,715**
8	3	5,00	10	13,33	13,889***	6	9,84	11	14,67	2,372
9	12	20,00	15	20,00	0,000	18	29,51	9	12,00	10,388***
10	1	1,67	3	4,00	3,267	0	0,00	1	1,33	0,000
11	15	25,00	20	26,67	0,111	6	9,84	8	10,67	0,070
12	9	15,00	16	21,33	2,674	1	1,64	12	16,00	125,799***
13	4	6,67	26	34,67	117,600***	13	21,31	20	26,67	1,346
14	21	35,00	19	25,33	2,670	27	44,26	31	41,33	0,194
15	7	11,67	10	13,33	0,238	9	14,75	17	22,67	4,243*
16	10	16,67	23	30,67	11,760***	16	26,23	25	33,33	1,924
17	14	23,33	18	24,00	0,019	10	16,39	19	25,33	4,875*
18	10	16,67	21	28,00	7,707**	14	22,95	26	34,67	5,981*
19	2	3,33	11	14,67	38,533***	5	8,20	8	10,67	0,744
20	15	25,00	19	25,33	0,004	17	27,87	31	41,33	6,505*
Ukupno ΣX2					282,040***					179,229***

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

5. DISKUSIJA

Febrilni napadi pored svoje velike učestalosti u dečijem uzrastu i relativno benigne prognoze mogu imati retke, ali veoma teške komplikacije kao što je mezijalna temporalna epilepsija (TLE). Kod svega 20% bolesnika sa TLE je postignuta zadovoljavajuća kontrola napada primenom antiepileptičkih lekova . Upravo zbog te činjenice TLE predstavlja veliki medicinski, ali i socijalno-ekonomski problem. Finansijsko opterećenje zdravstvenih fondova koje nameće TLE , a koje je posledica radne onesposobljenosti mlađe odrasle populacije , danas se može izjednačiti sa karcinomom dojke među ženama, odnosno karcinomom pluća među muškarcima (165).

Mezijalna temporalna skleroza (MTS) je patološko-histološki supstrat promena koje se karakterišu sa jedne strane značajnim gubitkom neurona u poređenju sa normalnim stanjem, a sa druge strane reorganizacijom strukture i funkcije preostalih neurona hipokampusa. Reorganizacija strukture je odgovorna za formiranje aberantnih puteva komunikacije između neurona i aberantnog reagovanja neurona na stimulaciju, što je u osnovi progresivnog pogoršanja kontrole epileptičkih napada (132). Mehanizam nastanka MTS nije u potpunosti jasan, ali je dobro poznato da u eksperimentalnim uslovima može da se javi posle produžene epizode epileptičkog statusa , izazvanog primenom farmakoloških preparata, ili posle produžene febrilne epizode (132). Oko 50% ovih bolesnika ima podatak u ličnoj anamnezi o inicijalnom in zultu u prve 4 god. života. Najčešće se radi o epizodi S FN (Složen febrilni napad). To sugeriše da se MTS stiče posle nekog inzulta tokom ranih godina života i da jednom razvijena promena dovodi do pojave epileptičkih napada (129,130,132). Da MTS ima ključnu etiopatogenetsku ulogu u nastanku i progresiji epilepsije temporalnog režnja, potvrđuje i činjenica da hirurško uklanjanje ove lezije dovodi do prestanka epileptičkih napada koji su do tada bili refraktarni na primenu medikamenata (165). Procenat pacijenata sa različitim formama epilepsije u našoj studiji je 17.3 %, ovaj procenat je nešto viši u poređenju sa ostalim istraživanjima, gde je procenat pacijenata sa FN koji razviju epilepsiju oko 5.5%-10% (130-135), dok je procenat pojave FN u populaciji sa epilepsijom oko 13% (130). Zanimljiv je podatak da je većina dece sa epilepsijom (76.9%) u svojoj anamnezi imalo ponovljene FN (Grafikon 9). Ovi rezultati potvrđuju nalaze u literaturi koji kažu da su rekurenti febrilni napadi faktor rizika za razvoj

epilepsije (128,131).

Tipičan uzrast javljanja prvog FN je između 6-60 meseca, a najčešće se javljaju u uzrastu od 18 meseci, što se slaže sa rezultatima naše studije (mod=18) (2,4,5,9).

Učestalost dece koja su imala više od dva FN je bila dosta manja (20.7%) u odnosu na decu sa jednim FN (Grafikon 5), i u korelaciji je sa podacima koje smo pronašli u literaturi (126).

U literaturi se navodi da je češća pojava FN kod muškaraca (4), dok studije rađene na teritoriji Srbije navode da nema razlike u obolevanju od FN u odnosu na pol (9), što se slaže sa rezultatima iz naše studije (50% muškarci, 50% žene) (Tabela 3).

U epidemiološkim ispitivanjima jednostavni febrilni napadi (JFN) su češći klinički oblik febrilnih napada i predstavljaju 80-85% svih FN (4,14). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je manja učestalost dece koja su imala JFN (65.6%) (Grafikon 7) u odnosu na podatke koje smo pronašli u literaturi. Ovu razliku objašnjavamo činjenicom da je uzorak prikupljan u tercijarnoj ustanovi, pa je jedan deo dece koja su imala JFN, verovatno bila zbrinuta u ambulatni primarne zdravstvene zaštite. Razlika između naših grupa ispitanika proističe upravo iz činjenice da smo uzorak skupljali u tercijarnoj ustanovi, gde se pacijenti koji imaju epilepsiju prate, dok pacijenti sa FN često potrebno lečenje završe u ustanovi primarne zdravstvene zaštite.

Zanimljivo je da su se u grupi pacijenata sa epilepsijom JFN i SFN javljali sa podjednakom učestalošću (Tabela 3). Ovo je neočekivan nalaz obzirom da se u literaturi navodi da su SFN faktor rizika za razvoj epilepsije u budućnosti (128,131). Ovakvi rezultati mogu biti posledica kratkog perioda praćenja pacijenata.

Ispitivanja pojedinačnih genskih lokusa u našem radu pokazala su odstupanje u učestalosti genotipova i alela u grupi dece sa FN od učestalosti genotipova i alela u opštoj populaciji za jedan od ispitivanih polimorfizma (*rs2297201 KCC2* gena).

Tabela 27. Podaci o učestalosti alela *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena u različitim populacijama

Populacija	Citozin (C)	Timin (T)
Evropa	0.941	0.059
Afrika	0.876	0.123
Azija	0.824	0.175
Ashkenazi Jevreji	0.966	0.034
Amerika	0.638	0.361
Srbija	0.886	0.105

The Eli and Edythe L. Broad Institute of Harvard and MIT. The Exome Aggregation Consortium (ExAC) v0.3

Učestalost C alela *rs2297201 KCC2* gena se kreće od 63.8% do 96.6% u zavisnosti od populacije. Ova učestalost u Evropi predstavlja jednu od najviših i iznosi 94.1%, dok je najniža u Americi (63.8%) (The ALlele Frequency Database. A resource of gene frequency data on human populations supported by the U. S. National Science Foundation). Naše istraživanje je pokazalo učestalost C alela u celom analiziranom uzorku 88.6% što je nešto niže od one u evropskoj populaciji. Učestalost C alela u populaciji dece sa FN je 83.9%, dok je u kontrolnoj grupi bilo 93.5%, što je u skladu sa učestalostima u evropskoj populaciji (Tabela 27).

Već smo napominjali da postoji uzrasno specifičan odgovor neurona nakon vezivanja GABA za receptore u CNS. Ova razlika između zrelog i nezrelog neurona se ogleda u odgovoru GABAA receptora nakon vezivanja GABA neurotransmitera. U nezrelom neuronu, nakon stimulacije GABAA receptora dolazi do depolarizacije neurona i posledične ekscitacije neurona, dok je u zreлом neuronu odgovor na stimulaciju ovih receptora repolarizacija. Uzrok ove razlike je povećana ekspresija *KCC2* tokom neurorazvojnog perioda što i predstavlja bitan faktor za funkcionalni

razvoj mozga (69). Depolarizacija u nezrelim neuronima posredovana GABA transmittersom je rezultat smanjene ekspresije *KCC2* transportera u ranom uzrastu. Pokazano je da depolarizacija neurona nakon stimulacije receptora posredstvom GABA neurotransmitera povećava verovatnoću nastanka poremećaja ekscitatorno-inhibitornog balansa i dovodi do smanjenog konvulzivnog praga kod dece (69). Kako su FN uzrasno specifični, javljaju se do 5 godine, poslednjih godina se analizira uloga *KCC2* gena u nastanku epilepsije i FN (78,79,80,86,87).

Dosadašnja istraživanja pokazuju različite promene u *KCC2* genu kod pacijenata sa FN. Opisana je retka varijanta *KCC2* gena (*KCC2-R952H*) u jednoj australijskoj porodici koja se dovodi u vezu sa FN. Studije funkcionalne ekspresije *in vitro* pokazale su značajno smanjenu površinsku ekspresiju *KCC2* mutiranog proteina (61% wild tipa), kao i smanjen izlazak Cl⁻ iz neurona u poređenju sa normalnim proteinom. Tako da je mutiran protein povezan sa deficitarnim izlaskom Cl⁻ iz neurona, što uzrokuje smanjenu hiperpolarizaciju usled disfunkcije *KCC2* kanala, a koja može biti okidač za pojavu FN (79). Istu varijantu *KCC2* gena (*R952H*) identifikuju Kahle i saradnici 2014. godine u populaciji osoba francusko-kanadskog porekla koji su imali idiopatsku generalizovanu epilepsiju. Pored nje ovi autori su opisali i heterozigotnu varijantu R1049C *KCC2* gena (80). Studije funkcionalne ekspresije *in vitro* koje su usledile, pokazale su da ove varijante utiču na kapacitete izlaska jona Cl⁻ iz neurona, što dovodi do narušene funkcije *KCC2* kanala i doprinosi razvoju epilepsije (80).

Samo dva istraživanja do sada su analizirala *rs2297201* polimorfizam *KCC2* gena u etiologiji nekog oboljenja (89). Kako je ovaj polimorfizam lociran u intronu *KCC2* gena, smatra se da može imati efekat na obradu primarnog prepisa gena.

Naše istraživanje je pokazalo da između grupe dece sa FN i kontrolne grupe dece postoji značajna razlika u učestalostima genotipa polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena ($\chi^2=8.557$; $p=0.003$) (Tabela 5). Zastupljenost genotipa CT i TT značajno češće imaju deca sa FN (30.36%) u odnosu na kontrolnu grupu zdrave dece (13.08%). Obzirom da smo prvi koji su analizirali uticaj ovog polimorfizma na pojavu FN, treba sprovesti dalja istraživanja na većem uzorku, kao i u različitim populacijama. Treba napomenuti da je *KCC2* gen jedan od najnetolerantnijih gena u humanoj populaciji (166) u pogledu genske varijacije, pa promene u ovom genu mogu doprineti fenotipskom ispoljavanju FN. Genotip CC polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena u grupi

dece sa FN (69.6%) je značajno manje zastupljen nego u kontrolnoj grupi (86.9%), što ukazuje da ovaj genotip može imati protektivni efekat za pojavu FN.

Međutim, u našem uzorku između grupe dece sa epilepsijom i kontrolne grupe dece ne postoji značajna razlika u učestalostima u analiziranih genotipova *KCC2* gena ($\chi^2 = 2.471$; $p = 0.116$) (Tabela 5). Kako poremećaj funkcije *KCC2* kanala utiče na ekscitabilnost mozga, očekivali smo postojanje razlike među ovim grupama, obzirom na podatke u literaturi koji su opisali mutaciju ovog gena kod dece sa ranom infantilnom epileptičkom encefalopatijom iz dve nepovezane porodice (83). Kako *KCC2* kanal ima smanjenu ekspresiju tokom razvoja mozga koja korelira sa uzrasno specifičnom pojavom FN, pretpostavljamo da i male promene u funkciji proteina mogu uticati na smanjen konvulzivni prag u ovom uzrastu. S druge strane, možemo pretpostaviti da ispitivani polimorfizam *KCC2* gena nema ulogu u nastanku epilepsije, tj. predstavlja dokaz o različitom mehanizmu nastanka FN i epilepsije. Važno je napomenuti da povećanje temperature utiče na smanjenu funkciju ovog kanala (28), pa možemo pretpostaviti da febrilnost u kombinaciji sa ovim polimorfizmom ima kumulativni efekat na pojavu FN.

Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju da različiti genetski faktori utiču na to da li će se ispoljiti SFN ili JFN (49). Na osnovu naših rezultata podgrupa dece sa SFN visoko značajno razlikuje u učestalostima genetičkih varijanti polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena u odnosu na kontrolu ($\chi^2 = 12.836$; $p = 0.000$) (Tabela 7). Primećena je razlika između kontrolne grupe i JFN, ali nije bila značajna ($\chi^2 = 2.501$; $p = 0.114$) (Tabela 8). Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da postoji pozitivna asocijacija CT i TT genotipova ovog polimorfizma kod dece sa SFN. Međutim, poređenjem učestalosti ovog polimorfizma kod JFN i SFN uočena je razlika koja nije bila značajna ($\chi^2 = 3.824$; $p = 0.148$) (Tabela 6). Na osnovu ovoga možemo pretpostaviti da pojava određenog tipa FN može zavisiti od interakcije više gena koji mogu uticati na ispoljavanje ove bolesti, ali i kompleksnog uticaja faktora rizika spoljašnje sredine koji u kombinaciji sa genetičkom osnovom mogu uticati na ispoljavanje različite oblika ove bolesti.

Učestalost C alela *rs222747* polimorfizma *TRPV1* gena je najniža u Afričkoj populaciji (11.8%), dok je najviša u Aziji (30.1%) (Tabela 28). Rezultati našeg istraživanja su pokazala da je učestalost C alela (24,1%) približna učestalostima u

Evropskoj populaciji (24.7%). Učestalost C alela kod dece sa FN je 25.7%, a u kontrolnoj grupi je 22.5% (Tabela 9).

Tabela 28. Podaci o učestalosti alela *rs222747* polimorfizma *TRPV1* gena u različitim populacijama

Populacija	C	G
Evropa	0.247	0.753
Afrika	0.118	0.882
Azija	0.301	0.698
Ashkenazi Jevreji	0.264	0.736
Amerika	0.244	0.756
Srbija	0.241	0.759

The Eli and Edythe L. Broad Institute of Harvard and MIT. The Exome Aggregation Consortium (ExAC) v0.3

TRPV1 gen kodira TRPV1 kanal koji je predominantno prisutan u mozgu. Ovi kanali kontrolišu razne funkcije neurona i glije, kao što je termoregulacija i sinaptička transmisija (88). TRPV1 kanal je ligand zavisni neselektivni katjonski kanal. Građen je od 6 transmembranskih domena sa intracelularnim amino- i karboksilnim krajem. Na amino kraju nalazi se segment sa najmanje tri ankirin ponavljajuća segmenta koji ima važnu ulogu u funkcionisanju kanala (92). Do sada je *rs222747* polimorfizam ovog gena analiziran kao etiološki faktor različitih bolesti poput diabetes mellitus-a tip 1 (166), hroničnog bola (161) i dispepsije (169). SNP *rs222747* lokalizovan u regionu ponavljajućeg domena ankirina, i njegova varijanta je povezana većim maksimalnim odgovorom na agoniste TRPV1 kanala (110).

U grupi dece sa FN nije uočena značajna razlika u učestalostima genotipova *rs222747* polimorfizma gena *TRPV1* u odnosu na kontrolnu grupu ($\chi^2=2.759$; $p=0.252$) (Tabela 9). Takođe ne postoji značajna razlika u učestalostima genotipova *rs222747*

polimorfizma *TRPVI* gena ($\chi^2=4.585$; $p=0.101$) između grupe dece sa epilepsijom i kontrolne grupe (Tabela 10). Kako su istraživanja u humanoj populaciji pokazala da homozigoti za G alel ovog polimorfizma imaju ulogu u povećanoj sinaptičkoj transmisiji glutamata i utiču na ekscitabilnost neurona (94), očekivali smo veću učestalost ovog alela kod osoba sa FN, pogotovo u grupi dece koja imaju FN i koja su razvila epilepsiju.

Primećena razlika u učestalostima genotipova *rs222747* polimorfizma *TRPVI* gena u grupi dece sa SFN i kontrolne grupe ($\chi^2=2.856$; $p=0.240$), kao i između dece sa JFN i kontrolne grupe ($\chi^2=2.223$; $p=0.329$) nije statistički značajna (Tabela 12,13).

Razlika u učestalostima genotipova i alela ispitivanog polimorfizma *TRPVI* gena među decom sa JFN i SFN takođe nije značajna ($p>0,05$) (Tabela 11). Ovi rezultati bi mogli ići u prilog pretpostavci da ovaj polimorfizam ne predstavlja faktor rizika za nastanak FN, kao ni za ispoljavanje određenog tipa FN. Međutim, navedeni rezultati mogu biti objašnjeni malim brojem ispitanika uključenih u studiju, pa ih treba razmatrati pažljivo jer možda ne oslikavaju stvarne učestalosti u zdravoj populaciji (167).

Poslednjih decenija kao posledica urbanizacije i migracija osoba iz manjih sredina (koje su genetski uniformne), ka većim sredinama, dolazi do povećanja prosečnog stepena individualne i opšte genetičke heterozigotnosti u populaciji (170). Ovo povećanje stepena genetičke heterozigotnosti u populaciji može imati pozitivne efekte na zdravlje individue i populacije (170,171), dok povećanje stepena homozigotnih karakteristika može predstavljati faktor rizika za pojavu bolesti (151-156). Neki autori navode da je distribucija određenih fenotipskih osobina uslovljena rasnom pripadnošću i polom (172). Genetičku osnovu vezivanja lobusa ušne školjke su istraživali brojni naučnici (172). Ova karakteristika je intrigirala istraživače upravo zbog pojave deformiteta ušne školjke kod različitih genetskih sindroma. Fetalni razvoj uha započinje veoma rano i svoj konačni izgled dostiže već tokom 4 meseca intrauterinog razvoja i ne menja se do kraja života (172). Vezani ušni režanj predstavlja recesivnu karakteristiku i na njenu pojavu utiče jedan gen, dok spoljašnji faktori nemaju nikakvog uticaja. Tako nam ova spoljašnja karakteristika pruža informaciju o biološkoj tj. genetičkoj osnovi razvoja uha, poboljšavajući naše razumevanje gena koji su potencijalno uključeni u njene razvojne nedostatke (173).

U poslednjih tridesetak godina brojna istraživanja koja su uključivala grupe pacijenata obolelih od različitih bolesti, a u okviru kojih je utvrđivana genetička homozigotnost upotrebom HRO testa, pokazala su značajne populaciono-genetičke razlike u odnosu na opštu populaciju (143-157). Viši stepen opšte recesivne homozigotnosti je uočen kod brojnih bolesti, kao što je balkanska endemska nefropatija, alkoholizam, spina bifida, urođena displazija kuka, koronarne arterijske bolesti, šlog, bronhogeni karcinom (148-159). Autori pretpostavljaju da uvećani stepen recesivne homozigotnosti na neki način remeti genetičko-fiziološku homeostazu i predstavlja vid predispozicije za lakše ispoljavanje bolesti.

Na osnovu rezultata predhodno navedenih istraživanja, a s obzirom na to da pacijenti sa FN do sada nisu bili uključeni u ovakav vid populaciono-genetičkih istraživanja, želeli smo da steknemo uvid u opšti stepen genetičke homozigotnosti kod pacijeneta sa FN u odnosu na kontrolnu grupu, kao i da utvrdimo stepen genetičke homozigotnosti i varijabilnosti kod različitih podtipova ispitivanog entiteta, na osnovu čega bi se pružile smernice ka daljem istraživanju eventualnih predispozicija za lakšu ekspresiju i etiologiju same bolesti.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju značajnu razliku u stepenu genetičke homozigotnosti za 20 testiranih genskih lokusa u analiziranim grupama što upućuje na postojanje populaciono-genetičke razlike među njima (Tabela 14, Tabela 15, Grafik 14). Kod dece sa FN uočava se značajno viši stepen recesivne homozigotnosti kao i u svim ispitivanim podgrupama pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (KN=3.22 ± 0.16, FN=4.31 ± 0.144, t=5.023, p<0.001; JFN: 4.10±0.164, SFN: 4.71±0.251 f=14.8 p<0.001) (Tabela 14, Grafik 15, Tabela 16, Grafik 16). Geni ispitivani HRO metodom se nalaze na različitim hromozomima, pa ih možemo smatrati markerima tih hromozoma, ali i susednih grupa poligena koji mogu imati uticaj na predispoziciju za pojavu određenih bolesti, možda i FN (143-157).

Upoređivanjem prosečnih vrednosti HRO među ispitanicima sa jednostavnim febrilnim napadom (JFN) i složenim febrilnim napadom (SFN) u odnosu za na zdrave ispitanike utvrđena je značajna razlika u obe podgrupe (KN=3.22 ± 0.162; JFN: 4.10±0.164; SFN: 4.71±0.251, p<0.001) (Grafikon 16) (Tabela 16), što upućuje na postojanje uvećane recesivne homozigotnosti u ovim grupama ispitanika, kao i smanjenu varijabilnost (KN: V=55.34%; JFN: V=41.95%; SFN:38.39%) (Tabela 16).

Posmatrajući distribucija pojedinačnih HRO kod SFN i JFN u odnosu na kontrolu primetili smo razliku (Tabela 17). U podgrupi ispitanika sa JFN 15/20 HRO su bile češće zastupljene u odnosu na kontrolu, od kojih je 8 značajno odstupalo (Karakteristike broj 2,5,8,10,12,13,18,20) (Tabela 17). Sa druge strane HRO koje su bile ređe prisutne u podgrupi ispitanika sa JFN nisu značajno odstupale (Tabela 17). Kod ispitanika sa SFN, 16 HRO su češće bile u odnosu na kontrolnu grupu, a njih 13 je značajno odstupalo (Karakteristike 1,2,3,5,7,8,9,12,13,15,16,17,19). Manji broj HRO je bio učestaliji u kontrolnoj grupi (4/20), međutim nijedna od njih nije značajno odstupala (Tabela 17). Vrednost ukupnog X^2 testa ukazuju na značajne razlike ove dve podgrupe u odnosu na kontrolnu grupu (JFN/KN =84.914***; SFN/KN =195.546***) (Tabela 17) ukazujući na razlike u varijabilnosti u prisustvu testiranih osobina.

Važno je istaći da je varijabilnost dece sa SFN (V=38.39%) (Tabela 16) bila najniža u odnosu na sve ispitivane podgrupe, dok je stepen genetičke homozigotnosti kod ove dece u poređenju sa kontrolnom grupom imao najviše vrednosti (SFN: 4.71 ± 0.251) (Tabela 17). Već smo ranije naveli da SFN predstavljaju faktor rizika ka kasniji razvoj epilepsije u detinjstvu i predstavljaju "teži" oblik FN, što upućuje na činjenicu da povećanjem težine kliničke slike FN može biti u korelaciji sa povećanjem stepena genetičke homozigotnosti i smanjenom varijabilnosti.

Uvećana genetička homozigotnost bi mogla upućivati i na uvećan stepen genetičkih opterećenja što može predstavljati vid predispozicije za lakšu ekspresiju bolesti (148,152,153,155,157).

Rezultati našeg rada pokazuju da se zastupljenosti u prisustvu pojedinačnih HRO razlikuju, 50% (10/20) fenotipskih karakteristika je učestalije kod pacijenata sa FN (Tabela 15), što takođe upućuje na uvećanu recesivnu homozigotnost za gene koji determinišu testirane osobine pa bismo mogli pretpostaviti da izvesne kombinacije gena utiču na pojavu FN kod dece. Važno je istaći da 7/10 HRO koje su značajno odstupale bile u regionu glave (Tabela 15) i sve su bile učestalije kod dece sa FN. Razlike u zastupljenosti pojedinih recesivnih karakteristika mogla bi se objasniti pretpostavkom da geni koji determinišu ispoljavanje oboljenja deluju plejotropno, čime bi mogli da utiču i na druge karakteristike, kao što su i ispitivane HRO (153-157).

Poređenjem ukupnih HRO između grupe dece sa jednostavnim i grupe sa složenim febrilnim napadama (Tabela 16), kao i poređenjem između grupe dece kod

koje se razvila epilepsija i onih kod kojih se nije razvila epilepsija (Tabela 18) nisu pokazale statističku značajnost, što se može objasniti većom homogenošću ovih grupa ispitanika. Međutim kada smo uporedili distribuciju pojedinačnih HRO između datih grupa došli smo do rezultata koji je pokazivao visoku statističku značajnost ($\Sigma X^2_{SFN/JFN}=69,442^{***}$; $\Sigma X^2_{EPI/BFN}=90,389^{***}$, $p<0.001$) (Tabela 17, Tabela 19), što ukazuje na to da verovatno različite grupe gena utiču na to da li će se ispoljiti SFN ili JFN, kao i na to da li će se kasnije razviti epilepsija kod dece koja su imala FN. Veći broj HRO osobina je bio u grupi dece sa epilepsijom u odnosu na grupu dece sa FN koja nisu razvila epilepsiju (Tabela 19). Ovi nalazi idu u prilog činjenici da veći stepen genetičke homozigotnosti možda može upućivati i na veći stepen genetičkih opterećenja, koja mogu dovesti do ispoljavanja težeg oblika oboljenja (152,156,157).

U prilog uvećane recesivne homozigotnosti za testirane genske lokuse kod dece sa FN govori i činjenica da je u kontrolnoj grupi bilo najviše osoba sa 3 HRO, dok je kod pacijenata sa FN najučestalija bila pojava 4 HRO (Grafikon 15.) Posmatrajući varijabilnost svih podgrupa dece sa FN u odnosu na kontrolnu grupu, najmanja vrednost je bila kod dece sa SFN i epilepsijom, dok je najviša vrednost je bila u grupi dece sa JFN. Varijabilnost osoba sa JFN je bila manja u odnosu na kontrolnu grupu, a veća u odnosu na decu sa SFN (KN=55.34%, JFN=41.95%, SFN=38.39%, EPI=40.69%, BFN=41.10%) (Tabela 16, Tabela 18). Ovi rezultati upućuju na činjenicu o mogućem delovanju drugih faktora na pojavu različitog kliničkog oblika FN (SFN ili JFN), kao i eventualnog razvoja epilepsije nakon FN. Utvrđena povećana recesivna homozigotnost i smanjena varijabilnost verovatno dovodi do promene genetičko-fiziološke homeostaze ili pak do povećanja genetičkih opterećenja koji bi mogli da utiču na lakše ispoljavanje FN (152,156,157). Ovi rezultati govore u prilog mogućoj multifaktorijalnoj etiologiji ovog entiteta što je u saglasnosti sa studijama drugih autora koji su dokazali smanjenu varijabilnost u grupi obolelih ispitanika u poređenju sa kontrolnom grupom (151-156).

U našem radu, poređenjem srednjih vrednosti HRO između muškog i ženskog pola kako u kontrolnom uzorku (KNm=3.27±0.24, KNž=3.18±0.22, t=0.265, p>0.5). (Tabela 20), tako i u grupi ispitanika sa FN (FNm=4.17±0.202, FNž=4.45±0.206, t=0.969; p>0.5) (Tabela 22) nije uočena značajna razlika u stepenu genetičke homozigotnosti (151,154,155,156). Iako nema razlike u prosečnim vrednostima HRO kod polova u okviru svake grupe, postoji razlike u distribuciji pojedinih karakteristika.

Osam HRO su značajno odstupale (Karakteristike 3,4,5,11,12,13,16,19), od kojih su četiri HRO (Karakteristike 3,4,11,12) bile češće kod dečaka (Tabela 21). Kod pacijenta sa FN uočena je značajna razlika za 8 od 20 testiranih osobina, a treba istaći da je čak 6 od ovih 8 karakteristika značajno češće zastupljeno kod devojčica (Tabela 23). Ovi rezultati ukazuju na postojanje razlike u varijabilnosti testiranih HRO među polovima ($\Sigma X^2=79.142^{***}$) (Tabela 23) (150,153,154).

Srednje vrednosti HRO su pokazale razlike kako među dečacima sa FN i kontrolne grupe, tako i među devojčicama sa FN i u kontrolnoj grupi devojčica (Tabela 24, Tabela 25). Uočena razlika između datih grupa pokazuje da postoji jasna populaciono-genetička razlika unutar polova. Kao i u predhodim podgrupama dece sa FN primećena je smanjena varijabilnost i dečaka i devojčica sa FN u poređenju sa kontrolnom grupom. I ovo poređenje upućuje na uvećanu recesivnu homozigotnost i smanjenu varijabilnost u grupama pacijenata u poređenju sa kontrolom, što ukazuje na neki način na uvećani nivo genetičkih opterećenja i verovatni poremećaj u genetičko-fiziološkoj homeostazi što može uzrokovati olakšanu ekspresiju febrilnih napada (151,153,155,156,157).

Analizirajući distribuciju pojedinačnih HRO kod ispitanika muškog pola u kontrolnom uzorku i FN primetili smo postojanje razlike. Većina HRO (8/9) koje su značajno odstupale, su bile češće kod dečaka sa FN (Tabela 26), što se slaže sa gore navedenim rezultatima koje govore u prilog uvećane recesivne homozigotnosti osoba sa FN. I devojčice iz grupe FN su imale značajno veći broj HRO u odnosu na devojčice iz kontrolne grupe (Tabela 26), međutim ova razlika je bila nešto manja u poređenju sa dečacima sa FN i dečaka iz kontrolne grupe. Ovaj rezultat nam može ukazivati na to da eventualna pripadnost muškom polu može biti predisponirajući faktor za pojavu FN. Naši rezultati su u skladu sa istraživanjima drugih autora koji su pokazali razliku u distribuciji HRO među polovima u različitim bolestima (150,153,154,156,157).

Rezultati našeg istraživanja upućuju na to da značajno uvećana recesivna homozigotnost kao i umanjena varijabilnost za ispitivane osobine kod osoba sa FN verovatno dovode organizam u specifično stanje genetičko-fiziološke homeostaze koje bi moglo da predstavlja izvesnu predispoziciju za pojavu FN. Ovi nalazi se slažu sa istraživanjima drugih autora u kojima se ukazuje na to da izmena u stepenu genetičke

homozigotonosti i varijabilnosti predstavljaju izvesnu predispoziciju za lakšu ekspresiju pojedinih bolesti (143-157).

6. ZAKLJUČCI

Glavni cilj genetičkih istraživanja u neurologiji jeste identifikovanje polimorfničkih varijanti gena koje mogu doprineti pojavi neke neurološke bolesti, jer je kod većine etiologija nedovoljno poznata. Ispitivanje genskih polimorfizama asociranih sa ekscitabilnosti neurona može dati značajne informacije ne samo o etiologiji FN, nego i eventualnom razvoju epilepsije nakon FN, ali i kliničkom obliku FN. Na osnovu rezultata studije:

1. Od 150 dece sa FN, 65.3% imalo je jednostavan febrilni napad (JFN), a 34.7% kompleksan febrilni napad (SFN).

2. U našoj ispitivanoj grupi dece sa FN njih 17.3% je imalo epilepsiju.

Ispitivanjem polimorfizma *rs2297201 KCC2 gena* utvrđeno je:

3. da je učestalost homozigota CC 69.6%, heterozigota CT 28.6% i homozigota za ređi alel T, tj. TT genotip 1.8% u grupi dece sa FN. Učestalost alela C u ovoj grupi dece je 83.9%

4. da je u kontrolnoj grupi dece genotip CC bio najzastupljeniji, 86.9%, a genotip CT je imalo svega 14 dece (13.1%), dok genotip TT nije imalo ni jedno dete. Učestalost C alela je 93.5%.

5. genotipovi CT i TT i alel T polimorfizama *rs2297201 KCC2 gena* mogu biti predisponirajući faktor na nastanak FN. Ovi genotipovi su asocirani i sa pojavom SFN, dok nije uočena veza ovog polimorfizma i epilepsije.

Ispitivanjem polimorfizma *rs222747 TRPVI gena* utvrđeno je:

6. da je među decom sa FN genotip CC imalo najmanji broj ispitanika 9,0%, genotip CG 33.3%, a najveći broj dece, više od polovine, 57.7% genotip GG. Učestalost C alela u ovoj grupi je 25.7%.

7. da je u kontrolnoj grupi takođe najzastupljeniji genotip GG, 58.7%, zatim CG 37.6%, a najmanji broj dece, 3.7% je imalo genotip CC. Učestalost C alela je 22.5%

8. različiti genotipovi i aleli analiziranog polimorfizma *TRPVI gena* nisu značajno asocirani sa pojavom febrilnog napada niti epilepsije, a takođe nisu asocirani ni sa određenim tipom febrilnog napada.

Na osnovu utvrđenog prisustva 20 homozigotno-recesivnih osobina izvršena je procena stepena genetičke homozigotnosti i varijabilnosti u kontrolnom uzorku ispitanika i kod osoba sa FN, nakon čega je zaključeno sledeće:

9. postojanje značajno uvećanog stepena recesivne homozigotnosti i smanjene varijabilnosti za testirane genske lokuse ne samo u grupi pacijenata sa FN u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, već i u svim ispitivanim podgrupama obolelih (SFN, JFN, EPI, BFN).

10. sa rastom stepena težine ispoljenosti FN utvrđeno je kako povećanje u stepena recesivne homozigotnosti tako i smanjenje varijabilnosti u prisustvu testiranih karakteristika.

11. iako nema razlike u prosečnim vrednostima testiranih HRO kod polova u okviru svake grupe (kontrola, oboleli), postoji razlika u distribuciji pojedinih karakteristika tj. razlika u varijabilnosti u zastupljenosti pojedinačnih HRO.

12. rezultati testiranja obolelih i "zdravih" dečaka, kao i obolelih i "zdravih" devojčica pokazuju značajnu razliku u smislu uvećane recesivne homozigotnosti i smanjene varijabilnosti kod pacijenata u poređenju sa kontrolnim grupama ispitanika.

7. LITERATURA

1. Abdulhafeez M, Dalal E. Febrile Seizures and Febrile Seizure Syndromes: An Updated Overview of Old and Current Knowledge. *Neurol Res Int.* 2015; 2015: 849341.
2. Patterson JL, Carapetian SA, Hageman JR, Kelley KR. Febrile seizures. *Pediatr Ann.* 2013; 42(12):249-54.
3. Subcommittee on Febrile Seizures; American Academy of Pediatrics. Neurodiagnostic evaluation of the child with a simple febrile seizure. *Pediatrics.* 2011;127(2):389–394.
4. Canpolat M, Per H, Gumus H, Elmali F, Kumandas S. Investigating the prevalence of febrile convulsion in Kayseri, Turkey: an assessment of the risk factors for recurrence of febrile convulsion and for development of epilepsy. *Seizure.* 2018; 55:36–47.
5. Vestergaard M, Obel C, Henriksen T, Christensen J, Madsen K, Ostergaard J, Olsen J. The Danish National Hospital Register is a valuable study base for epidemiologic research in febrile seizures. *J Clin Epidemiol.* 2006;59(1):61-6.
6. Paul SP, Seymour M, Flower D, Rogers E. Febrile convulsions in children. *Nurs Child Young People.* 2015;27(5):14-5.
7. Mewasingh LD. Febrile seizures. *BMJ Clin Evid.* 2014;2014 pii: 0324.
8. Stanhope JM, Brody JA, Brink E, Morris CE. Convulsions among the Chamorro people of Guam, Mariana islands. II. Febrile convulsions. *Am J Epidemiol.* 1972;95(3):299-304.
9. Pavlovic MV, Jarebinski MS, Pekmezovic TD, Marjanovic BD, Levic ZM. Febrile convulsions in a Serbian region: a 10-year epidemiological study. *Eur J Neurol.* 1999;6:39-42.
10. Millichap JJ. Treatment and prognosis of febrile seizures. UpToDate.
11. Capovilla G, Mastrangelo M, Romeo A, Vigevano F. ILAE-Recommendations for the management of “febrile seizures” Ad hoc Task Force of LICE Guidelines Commission. *Epilepsia.* 2009;50(1):2-6.

12. Joint Working Group of the Research Unit of the Royal College of Physicians and the British Paediatric Association. Guidelines for the management of convulsions with fever. *BMJ*. 1991;303(6803):634–6.
13. Leung AK. *Common Problems in Ambulatory Pediatrics: Specific Clinical Problems*, 1st ed. New York: Nova Science Publishers; 2011:199–206.
14. Leung AKC, Hon KL, Leung TNH. Febrile seizures: an overview. *Drugs Context*. 2018;7:212536.
15. Sharawat IK, Singh J, Dawman L, Singh A. Evaluation of risk factors associated with first episode febrile seizure. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(5):SC10–13.
16. Holtzman D, Obana K, Olson J. Hyperthermia-induced seizures in the rat pup: a model for febrile convulsions in children. *Science*. 1981;213:1034–6.
17. Fukuda M, Morimoto T, Nagao H, Kida K. Clinical study of epilepsy with severe febrile seizures and seizures induced by hot water bath. *Brain Dev*. 1997;19:212–6.
18. Morimoto T, Nagao H, Sano N, Takahashi M, Matsuda H. Electroencephalographic study of rat hyperthermic seizures. *Epilepsia*. 1991; 32: 289–93.
19. Toth Z, Yan XX, Haftoglou S, Ribak CE, Baram TZ. Seizure-induced neuronal injury: vulnerability to febrile seizures in an immature rat model. *J Neurosci*. 1998; 18: 4285–94.
20. Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson KL, Soltesz I, Baram TZ. Prolonged febrile seizures in immature rat model enhance hippocampal excitability long-term. *Ann Neurol*. 2000; 47: 336–44.
21. Tsai ML, Leung LS. Decrease of hippocampal GABA B receptor-mediated inhibition after hyperthermia-induced seizures in immature rats. *Epilepsia*. 2006;47(2):277-87.
22. Swijssen A, Avila A, Brône B, Janssen D, Hoogland G, Rigo JM. Experimental early-life febrile seizures induce changes in GABA(A) R-mediated neurotransmission in the dentate gyrus. *Epilepsia*. 2012;53(11):1968-77.
23. Wu J, Fisher RS. Hyperthermic spreading depressions in the immature rat hippocampal slice. *J Neurophysiol*. 2000;84(3):1355-60.

24. Baram TZ, Eghbal-Ahmadi M, Bender RA. Is neuronal death required for seizure-induced epileptogenesis in the immature brain? *Prog Brain Res.* 2002;135:365-75.
25. Moser E, Mathiesen I, Andersen P. Association between brain temperature and dentate field potentials in exploring and swimming rats. *Science.* 1993;259:1324–6.
26. Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, Tominaga M. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci.* 2007;27:1566–75.
27. Hunt RF, Hortopan GA, Gillespie A, Baraban SC. A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp Neurol.* 2012;237(1):199-206.
28. Hartmann AM and Nothwang HG. Opposite temperature effect on transport activity of KCC2/KCC4 and N(K)CCs in HEK-293 cells. *BMC Res Notes.* 2011;4:526.
29. Reid AY, Riazi K, Campbell Teskey G, Pittman QJ. Increased excitability and molecular changes in adult rats after a febrile seizure. *Epilepsia.* 2013;54(4):e45-8.
30. Yang A, Arndt DH, Berg RA, Carpenter JL, Chapman KE, Dlugos DJ et al. Development and validation of a seizure prediction model in critically ill children. *Seizure.* 2015;25:104-11.
31. Balestrino M, Somjen GG. Concentration of carbon dioxide, interstitial pH and synaptic transmission in hippocampal formation of the rat. *J Physiol.* 1988;396:247-66.
32. Aram JA, Lodge D. Epileptiform activity induced by alkalosis in rat neocortical slices: block by antagonists of N-methyl-D-aspartate. *Neurosci Lett.* 1987;83(3):345-50.
33. Velisek L, Veliskova J. Anticonvulsant action of carbonic anhydrase inhibition. *Sb Lek.* 1994;95(3):161-71.
34. Davies P, Maconochie I. The relationship between body temperature, heart rate and respiratory rate in children. *Emerg Med J.* 2009;26(9):641-3.

35. Nijman RG, Thompson M, van Veen M, Perera R, Moll HA, Oostenbrink R. Derivation and validation of age and temperature specific reference values and centile charts to predict lower respiratory tract infection in children with fever: prospective observational study. *BMJ*. 2012;345:e4224.
36. Schuchmann S, Tolner EA, Marshall P, Vanhatalo S, Kaila K. Pronounced increase in breathing rate in the "hair dryer model" of experimental febrile seizures. *Epilepsia*. 2008;49(5):926-8.
37. White MD. Components and mechanisms of thermal hyperpnea. *J Appl Physiol*. 2006;101(2):655-63.
38. Morimoto T, Fukuda M, Aibara Y, Nagao H, Kida K. The influence of blood gas changes on hyperthermia-induced seizures in developing rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 1996;92(1):77-80.
39. Schuchmann S, Hauck S, Henning S, Grüters-Kieslich A, Vanhatalo S, Schmitz D, Kaila K. Respiratory alkalosis in children with febrile seizures. *Epilepsia*. 2011;52(11):1949-55.
40. Schuchmann S, Tolner EA, Marshall P, Vanhatalo S, Kaila K. Pronounced increase in breathing rate in the "hair dryer model" of experimental febrile seizures. *Epilepsia*. 2008;49(5):926-8.
41. Ha J, Choi J, Kwon A, Kim K, Kim SJ, Bae SH, et al. Interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha levels in children with febrile seizures. *Seizure*. 2018;58:156-162.
42. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*. 2011;7:31–40.
43. Mujović V. *Medicinska Fiziologija*. 2.izd. Beograd: Fondacija Solidarnost Srbije; 2012. 1107p.
44. Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T. Cytokines and fever. *Front Biosci*. 2004;9:1433-49.
45. Chou IC, Lin WD, Wang CH, Tsai CH, Li TC, Tsai FJ. Interleukin (IL)-1 β , IL-1 receptor antagonist, IL-6, IL-8, IL-10, and tumor necrosis factor α gene polymorphisms in patients with febrile seizures. *J Clin Lab Anal*. 2010;24:154–9.

46. Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 2005;46:1724–43.
47. Kwon A, Kwak BO, Kim K, Ha J, Kim SJ, Bae SH et al. Cytokine levels in febrile seizure patients: A systematic review and meta-analysis. *Seizure*. 2018;59:5-10.
48. Veisani Y, Delpisheh A, Sayehmiri K. Familial history and recurrence of febrile seizures; a systematic review and meta-analysis. *Iran J Pediatr*. 2013;23(4):389-95.
49. Eckhaus J, Lawrence KM, Helbig I, et al. Genetics of febrile seizure subtypes and syndromes: a twin study. *Epilepsy Res*. 2013;105(1-2):103-9.
50. Saghazadeh A, Mastrangelo M, Rezaei N. Genetic background of febrile seizures. *Rev Neurosci*. 2014;25(1):129-61.
51. Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, Rosenberg-Bourgin M, Prudhomme JF, Baulac M et al. A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21–q33. *Am. J. Hum. Genet*. 1999;65:1078–1085.
52. Ram D, Newton R. The Genetics of Febrile Seizures. *Pediatr Neurol Briefs*. 2015;29(12):90.
53. Kuveljić J, Đurić T, Jovanović I, Živković M, Stanković A. Osnove primene analize DNK u medicini. *Srce i krvni sudovi*. 2013;32(2):104-9.
54. Balan S, Vellichirammal NN, Banerjee M, Radhakrishnan K. Failure to find association between febrile seizures and SCN1A rs3812718 polymorphism in south Indian patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res*. 2012;101(3):288–92.
55. Haerian BS, Baum L, Kwan P, Cherny SS, Shin JG, Kim SE et al. Contribution of GABRG2 Polymorphisms to Risk of Epilepsy and Febrile Seizure: a Multicenter Cohort Study and Meta-analysis. *Mol Neurobiol*. 2016;53(8):5457-67.
56. Saitoh M, Ishii A, Ihara Y, Hoshino A, Terashima H, Kubota M et al. Missense mutations in sodium channel SCN1A and SCN2A predispose children to encephalopathy with severe febrile seizures. *Epilepsy Res*. 2015;117:1–6.

57. Payne JA, Stevenson TJ, Donaldson LF. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem.* 1996;271: 16245–52.
58. Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C. Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci.* 2002;16:2358–70.
59. Gagnon KB, Di FM. A molecular analysis of the Na⁺-independent cation chloride cotransporters. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32:14–31.
60. Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron.* 2009;61(6):820–38.
61. Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature.* 1999;397(6716):251–5.
62. Hekmat-Scafe DS, Lundy MY, Ranga R, Tanouye MA. Mutations in the K⁺/Cl⁻ cotransporter gene *kazachoc* (*kcc*) increase seizure susceptibility in *Drosophila*. *J Neurosci.* 2006;26(35):8943-54.
63. Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron.* 2001;30(2):515-24.
64. Khalilov I, Chazal G, Chudotvorova I, Pellegrino C, Corby S, Ferrand N et al. Enhanced Synaptic Activity and Epileptiform Events in the Embryonic KCC2 Deficient Hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 2011;5:23.
65. Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson CA, Zhang J, et al. Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell.* 2009;138(3):525-36.
66. Tanis JE, Bellemer A, Moresco JJ, Forbush B, Koelle MR. The potassium chloride cotransporter KCC-2 coordinates development of inhibitory neurotransmission and synapse structure in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci.* 2009;29(32):9943-54.
67. Zhu L, Lovinger D, Delpire E. Cortical neurons lacking KCC2 expression show impaired regulation of intracellular chloride. *J Neurophysiol.* 2005;93(3):1557-68.

68. Zhu L, Polley N, Mathews GC, Delpire E. NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy Res.* 2008;79(2-3):201-12.
69. Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol.* 2009;5(7):380–91.
70. Sanchez RM, Jensen FE. Maturation aspects of epilepsy mechanisms and consequences for the immature brain. *Epilepsia.* 2001; 42(5):577-85.
71. Chamma I, Chevy Q, Poncer JC, Lévi S. Role of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front Cell Neurosci.* 2012;6:5.
72. Doyon N, Prescott SA, De Koninck Y. Mild KCC2 Hypofunction Causes Inconspicuous Chloride Dysregulation that Degrades Neural Coding. *Front Cell Neurosci.* 2016;9:516.
73. Wright R, Newey SE, Ilie A, Wefelmeyer W, Raimondo JV, Ginham R, et al. Neuronal Chloride Regulation via KCC2 Is Modulated through a GABA_B Receptor Protein Complex. *J Neurosci.* 2017;37(22):5447-62.
74. Sulis Sato S, Artoni P, Landi S, Cozzolino O, Parra R, Pracucci E, et al. Simultaneous two-photon imaging of intracellular chloride concentration and pH in mouse pyramidal neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(41):E8770-79.
75. Wang WZ, Hoerder-Suabedissen A, Oeschger FM, Bayatti N, Ip BK, Lindsay S et al. Subplate in the developing cortex of mouse and human. *J Anat.* 2010;217(4):368-80.
76. Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol.* 2004;557(Pt 3):829-41.
77. Ben-Ari Y. NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders. *Trends Neurosci.* 2017;40(9):536-54.
78. Woo NS, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, Mount DB, et al. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus.* 2002;12(2):258-68.

79. Puskarjov M, Seja P, Heron SE, Williams TC, Ahmad F, Iona X et al. A variant of KCC2 from patients with febrile seizures impairs neuronal Cl⁻ extrusion and dendritic spine formation. *EMBO Rep.* 2014;15(6):723-9.
80. Kahle KT, Merner ND, Friedel P, Silayeva L, Liang B, Khanna A et al. Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalized epilepsy. *EMBO Rep.* 2014;15:766-74.
81. Stodberg T, McTague A, Ruiz AJ, Hirata H, Zhen J, Long P et al. Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nature Commun.* 2015;6:8038.
82. Puskarjov M, Ahmad F, Kaila K, Blaesse P. Activity-dependent cleavage of the K-Cl cotransporter KCC2 mediated by calcium-activated protease calpain. *J Neurosci.* 2012;32(33):11356-64.
83. Feng ZY, Zheng XJ, Tian C, Wang Y, Xing HY. Changes of paired-pulse evoked responses during the development of epileptic activity in the hippocampus. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2011;12(9):704-11.
84. Tyzio R, Nardou R, Ferrari DC, Tsintsadze T, Shahrokhi A, Eftekhari S, et al. Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science.* 2014;343(6171):675-9.
85. Deidda G, Parrini M, Naskar S, Bozarth IF, Contestabile A, Cancedda L. Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. *Nat Med.* 2015;21(4):318-26.
86. Kahle KT, Khanna AR, Alper SL, Adragna NC, Lauf PK, Sun D et al. K-Cl cotransporters, cell volume homeostasis, and neurological disease. *Trends Mol Med.* 2015;21(8):513-23.
87. Silayeva L, Deeb TZ, Hines RM, Kelley MR, Munoz MB, Lee HH et al. KCC2 activity is critical in limiting the onset and severity of status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(11):3523-8.
88. Chen SR, Zhu L, Chen H, Wen L, Laumet G, Pan HL. Increased spinal cord Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter-1 (NKCC1) activity contributes to impairment of synaptic inhibition in paclitaxel-induced neuropathic pain. *J Biol Chem.* 2014;289(45):31111-20.

89. Lewis JP , Palmer ND, Ellington JB, Divers J, Ng MC, Lu L, Langefeld CD, Freedma BI, Bowden DW. Analysis of candidate genes on chromosome 20q12.1 reveals evidence for BMI mediated association of PREX1 with type 2 diabetes in European Americans. *Genomics*. 2010;96(4):2119.
90. Online Mendelian inheritance in man (OMIM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
91. Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: From the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev*, 2014;66(3): 676–814.
92. Tamara Luti Rosenbaum Emir. *Neurobiology of TRP Channels*, 1st ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis; 2017. 347p.
93. Takahashi N, Mori Y. TRP Channels as Sensors and Signal Integrators of Redox Status Changes. *Front Pharmacol*. 2011;2:58.
94. Manna SS, Umathe SN. Involvement of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the pro-convulsant effect of anandamide in pentylenetetrazole-induced seizures. *Epilepsy Res*. 2012;100(1–2):113–24.
95. Ovey IS, Naziroglu M. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in hippocampus of aged mice: Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. *Neurosci*. 2014;284:225-33.
96. Szallasi A, Blumberg PM, Annicelli LL, Krause JE, Cortright DN. The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pharmacol*. 1999;56(3):581-7.
97. Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch*. 2005;451(1):143-50.
98. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 1998;21(3):531–43.
99. Fawley JA, Hofmann ME, Andresen MC. Cannabinoid 1 and transient receptor potential vanilloid 1 receptors discretely modulate evoked glutamate separately from spontaneous glutamate transmission. *J Neurosci*. 2014;34(24):8324-32.

100. Lee JG, Yon JM, Lin C, Jung AY, Jung KY, Nam SY. Combined treatment with capsaicin and resveratrol enhances neuroprotection against glutamate-induced toxicity in mouse cerebral cortical neurons. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(11):3877-85.
101. Shoudai K, Peters JH, McDougall SJ, Fawley JA, Andresen MC. Thermally active TRPV1 tonically drives central spontaneous glutamate release. *J Neurosci.* 2010;30(43):14470-75.
102. Iannotti FA, Hill CL, Leo A, Alhusaini A, Soubrane C, Mazarrella E et al. Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: Potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5(11):1131-41.
103. Huang WX, Yu F, Sanchez RM, Liu YQ, Min JW, Hu JJ et al. TRPV1 promotes repetitive febrile seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain. *Brain Behav Immun.* 2015;48:68-77.
104. Kong WL, Min JW, Liu YL, Li JX, He XH, Peng BW. Role of TRPV1 in susceptibility to PTZ-induced seizure following repeated hyperthermia challenges in neonatal mice, *Epilepsy and Behav.* 2014;31:276-80.
105. Barrett KT, Roy A, Rivard KB, Wilson RJA, Scantlebury MH. Vagal TRPV1 activation exacerbates thermal hyperpnea and increases susceptibility to experimental febrile seizures in immature rats. *Neurobiol Dis.* 2018;119:172-89.
106. Khatibi NH, Jadhav V, Charles S, Chiu J, Buchholz J, Tang J et al. Capsaicin pre-treatment provides neurovascular protection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2011;111:225-30.
107. Fan-xin M, Li-mei S, Bei S, Xin Q, Yu Y, Yu C. Heat shock factor 1 regulates the expression of the TRPV1 gene in the rat preoptic-anterior hypothalamus area during lipopolysaccharide-induced fever. *Exp Physiol.* 2012;97(6):730-40.
108. Sato D, Sato T, Urata Y, Okajima T, Kawamura S, Kurita M, et al. Distribution of TRPVs, P2X3, and parvalbumin in the human nodose ganglion. *Cell Mol Neurobiol.* 2014;34(6):851-8.

109. Sun FJ, Guo W, Zheng DH, Zhang CQ, Li S, Liu SY et al. Increased expression of TRPV1 in the cortex and hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci*. 2013;49(1):182-93.
110. Xu H, Tian W, Fu Y, Oyama TT, Anderson S, Cohen DM. Functional effects of nonsynonymous polymorphisms in the human TRPV1 gene. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(6):F1865-76.
111. Mori F, Ribolsi M, Kusayanagi H, Monteleone F, Mantovani V, Buttari F et al. TRPV1 channels regulate cortical excitability in humans. *J Neurosci*. 2012;32(3):873–9.
112. Buttari F, Zagaglia S, Marciano L, Albanese M, Landi D, Nicoletti CG et al. TRPV1 polymorphisms and risk of interferon β -induced flu-like syndrome in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2017;305:172-174.
113. Kalfon L, Azran A, Farajun Y, Golan-Hamu O, Toben A, Abramov L et al. Localized Provoked Vulvodynia: Association With Nerve Growth Factor and Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Genes Polymorphisms. *J Low Genit Tract Dis*. 2019;23(1):58-64.
114. Notay K, Klingel SL, Lee JB, Doherty CJ, Seed JD, Swiatczak M et al. TRPV1 and BDKRB2 receptor polymorphisms can influence the exercise pressor reflex. *J Physiol*. 2018;596(21):5135-48.
115. Gontko-Romanowska K, Zaba Z, Panieński P, Steinborn B, Szemień M, Łukasik-Głębocka M et al. The assessment of risk factors for febrile seizures in children. *Neurol Neurochir Pol*. 2017;51(6):454–458.
116. Millichap JG, Millichap JJ. Role of viral infections in the etiology of febrile seizures. *Pediatr Neurol*. 2006;35(3):165–172.
117. Gupta S, Aggarwal A, Faridi MM, Rai G, Das S, Kotru M. Serum IL-6 levels in children with febrile seizures. *Indian Pediatr*. 2018;2018 pii: S097475591600109.
118. Kim K, Kwak BO, Kwon A, Ha J, Kim SJ, Bae SW et al. Analysis of plasma multiplex cytokines and increased level of IL-10 and IL-1Ra cytokines in febrile seizures. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):200.

119. Westin E, Sund Levander M. Parent's Experiences of Their Children Suffering Febrile Seizures. *J Pediatr Nurs.* 2018;38:68-73.
120. Kanemura H, Sano F, Mizorogi S, Tando T, Sugita K, Aihara M. Parental thoughts and actions regarding their child's first febrile seizure. *Pediatr Int.* 2013;55(3):315–19.
121. Sajadi M, Khosravi S. Mothers' experiences about febrile convulsions in their children: a qualitative study. *Int J Community Based Nurs Midwifery.* 2017;5(3):284-91.
122. Fetveit A. Assessment of febrile seizures in children. *Eur J Pediatr.* 2008;167(1):17–27.
123. Tsai JD, Mou CH, Chang HY, Li TC, Tsai HJ, Wei CC. Trend of subsequent epilepsy in children with recurrent febrile seizures: A retrospective matched cohort study. *Seizure.* 2018;61:164-69.
124. Kerstenetzky L, Gidal B. Pediatric seizures and vaccines. *J Am Pharm Assoc (2003).* 2015;55(4):457–58.
125. Ram D, Newton R. The genetics of febrile seizures. *Pediatr Neurol Briefs.* 2015;29(12):90.
126. Kimia AA, Bachur RG, Torres A, Harper MB. Febrile seizures: emergency medicine perspective. *Curr Opin Pediatr.* 2015;27(3):292–97.
127. Lee SH, Byeon JH, Kim GH, Eun BL, Eun SH. Epilepsy in children with a history of febrile seizures. *Korean J Pediatr.* 2016;59(2):74–9.
128. Pavlidou E, Panteliadis C. Prognostic factors for subsequent epilepsy in children with febrile seizures. *Epilepsia.* 2013;54(12):2101–7.
129. Dubé CM, Brewster AL, Baram TZ. Febrile seizures: Mechanisms and relationship to epilepsy *Brain Dev.* 2009;31(5):366–71.
130. Seinfeld SA, Pellock JM, Kjeldsen MJ, Nakken KO, Corey LA. Epilepsy after Febrile Seizures: Twins Suggest Genetic Influence. *Ped Neurol.* 2016;55:14–6.
131. Scott RC. Consequences of febrile seizures in childhood. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26(6):662–7.
132. Beker-Acay M, Köken R, Ünlü E, Kaçar E, Balçık Ç. Evaluation of hippocampal infolding angle and incomplete hippocampal inversion in pediatric

- patients with epilepsy and febrile seizures. *Diagn Interv Radiol*. 2017;23(4):326–30.
133. Yu YH, Lee K, Sin DS, Park KH, Park DK, Kim DS. Altered functional efficacy of hippocampal interneuron during epileptogenesis following febrile seizures. *Brain Res Bull*. 2017;131:25–38.
 134. Pujar SS, Seunarine KK, Martinos MM, Neville BGR, Scott RC, Chin RFM et al. Long-term white matter tract reorganization following prolonged febrile seizures. *Epilepsia*. 2017;58(5):772–80.
 135. Leaffer EB, Hinton VJ, Hesdorffer DC. Longitudinal assessment of skill development in children with first febrile seizure. *Epilepsy Behav*. 2013;28(1):83–87
 136. Steering Committee on Quality Improvement and Management, Subcommittee on Febrile Seizures American Academy of Pediatrics. Febrile seizures: clinical practice guideline for the long-term management of the child with simple febrile seizures. *Pediatrics*. 2008;121(6):1281–86.
 137. Offringa M, Newton R, Cozijnsen MA, Nevitt SJ. Prophylactic drug management for febrile seizures in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;2:CD003031.
 138. Salehiomran M, Hoseini SM, Ghabeli Juibary A. Intermittent diazepam versus continuous phenobarbital to prevent recurrence of febrile seizures: a randomized controlled trial. *Iran J Child Neurol*. 2016;10(1):21–4.
 139. Pavlidou E, Tzitiridou M, Panteliadis C. Effectiveness of intermittent diazepam prophylaxis in febrile seizures: long-term prospective controlled study. *J Child Neurol*. 2006;21(12):1036–40.
 140. Bunjevački V, Cvjetičanin S, Bajčetić M. *Humana Genetika. Praktikum. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu. CIBID*. 2009.
 141. *Medical Genetics Summaries*. Pratt V, McLeod H, Rubinstein W, et al., editors. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
 142. Amberger JS, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. *Nucleic Acids Res*. 2019;8;47(D1):D1038-43.

143. Marinković D, Cvjetićanin S. Anthropogenetic homozygosity and adaptive variability HRC-test in studies of human populations, Serbian Academy of Sciences and Arts-Department of Chemical and Biological Sciences, Serbia, 1st edition, 2013.
144. Marinkovic D, Ilic M, Spremo B. Studies of Human Population – Genetic Variation. Comparasion of Homozygously Recessive Traits in Attendants of Special and Regular Schools in Serbia. Arh. Biol. Nauka. 1990;42:11–2.
145. Marinkovic D, Jovanovic D, Cvjeticanin S et al. Genetic Homozygosity and Normal vs. Pathological Human Variation. Genetika. 1994;36(3):147–56.
146. Marinkovic D, Cvjeticanin S. Studies of Human Population-Genetic Variation. The Freqeuncies of ABO Blood Types and Homozygously Recessive Traits among Top Sportsmen and Young Intellectuals. Arh. Biol. Nauka, 1991;43:5–6.
147. Marinković D, Population-genetic approach to the study of human inhabitants. Genetika, 1989;21:179–88.
148. Savic M, Cvjeticanin S, Lazovic M, Nikcevic L, Nikolic D. Morphogenetic Variability and Hypertension in Ischemic Stroke Patients- Preliminary Study. J Clin Med. 2018;7(7). pii: E162.
149. Marinkovic D, Cvjeticanin S. Population-genetic study of Balkan endemic nephropathy in Serbia, Russ J Genet. 2007;43(8):942-46.
150. Karan R, Obrenovic-Kircanski B, Cvjeticanin S, Kovacevic-Kostic N, Velinovic M, Milicevic V et al. The Gender Impact on Morphogenetic Variability in Coronary Artery Disease: A Preliminary Study. J Clin Med. 2018;7(5). pii: E103.
151. Karan R, Cvjeticanin S, Kovacevic-Kostic N, Nikolic D, Velinovic M, Milicevic V, Obrenovic-Kircanski B. Genetic and Environmental Dispositions for Cardiovascular Variability: A Pilot Study. J Clin Med. 2018;7(9). pii: E232.
152. Nikolić D. Korelacija kliničkih i elektromiografskih nalaza sa stepenom genetičke homozigotnosti kod dece sa manifestnim spinalnim disrafizmom. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Unuverzitet u Beogradu. 2010.
153. Nikolic D, Petronic I, Cvjeticanin S, Brdar R, Cirovic D, Bizic M et al. Gender and morphogenetic variability of patients with Spina bifida Occulta and

- Spina bifida Aperta: Prospective population-genetic study. *Hippokratia*. 2012;16(1):35–9.
154. Nikolic D, Cvjeticanin S, Petronic I, Brdar R, Cirovic D, Bizic M et al. Individual phenotype trait variability as genetic markers of gender susceptibility to spina bifida. *Balkan J Med Genet*. 2011;14(1):11-8.
155. Nikolic D, Cvjeticanin S, Petronic I, Jekic B, Brdar R, Damnjanovic T et al. Degree of genetic homozygosity and distribution of ABO blood types among patients with spina bifida occulta and spina bifida aperta. *Arch Med Sci*. 2010;6(6):854-9.
156. Cvjetićanin S, Marinković D. Genetic variability in the group of patients with congenital hip dislocation. *Genetika*. 2005;43(8):1134-38.
157. Milašinovic S, Cvjeticanin S, Brdar R.; Nikolic D. Morphogenetic variability and genetic loads among patients with different expression of developmental hip dysplasia. *Genetika* 2017; 49: 1035-45.
158. Cvjeticanin S, Marinkovic D. Morphogenetic variability during selection of elite water polo players. *J Sports Sci*. 2009;27(9):941-7.
159. Cvjeticanin S. Anthropogenetic variability in the groups of homo- and heterosexually oriented individuals. *Genetika*; 47(2):765-76.
160. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
161. Binder A, May D, Baron R, Maier C, Tölle TR, Treede RD et al. Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients. *PLoS One*. 2011;6(3):e17387.
162. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, Kremer. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *J.Arthritis Rheum*. 2004;50(9):2766-74.
163. Marić S, Jović J. Molekularna sistematika - praktikum. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 2012.

164. S. Ishiara, *Ishiaras Test for Colour Blindness*, vol. 38 plates, Kanehara Shuppan and Co., Tokyo, Japan, 1994.
165. Murray CJL, Lopez AD, eds. *Global comparative assessment in the health sector; disease burden, expenditures, and intervention packages*. Geneva: World Health Organisation, 1994
166. <http://www.chgv.org/GenicIntolerance>
167. Kocsis I, Györffy B, Németh E, Vásárhelyi B. Examination of Hardy-Weinberg equilibrium in papers of *Kidney International*: an underused tool. *Kidney Int.* 2004;65(5):1956-8.
168. Sadeh M, Glazer B, Landau Z, Wainstein J, Bezaleli T, Dabby R et al. Association of the M3151 variant in the transient receptor potential vanilloid receptor-1 (TRPV1) gene with type 1 diabetes in an Ashkenazi Jewish population. *Isr Med Assoc J.* 2013;15(9):477-80
169. Triantafyllou K, Kourikou A, Gazouli M, Karamanolis GP, Dimitriadis GD. Functional dyspepsia susceptibility is related to CD14, GNB3, MIF, and TRPV1 gene polymorphisms in the Greek population. *Neurogastroenterol Motil.* 2017;29(1).
170. Campbell H, Carothers AD, Rudan I, Hayward C, Biloglav Z, Barac L et al. Effects of genome-wide heterozygosity on a range of biomedically relevant human quantitative traits. *Hum Mol Genet.* 2007;16(2):233-41.
171. Shriner D. Overview of Admixture Mapping. *Curr Protoc Hum Genet.* 2017;94:1.23.1-8.
172. Japatti SR, Engineer PJ, Reddy BM, Tiwari AU, Siddegowda CY, Hammannavar RB. Anthropometric Assessment of the Normal Adult Human Ear. *Ann Maxillofac Surg.* 2018;8(1):42-50.
173. Verma P, Sandhu HK, Verma KG, Goyal S, Sudan M, Ladgotra A. Morphological Variations and Biometrics of Ear: An Aid to Personal Identification. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(5): ZC138-42.
174. Reiss M, Reiss G. Current aspects of handedness. *Wien Klin Wochenschr.* 1999;111(24):1009-18.
175. Ziering C, Krenitsky G. The Ziering whorl classification of scalp hair. *Dermatol Surg.* 2003;29(8):817-21.

176. Perelle IB, Ehrman L, Chanza M. Human handedness and scalp hair whorl direction: no evidence for a common cause. *Laterality*. 2009;14(1):95-101.

SKRAĆENICE:

AAP - Američka akademija za pedijatriju

AMPA - α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionat

ATP - Adenozin-trifosfat

BFN - Deca sa febrilnim napadima bez epilepsije

CNS - Centralni nervni sistem

DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA - Etilendiamintetraacetatna kiselina

EEG - Elektroencefalogram

EPI- Epilepsija

FN - Febrilni napad

GABA - γ - amino buterna kiselina

GWAS- Genome-wide associations study

HEK ćelije - Ćelije humanog embriona bubrega

HRO - Homozigotno recesivne osobine

I/D - Inserciono delecioni

IL - Interleukin

ILAE - Internacionalna liga za borbu protiv epilepsije

JFN - Jednostavni febrilni napadi

KCC2 (SLC12A5) - Kalijum-hlor transporter

KN - Kontrolna grupa

MMP - Mirovni membranski potencijal

mRNK - mitohondrijalna ribonukleinska kiselina

MTS - mezijalna temporalna skleroza

NMDA - *N*-metil-D-aspartat;

OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*

PNS - Periferni nervni sistem

SDS - Natrijum-dodecisuľfat

SFN - Složeni febrilni napadi

SNP - Polimorfizmi pojedinićnih nukleotida

TLE - Epilepsija temporalnog reźnja

TM - Transmembranski domen

TNF - Tumor nekroza faktor

TRP - Kanali tranzitornog receptorskog potencijala

TRPV - Kanali tranzitornog receptorskog potencijala, podfamilija V

VNTRs - Polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka

BIOGRAFIJA AUTORA

Dimitrijević S. Sanja rođena je 3. oktobra 1987. godine u Prijepolju. Prvu beogradsku gimnaziju završila je 2006. godine. Iste godine upisuje Medicinski fakultet u Beogradu. Diplomirala je u junu 2012. godine, među prvim studentima u generaciji sa srednjom ocenom 9,0.

U bolnici za cerebralnu paralizu i razvojnu neurologiju u Beogradu zaposlila se kao klinički lekar 2014. godine. Poslediplomske doktorske akademske studije iz oblasti Molekularne medicine upisala je odmah po završetku osnovnih studija 2012. godine. Specijalizaciju iz oblasti fizikalne medicine i rehabilitacije započinje 2014. godine.

Još kao student počinje da se bavi naučno istraživačkim radom. Izlagala je radove na Kongresu studenata biomedisinskih nauka Srbije sa internacionalnim učešćem više puta. Usavršavala se na različitim seminarima u zemlji i inostranstvu. Autor i koautor u 8 stručnih radova i publikacija, od kojih je 2 objavljeno u časopisima indeksiranim u SCI bazi podataka. Član je Lekarske komore Srbije, Srpskog lekarskog društva i Udruženja fizijatara Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Sanja Dimitrijević

broj upisa MM-09/12

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Utvrđivanje stepena genetičke homozigotnosti i varijabilnosti i učestalost polimorfizama TRPV1 i KCC2 gena kod osoba sa febrilnim napadima

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.2.2019.

Sanja Dimitrijević

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sanja Dimitrijević

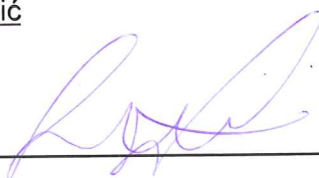
Broj upisa MM-09/12

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada Utvrđivanje stepena genetičke homozigotnosti i varijabilnosti i učestalost polimorfizama TRPV1 i KCC2 gena kod osoba sa febrilnim napadima

Mentor prof. dr Dimitrije Nikolić

Potpisani _____



izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

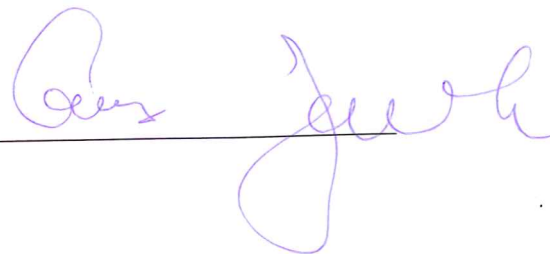
Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

20.02.2019



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Utvrđivanje stepena genetičke homozigotnosti i varijabilnosti i učestalost polimorfizama TRPV1 i KCC2 gena kod osoba sa febrilnim napadima

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.02.2019.

