

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

ЗОРНИЦА НИКОЛОВА ПАВЛОВА

**Популационно-генетични и молекулярно-биологични проучвания при
пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза в България**

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

**Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и
информатика**

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: Молекулярна биология

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн

Проф. Албена Първанова Годорова – Георгиева, дбн

София, 2023

Дисертационният труд съдържа 101 страници, 33 фигури и 26 таблици.

Цитирани са 120 литературни и електронни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:

- Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София
- Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника“, гр. София

Настоящото изследване е финансирано частично от Съвета по медицинска наука на Медицински университет – София по договор Д-74/24.06.2020г.

Други източници на финансиране:

- *Investigator-Initiated Project Research Grant, № WI220557, Pfizer Luxemburg Sarl, Bulgaria Branch, 15.11.2016 “Genetic profile of TTR-FAP: Glu89Gln founder effect, parent-of-origin difference in penetrance and genetic screening programs”.*
- *Investigator-Initiated Project Research Grant, № WI241542/2018, Pfizer Luxemburg Sarl, Bulgaria Branch, “A completion of ATTR genetic profiling in Bulgaria and investigation of possible non-coding genetic variations with effect on the heterogeneity of disease manifestation in the context of a concrete TTR mutation”.*

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
РЕЗЮМЕ	6
ВЪВЕДЕНИЕ	8
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	9
1.1. Същност на наследствената транстиретинова амилоидоза	9
1.1.1. Клинична изява на наследствената транстиретинова амилоидоза	12
1.1.2. Диагностика на наследствената транстиретинова амилоидоза	14
1.1.3. Подходи за лечение на наследствена транстиретинова амилоидоза.....	18
1.2. Механизми на патогенеза при наследствената транстиретинова амилоидоза	19
1.2.1. Амилоидогенеза.....	19
1.2.2. Генетични модификатори на наследствената транстиретинова амилоидоза.....	23
1.2.3. Значение на генната експресия при наследствената транстиретинова амилоидоза .	24
1.3. Епидемиология на наследствената транстиретинова амилоидоза	26
1.3.1. Световна епидемиология на наследствената транстиретинова амилоидоза	26
1.3.2. Епидемиология, генетична и фенотипна вариабилност на наследствената транстиретинова амилоидоза в България	31
1.4. Обобщение.....	34
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....	35
2.1. Цели.....	35
2.2. Задачи.....	35
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	36
3.1. Клиничен и биологичен материал.....	36
3.2. Скрининг за търсене на патологични варианти в <i>TTR</i> гена	37
3.2.1. Скрининг при пациенти	37
3.2.1.1. Изолране на високомолекулна ДНК от периферна кръв по солеви метод	37
3.2.1.2. Секвениране по Sanger.....	38
3.2.2. Неонатален скрининг за определяне честотата на носителство на <i>TTR</i> варианта Gly47Glu сред Роми.....	40
3.3. Анализ на регулаторни генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на заболяването	41
3.3.1. ДНК проби.....	41
3.3.2. Генотипизиране на единични нуклеотидни полиморфизми	41

3.3.3.	Статистически анализ за корелация.....	42
3.4.	Експресионен анализ на <i>TTR</i> гена.....	42
3.4.1.	Пациенти и проби.....	42
3.4.2.	РНК секвениране на <i>TTR</i> гена.....	43
3.4.2.1.	Изолиране на РНК.....	43
3.4.2.2.	Обратна транскрипция.....	44
3.4.2.3.	Намножаване и секвениране на транстиретиновия транскрипт.....	44
3.4.3.	Количествено определяне на алел-специфичната експресия на транстиретина.....	46
3.4.3.1.	Дизайн на експеримента.....	46
3.4.3.2.	Фрагментен анализ.....	46
3.5.	Хаплотипен анализ за определяне ефект на родоначалника.....	47
3.5.1.	ДНК проби за извършване на хаплотипен анализ.....	48
3.5.2.	Микросателитен фрагментен анализ.....	49
3.5.3.	Реконструкция на хаплотипа.....	51
3.5.4.	Статистическа оценка.....	53
3.5.5.	Определяне „възраст на мутацията“ – възрастта на най-скорошния общ предшественик.....	53
4.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	56
4.1.	Скринингови изследвания за търсене на патологични <i>TTR</i> варианти.....	56
4.1.1.	Скрининг при пациенти.....	56
4.1.2.	Скрининг при новородени за определяне честотата на носителство на <i>TTR</i> варианта Gly47Glu.....	62
4.2.	Анализ на регулаторни генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на заболяването.....	63
4.3.	Анализ на генната експресия на транстиретина.....	70
4.4.	Хаплотипен анализ за определяне ефект на родоначалника.....	77
4.4.1.	Микросателитен фрагментен анализ.....	77
4.4.2.	Реконструкция на хаплотипа.....	79
4.4.3.	Статистическа оценка.....	81
4.4.4.	Определяне „възраст на мутацията“ – възрастта на най-скорошния общ предшественик.....	82
4.5.	Обобщение на резултатите и заключение.....	85
5.	ИЗВОДИ.....	88
6.	ПРИНОСИ.....	90

7. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	. 91
7.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 91
7.2. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 92
БИБЛИОГРАФИЯ 93

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ATTRv – наследствена транстиретинова амилоидоза

ATTRwt – див тип транстиретинова амилоидоза

TTR-ФАП – транстиретинова фамилна амилоидна полиневропатия

TTR-ФАК – транстиретинова фамилна амилоидна кардиомиопатия

PCR – полимеразна верижна реакция

SNP – единичен нуклеотиден полиморфизъм

EDTA – етилендиаминтетраоцетна киселина

кДНК – копи ДНК

ELB – Excoffier-Laval-Balding алгоритъм

MCMC – Markov chain Monte Carlo алгоритъм

РЕЗЮМЕ

Наследствената транстиретинова амилоидоза е мултисистемно генетично заболяване с късно начало, засягащо периферната нервна система, автономната нервна система, сърцето и др. Характеризира се с известна генетична и фенотипна хетерогенност, като България е една от страните с висока честота на генетично носителство на амилоидогенни варианти в гена *TTR*, които причиняват заболяването. В България е характерна ендемичност на разпространението на *TTR* генетичните дефекти, най-честият от които е известен като Glu89Gln. Изследванията, проведени в рамките на настоящия дисертационен труд обхващат различни аспекти по отношение на разпространението, клиничната проява и молекулните механизми на патогенеза при пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза в България.

Беше проведен скрининг за патологични варианти в *TTR* гена при предполагаеми нови пациенти, при което генофондът по отношение на амилоидогенни варианти беше допълнен с нов за страната вариант Glu54Leu. Роднините на новооткритите пациенти също бяха генетично тествани, при което високият дял на положителни безсимптомни носители сред изследваната група доказва необходимостта от скрининг в засегнатите семейства. Отрицателните резултати от скрининга при новородени от ромски произход от региона на градовете Полски Тръмбеш и Русе отхвърлиха хипотетичната ендемичност на варианта Gly47Glu, с което вариантите, за които има доказани ендемични региони в България остават Glu89Gln, Val30Met и Ser77Phe. Резултатите от проведените изследвания за търсене на патологични генетични варианти потвърдиха наличието на горещ регион в екзони 2 и 3 на *TTR* гена за натрупване на амилоидогенни варианти сред българската популация.

Беше направено генотипизиране на чести полиморфизми с потенциален модифициращ болестта ефект при пациенти с *TTR* варианта Glu89Gln. Резултатите показаха наличие на статистическа корелация между възрастта на начало на заболяването и полиморфизма rs1791228. Анализа на ефекта на rs1791228 върху първоначалното системно засягане в изследваната кохорта показа и увеличение на дяла пациенти, носители на алел Т с първоначално сърдечно и смесено засягане. Наблюдаваните резултати до голяма степен съвпадат със съобщаваните в литературата данни, но предложените молекулни механизми все още не са достатъчно добре проучени за да може

да се направи достоверен извод за ефекта на този полиморфизъм върху развитието на наследствена транстиретинова амилоидоза.

Резултатите от проведения транскрипционен анализ на транстиретиновата генна експресия в проби от урина и кръвна плазма на Glu89Gln пациенти установиха смесен моно- и биалелен транскрипционен профил с различни съотношения между мутантен и див тип транстиретин, което хипотетично би могло да има отношение върху прогресията на заболяването. Спрямо резултатите от изследването на двама монозиготни близнака беше предложен хипотетичен механизъм за възраст-зависима алел-специфична генна експресия. Въпреки, че са необходими още изследвания за изясняване на връзката между конкретния наблюдаван експресионен профил и развитието на наследствена транстиретинова амилоидоза, бяха поставени основи за проучвания върху молекулярни методи за прогностика на прогресията на заболяването.

Беше проведен хаплотипен анализ на скачени с *TTR* гена генетични микросателитни маркери, който статистически потвърди хипотезата за наличие на ефект на родоначалника за изследваните групи пациенти, носители на *TTR* вариантите Glu89Gln, Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu. Беше изчислена теоретичната възраст на най-скорошния общ предшественик за четирите вариантни групи, при което беше установено, че Val30Met е възникнал най-отдавна в нашата популация. Резултатите от проведените популационно-генетични изследвания показаха наличието на уникален за света генетичен профил при българските пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза, който е потенциален материал за изследване на все още недостатъчно добре проучените разлики във фенотипната изява на заболяването.

ВЪВЕДЕНИЕ

Амилоидозите са група от заболявания най-често с начало в зряла възраст, които се причиняват от аномално натрупване на белтъчни агрегати в различни тъкани и органи. Патологичният ефект е специфичен спрямо белтъка причинител на заболяването. Съществуват над 40 различни типа амилоидози, една от които е транстиретиновата амилоидоза. Тя се причинява от натрупване на амилоидни фибрили, съставени от белтъка транстиретин и се среща в две форми: див тип транстиретинова амилоидоза и наследствена транстиретинова амилоидоза, която се причинява от патологични варианти в гена *TTR*.

България е една от страните със сравнително висока честота на наследствена транстиретинова амилоидоза. Клинико-генетичните проучвания в областта започват преди над 10 години у нас, като вече е натрупана значителна пациентска информационна база с над 100 семейства с носителство на патологични варианти в *TTR* гена.

Настоящият дисертационен труд се фокусира върху изследване на българската кохорта от пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза по отношение на генетичната и фенотипна хетерогенност на популацията, изследване на молекулните механизми, стоящи зад разликите в клиничната проява на заболяването, както и проучване на генеалогията в ендемичните региони на страната.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. Същност на наследствената транстиретинова амилоидоза

Транстиретиновата амилоидоза е форма на системна амилоидоза, характеризираща се с отлагания на белтъчни агрегати от белтъка транстиретин под формата на амилоид в различни тъкани и органи. Амилоидните отлагания обуславят различно системно засягане, при което най-честите клинични прояви се свързват с нарушения в периферната нервна система, сърцето, автономната нервна система и гастроинтестиналният тракт¹. Транстиретиновата амилоидоза е заболяване с начало в зряла възраст и се среща в две форми: сенилна форма на транстиретинова амилоидоза (див тип, ATTRwt) и наследствена транстиретинова амилоидоза (вариантен тип, ATTRv)². Дивият тип транстиретинова амилоидоза се причинява от амилоидно натрупване на нормален транстиретинов белтък и се нарича още сенилна форма поради късното начало на изява обикновено над 70 годишна възраст. При тази форма на заболяването преобладава сърдечното засягане, което най-често се проявява чрез развитие на кардиомиопатия³. Неврологична симптоматика може да се наблюдава по-рядко под формата на синдром на карпалния канал⁴. От друга, страна наследствената форма на транстиретинова амилоидоза е автозомно-доминантно генетично заболяване, което се причинява от патологични варианти в *TTR* гена, кодиращ белтъка транстиретин, които водят до натрупване на транстиретинов амилоид. Наследствената форма на транстиретинова амилоидоза се характеризира със значителна хетерогенност по отношение на възрастта на начало на заболяването, системното засягане и тежестта на протичане на заболяването⁵.

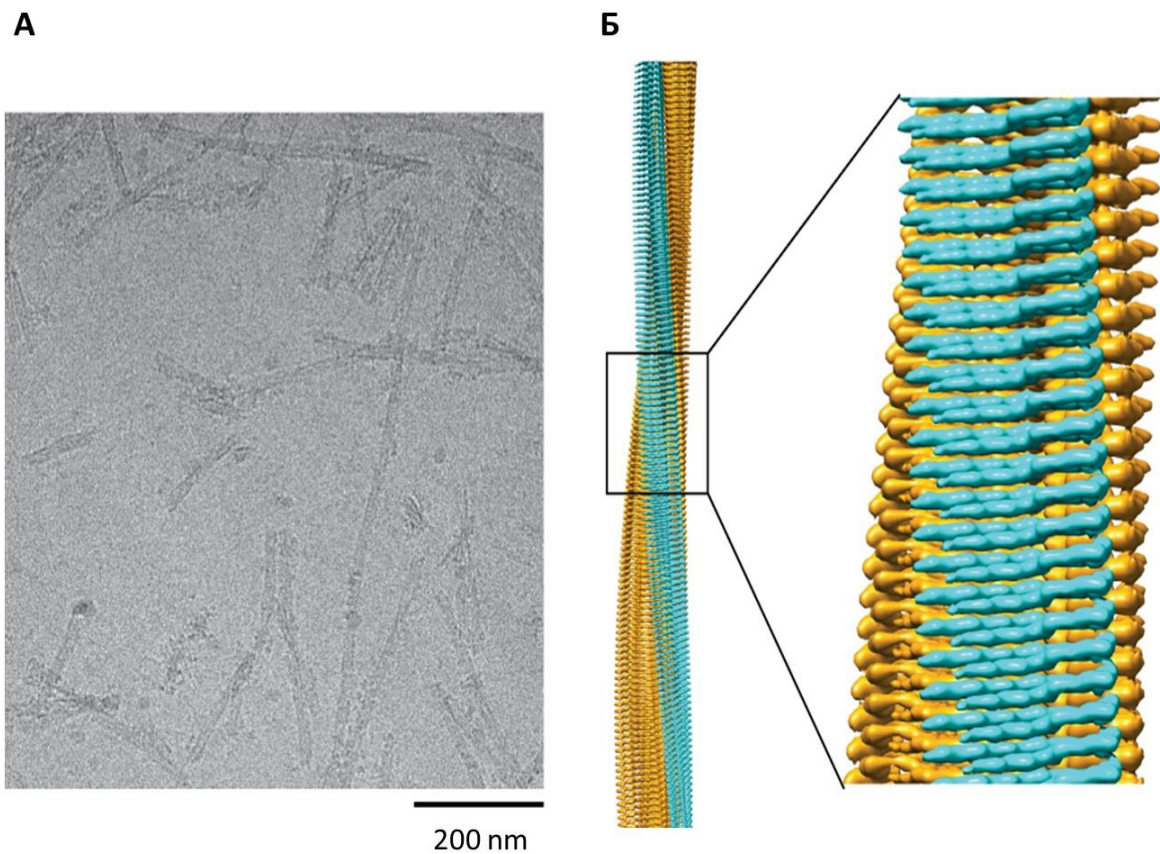
Транстиретиинът е хомотетрамерен транспортен белтък с молекулна маса 55 kDa, чийто зрял функционален мономер се състои от 127 аминокиселини (Фигура 1). Този белтък транспортира тироксин (Т4) и ретинол (витамин А), като се експресира основно в черния дроб, хороидния плексус и ретината^{6,7}. Четирите идентични мономера на транстиретина структурно се състоят предимно от β -листове и взаимодействат чрез хидрофобни и слаби хидрофилни връзки, формирайки централен активен център за свързване на белтъчните лиганди⁷.



Фигура 1. Четвъртична структура на зрелия транстиретинов белтък, свързал две молекули тироксин⁸. В различни цветове са показани четирите транстиретинови мономера.

Транстиретиновата амилоидоза попада в групата на протеинопатиите, свързани с грешки в белтъчното нагъване. Дестабилизирането на третичната и четвъртична структура на транстиретина е в основата за образуване и отлагане на амилоид под формата на транстиретинови амилоидни фибрили (Фигура 2). Известни са два типа транстиретинови амилоидни фибрили – тип А и тип В. Тип А се състои от скъсени белтъчни форми на транстиретина и се среща главно при пациенти с див тип транстиретинова амилоидоза. Фибрилите от тип В са изградени от пълноверижан белтък и се срещат най-вече при пациенти с наследствена форма на заболяването⁹. Въпреки това, при всички форми на транстиретинова амилоидоза могат да се срещнат амилоидни фибрили от двата типа¹⁰. При наследствената форма са известни повече от 130 патологични генетични варианта в *TTR* гена¹¹. При човека той се локализира на дългото рамо на 18-та хромозома и се състои от 4 екзона. Прекурсорният транстиретинов белтък се състои от 147 аминокиселини, 20 от които служат като сигнален пептид и пост-транслационно биват изрязани, за да се образува зрял мономер с дължина от 127 аминокиселини. Поради това в миналото генетичните варианти в белтък-кодиращата последователност са били обозначавани спрямо зрялата аминокиселинна последователност, която е с 20 аминокиселини по-къса. В днешно време е номенклатурно прието белтъчната замяна да бъде отбелязвана спрямо

прекурсорният транстиретинов белтък. Например един от най-честите *TTR* патологични варианти в света р.Val50Met все още се използва от клиничните специалисти като Val30Met спрямо зрялата аминокиселинна последователност. Патологичните варианти в *TTR* гена, асоциирани с амилоидоза водят до дестабилизиране на транстиретиновата молекула и за това още могат да се срещнат като амилоидогенни¹¹. Въпреки, че крайният ефект на тези генетични дефекти е до някаква степен сходен по отношение на органното и тъканно засягане, молекулните механизми за образуване и клетъчната токсичност на транстиретиновите амилоидни фибрили все още не са достатъчно добре изучени и могат да варират в контекста на различните генетични варианти¹².

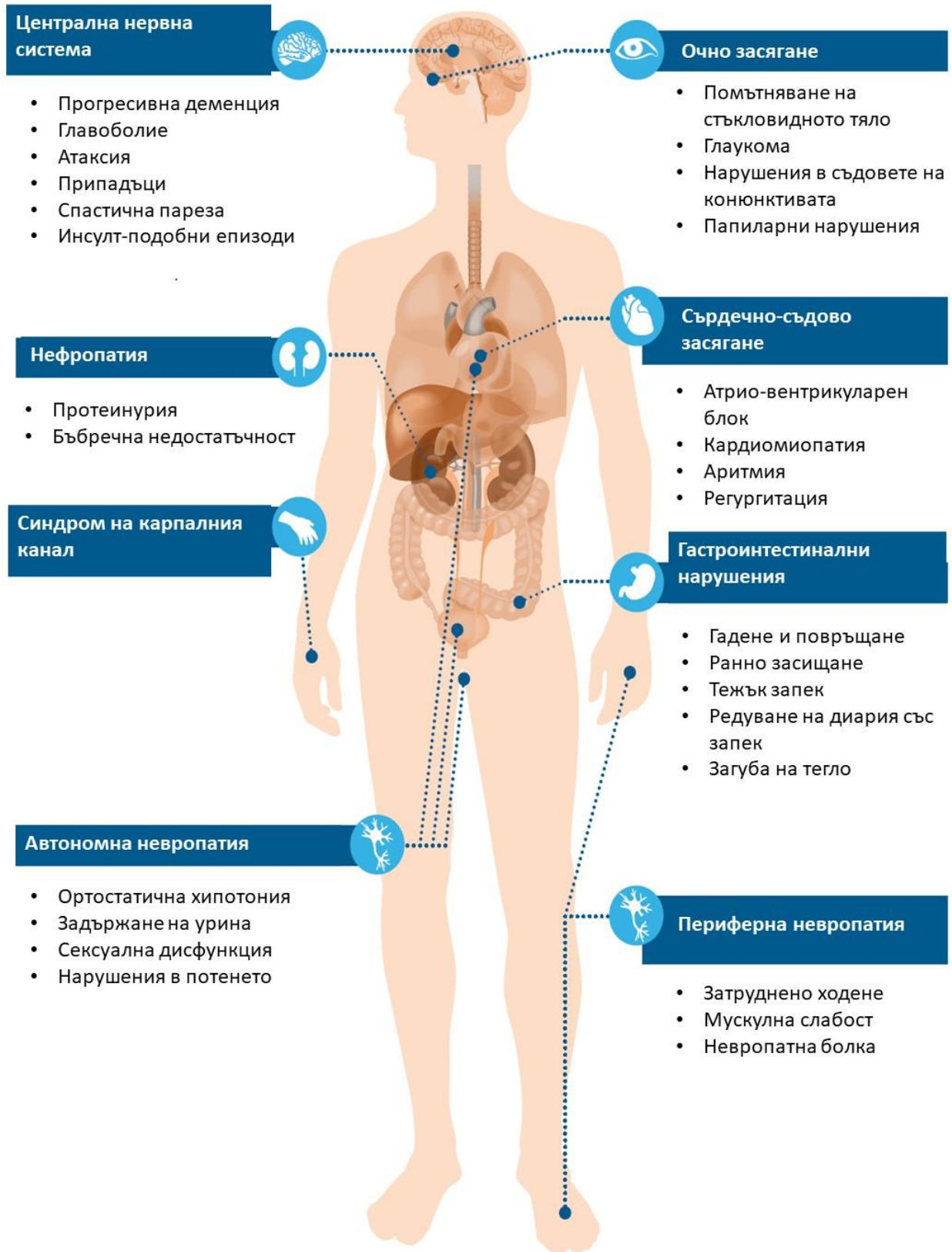


Фигура 2. Реконструкция на транстиретинов амилоиден фибрил чрез крио-електронна микроскопия. А: Микроскопски образ на изолиран от пациент амилоид. **Б:** Страничен образ на реконструирана 3D карта на фибрила – в син цвят са N-крайните белтъчни фрагменти, а в жълто са оцветени C-крайните фрагменти¹³.

1.1.1. Клинична изява на наследствената транстиретинова амилоидоза

Фенотипната изява на наследствената транстиретинова амилоидоза е силно хетерогенна. Клиничната картина е до голяма степен свързана с епидемиологията на заболяването, както и със съществуващата генотип-фенотипна корелация и наличието на ендемичност и спорадичност в засегнатите популации. Пенетрантността на болестта също е вариабилна и отново зависи от фактори като генотип, произход и пол на засегнатия родител¹⁴. Също така, поради мултисистемната ѝ природа, болестта често започва като първоначално неврологично, постепенно инвалидизиращо състояние и може бързо да прогресира до рестриктивно сърдечно увреждане с летален изход (Фигура 3). При формите на транстиретинова амилоидоза, където се проявява сърдечно засягане прогнозата е най-често значително влошена поради развитието на сърдечна недостатъчност. Интересен феномен при клиничната изява на наследствената транстиретинова амилоидоза е зависимостта между възрастта на начало на заболяването и фенотипа. Дори при носителство на един и същ патологичен генетичен вариант, при ранно начало на изява пациентите често показват симптоми на периферна невропатия, засягаща тънките нервни влакна, докато при пациентите с късна изява на болестта най-често се наблюдава сърдечно засягане¹⁵. Въпреки сложната клинична картина, могат да се отделят няколко направления в клиничния ход на болестта спрямо системното засягане.

Наследствената транстиретиновата амилоидоза нерядко започва под формата на периферна полиневропатия, поради което заболяването може да се срещне под името транстиретин-свързана фамилна амилоидна полиневропатия (ТТР-ФАП). Обикновено тези симптоми са съпроводени с развитие на синдром на карпалния канал. Периферната невропатия се проявява като сетивно-двигателен полиневропатен синдром и много често започва със засягане на долните крайници, поради нарушението на дисталните тънки миелинизирани и немиелинизирани нервни влакна. Аксонната дегенерация прогресира до засягане на проксималните горни и долни крайници, което води до тежка инвалидизация^{16,17}.



Фигура 3. Системно засягане при ATTRv¹⁸.

Автономното засягане е отново често срещано при случаите на наследствена транстиретинова амилоидоза и се проявява чрез гастроинтестинални нарушения (тежка диария, запек, повръщане), анхидроза, еректилна дисфункция ортостатична хипотония и неврогенен пикочен мехур^{17,19}.

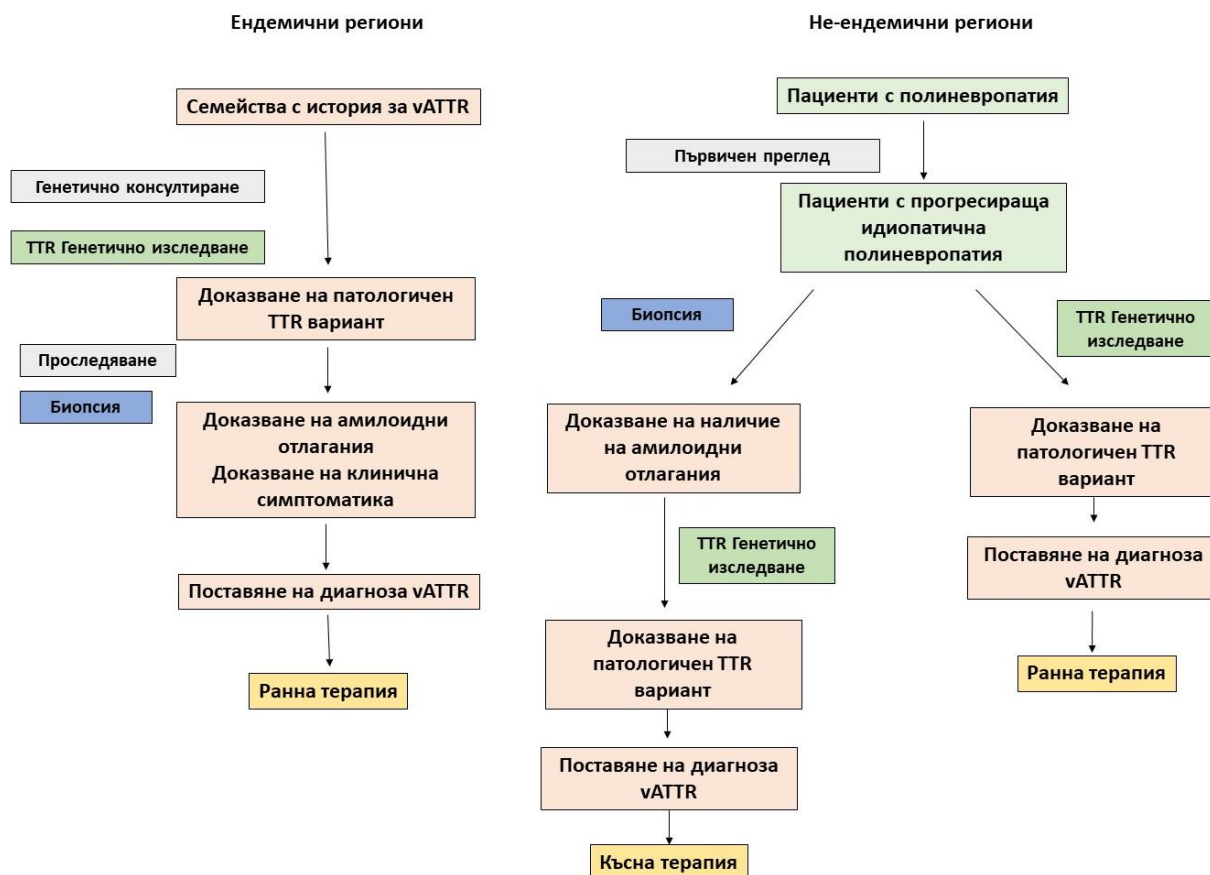
Сърдечното засягане при транстиретиновата амилоидоза представлява спектър от клинични симптоми, който може да се простира от асимптоматичен атриовентрикуларен блок до бързо прогресираща сърдечна недостатъчност¹⁷. Транстиретин-свързаната фамилна амилоидна кардиомиопатия (ТТР-ФАК) е форма на рестриктивна кардиомиопатия предизвикана от транстиретинови амилоидни инфилтрати в миокарда на лява и дясна сърдечна камера, предсърдията и сърдечните клапи. Прогресиращата миокардна хипертрофия води до сърдечна недостатъчност със запазена фракция на изтласкване. Поради това най-честата причина за смърт при пациентите с наследствена транстиретинова амилоидоза е внезапната сърдечна смърт²⁰.

Други по-редки клинични прояви при наследствения тип транстиретинова амилоидоза са нефропатия, ретинопатия и церебрална амилоидна ангиопатия. Смята се, че церебралната амилоидна ангиопатия и очното засягане са проява на лептоменингеалната форма на заболяването, при което източник на транстиретинов амилоид най-вероятно е хороидния плексус²¹. При това типични прояви на засягане на централната нервна система са мозъчен инфаркт, хеморагия, хидроцефалия, атаксия, спастична парализа, деменция и др¹⁷.

1.1.2. Диагностика на наследствената транстиретинова амилоидоза

В зависимост от това дали пациентите произлизат от ендемичен за заболяването регион или става въпрос за спорадичен случай на наследствена транстиретинова амилоидоза, времето за поставяне на диагноза значително варира (Фигура 4). При наличие на ендемичност често пациентите произлизат от семейства с доказана транстиретинова амилоидоза и поставянето на диагноза е значително ускорено. Генетичното консултиране и клиничното проследяване на безсимптомни носители на *TTR* генетични дефекти са ключови за провеждането на терапия при пациенти от ендемичните региони. При спорадичните случаи с неясна фамилна анамнеза често поставянето на точната диагноза е забавено с 3-4 години поради отхвърлянето на редица диференциални диагнози, като

например хронична възпалителна демиелинизираща полиневропатия. Поради това навременното поставяне на диагноза и започването на терапия зависят основно от снемането на детайлна фамилна анамнеза и от оценката на неврологичното и кардиологично състояние на пациента, с последващо провеждането на хистологично и генетично изследване⁶.



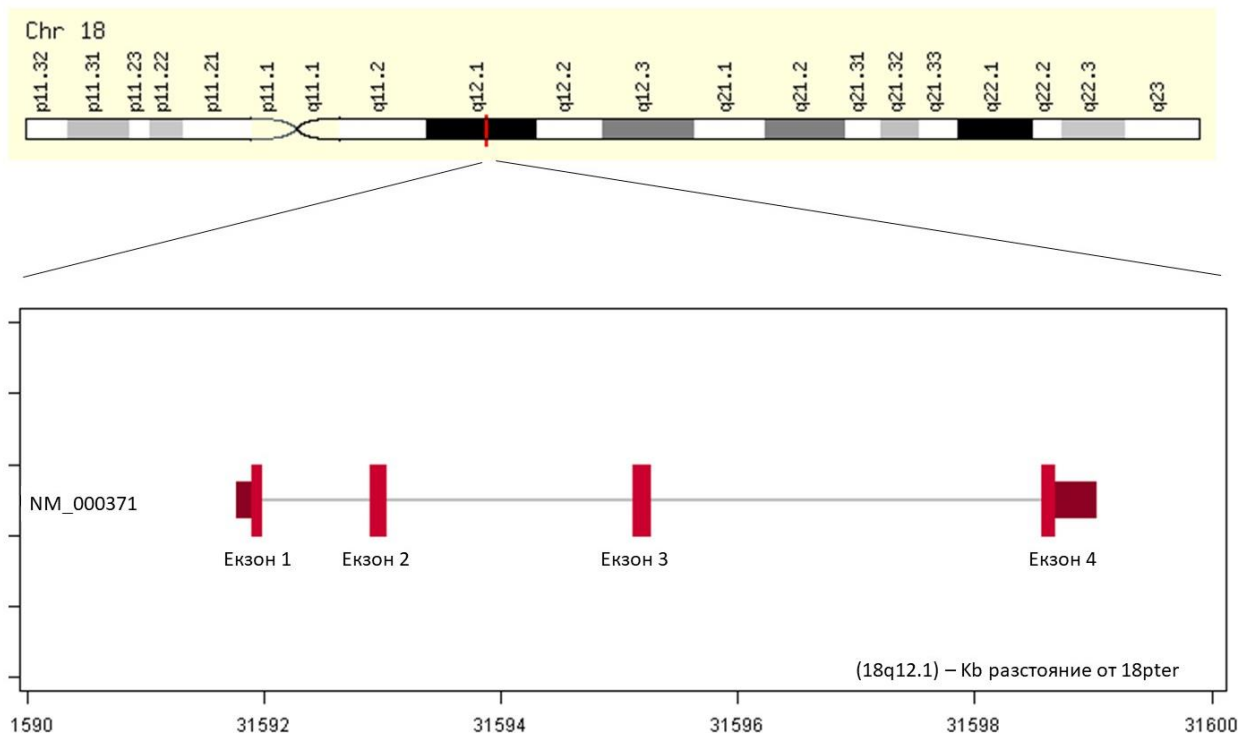
Фигура 4. Примерна схема на диагностичен алгоритъм при пациенти с транстиретинова полиневропатия¹⁴.

Оценката на неврологичната симптоматика включва изследване на нервната проводимост в крайниците за определяне на акционните потенциали на сетивните и двигателни неврони. Такива изследвания са нужни за детекция и определяне на тежестта на аксонната невропатия¹⁴. Други тестове, които се прилагат за оценка на периферната и автономна нервна функция са изследване на симпатиковия кожен отговор, судомоторен тест и изследване на вариабилността на сърдечния ритъм¹⁶. Разработените клинични скали за оценка и проследяване на неврологичното състояние на пациентите са NIS (*Neurology Impairment Scale*)²² и PND (*Polyneuropathy Disability*)²³.

Целта при изследване на кардиологичното засягане при пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза е откриването на инфилтрираща кардиомиопатия и сериозни проводни нарушения, които могат да доведат до внезапна сърдечна смърт. Подходите за диагностика включват ехокардиография, 24 часово наблюдение с Холтер ЕКГ монитор, инвазивна оценка, магнитно-резонансна томография и др¹⁴. Особено успешно е провеждането на сцинтиграфия с ^{99m}Tc-3,3-дифосфано-1,2-пропано-дикарбоксилова киселина (*^{99m}Tc-DPD*), ^{99m}Tc-пирофосфат (*^{99m}Tc-PYP*) и ^{99m}Tc-хидроксиметилен дифосфонат (*^{99m}Tc-HMDP*), които съдържат радиоактивен изотоп на технеций за визуализиране на транстиретинови амилоидни отлагания в миокарда¹⁶. Натрупването в сърцето на ^{99m}Tc-DPD и ^{99m}Tc-PYP при провеждането на сцинтиграфия е с особено висока специфичност по отношение на транстиретиновата амилоидоза и може да се използва като заместител на сърдечната биопсия за потвърждаването на транстиретинов амилоид. В допълнение, амилоидът предизвиква сърдечна псевдохипертрофия, която се визуализира като отблясъци при провеждане на ехокардиограма поради натрупване на амилоидни фибрили в екстрацелуларния мактрикс на миокарда, увеличавайки неговата дебелина. За проследяване на прогресията на системното засягане при пациентите се използват и налични биомаркери. Това включва изследване на нивата на N-крайния про-B тип натриуретичен пептид (*NT-proBNP*), тропонин, както и изследване на скоростта на гломерулна филтрация (*eGFR*), които са информативни по отношение на оценка на прогресията на сърдечната и бъбречната недостатъчност²⁴.

Хистопатологичното изследване на тъканна биопсия има за цел установяване на амилоидни отлагания в изследваната тъкан, която може да бъде слюнчени жлези, подкожна мастна тъкан, лигавица от гастроинтестиналния тракт, периферен нерв, сърце, бъбреци и др. Първоначално се прави оцветяване с Конго червено, при което амилоидните отлагания се наблюдават в зелен цвят при поляризационна микроскопия¹⁶. Известни са варианти в афинитета на C-крайните фрагменти на транстиретиновия амилоид към Конго червено, които се дължат на типа на транстиретиновите фибрили⁶. Въпреки това, оцветяването с Конго червено е неспецифичен метод за детекция на амилоид, поради което се налага последващо провеждане на имунохистохимично изследване за установяване на конкретния амилоидогенен прекурсорен белтък.

Положителното хистологично изследване за наличие на транстиретинов амилоид налага провеждането на генетично изследване за търсене на патологични варианти в *TTR* гена. По този начин могат да бъдат разграничени двете форми на транстиретинова амилоидоза – наследствена и див тип. Амилоидогенните патологични варианти в *TTR* гена най-често са единични нуклеотидни замени в белтък-кодиращата последователност, които водят до промяна на кодираната аминокиселина (*missense* варианти)²⁵.



Фигура 5. Локализация и структура на *TTR* гена^{26,27}.

Тъй като *TTR* генът се състои само от 4 екзона (Фигура 5), изследването на такива генетични дефекти изключително успешно се провежда чрез директно секвениране по метода на *Sanger*²⁸. Установяването на генетичния дефект и генетичното консултиране при случаите на наследствена транстиретинова амилоидоза е от изключително значение за проследяването и откриването на безсимптомни носители в засегнатите семейства. Ранното генетично тестване на пациенти със съмнение за транстиретинова амилоидоза в много случаи съкращава значително времето за поставяне на диагноза и води до навременно започване на специфична терапия.

1.1.3. Подходи за лечение на наследствена транстиретинова амилоидоза

Мултисистемната същност на наследствената транстиретинова амилоидоза налага мултидисциплинарен подход при провеждане на терапията. Грижите за пациентите трябва да бъдат насочени в посока към лекуване на засегнатите органи, симптоматична терапия и модифицираща болестта терапия за прекратяване на натрупването на амилоид. През последните години са разработени редица модифициращи терапии, първата от които е била чернодробната трансплантация. Тъй като черният дроб е основния орган, в който се експресира транстиретиновият белтък, премахването на източника на мутантен белтък ще спомогне за овладяването на прогресията на заболяването. Въпреки това, дори и след чернодробна трансплантация при голяма част от пациентите се наблюдава прогресия в органното засягане. Фактори, повлияващи удължаването на живота при пациентите след чернодробна трансплантация са средният индекс на телесна маса, ранното начало на изява на заболяването, ранната диагностика преди провеждането на трансплантация, както и носителството на конкретен генетичен вариант (Val30Met)^{14,29}.

Необходимостта от специфична терапия за пациентите, които биха се повлияли слабо от чернодробна трансплантация е наложило разработването на молекулни терапии за овладяване прогресията на амилоидогенезата. Тези терапии най-общо се разделят на транстиретинови кинетични стабилизатори и РНК терапии за потискане на генната експресия.

Транстиретиновите кинетични стабилизатори представляват малки молекули, които се свързват с висок афинитет към тироксин-свързващия център на транстиретиновия тетрамер, като по този начин стабилизират третичната и четвъртична нативна белтъчна структура. Стабилният белтък вече не е амилоидогенен и това до голяма степен повлиява овладяването на прогресията на болестта. Съществуват редица разработки на такива кинетични стабилизатори, две от които са преминали клинично проучване. Това са препаратите *Tafamidis* и *Diflunisal*. В момента *Tafamidis* е преминал всички етапи на клинични изпитания и е одобрен за терапия на пациенти със ТТР-ФАП, както и при пациенти с ТТР-ФАК и див тип транстиретинова амилоидна кардиомиопатия³⁰. Фаза III на клиничните проучвания относно ефективността на *Diflunisal*

при пациенти с TTR-ФАП е необходимо да бъде довършена с по-голяма пациентска извадка за да достигне статистическа значимост³¹.

РНК интерференцията представлява молекулен механизъм за блокиране на експресията на конкретен ген чрез къса комплементарна РНК молекула, която се свързва с иРНК (информационна РНК) и води до блокиране на транслацията или до разграждането на иРНК (транскрипционно потискане)³². Съществуващите одобрени лекарства, базирани на РНК интерференцията за потискане на експресията на мутантен транстиретин са *Patisiran* и *Inotersen*. *Patisiran* е малка интерферираща РНК молекула (*siRNA*) обвита от липидни наночастици, конструирана да се натрупва предимно в черния дроб, където да потиска транстиретиновата експресия чрез *RISC*-медирано (*RNA induced silencing complex*) разграждане на иРНК. Ефективността и безопасността на този медикамент са оценени във Фаза III на клиничното проучване *APOLLO*, при което той се доказва като достатъчно ефективен и безопасен при лечение на пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза³³. *Inotersen* е второ поколение медикамент, който представлява антисенс РНК олигонуклеотид, конструиран да понижава нивата на *TTR* експресията, този път чрез РНаза Н-медирано разграждане на иРНК или чрез блокиране на транслацията. Това лекарство е във Фаза III на клиничното проучване *NEURO-TTR*, чиито резултати сочат, че пациентите на тази терапия трябва да бъдат следени за развитие на тромбоцитопения и бъбречни проблеми³⁴.

1.2. Механизми на патогенеза при наследствената транстиретинова амилоидоза

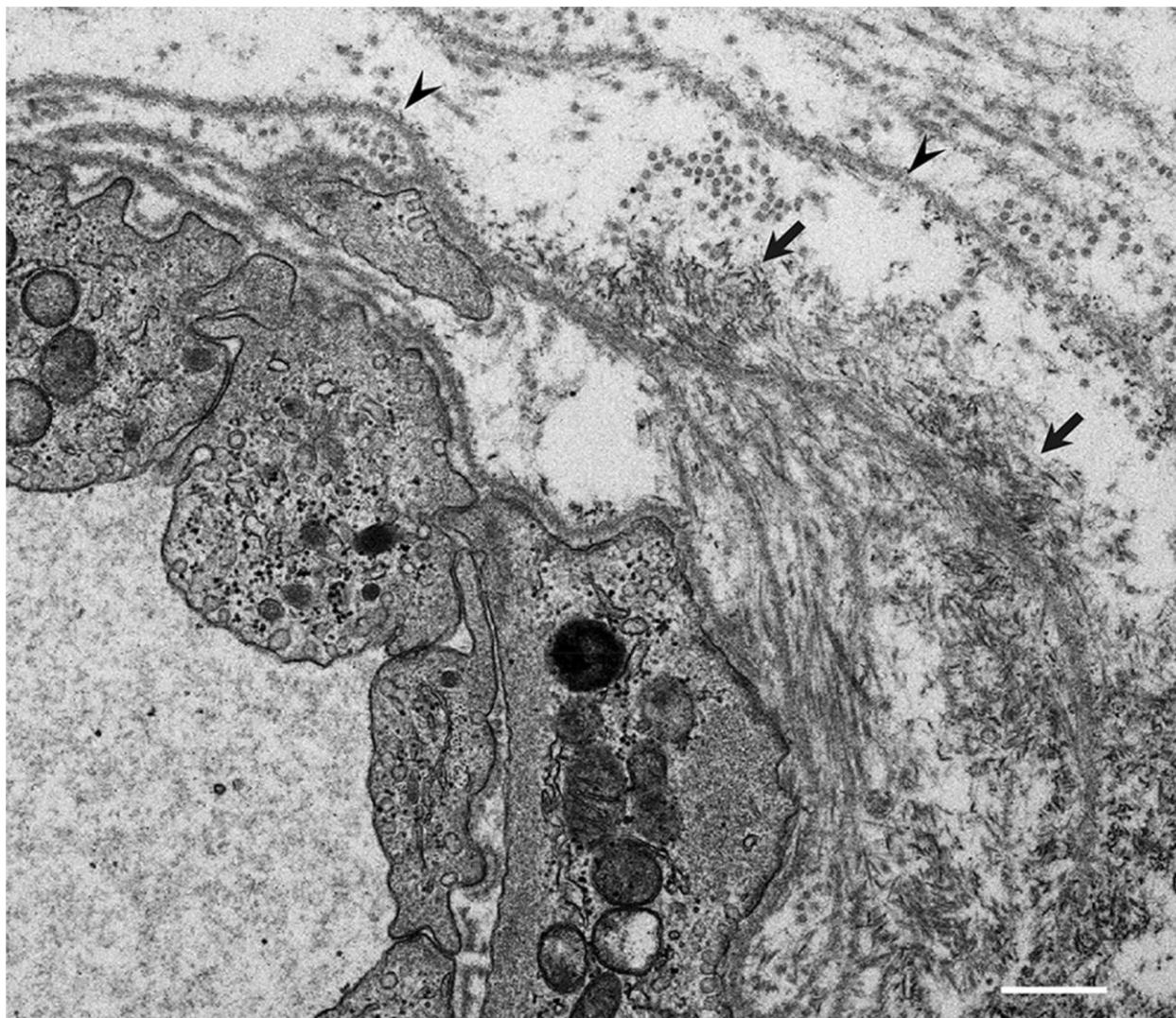
1.2.1. Амилоидогенеза

Амилоидогенните патологични варианти в *TTR* гена имат дестабилизиращ ефект върху третичната и четвъртичната структура на транстиретиновия белтък. Въпреки това, нормалният белтък може също да загуби своята стабилност, в резултат на което да възникнат амилоидогенни процеси. Отлагането на див тип транстиретинов амилоид има роля при патогенезата не само на сенилната форма на транстиретинова амилоидоза, но се среща и в амилоидни отлагания в комбинация с мутантен транстиретин при наследствената форма. Това е доказано при Val30Met пациенти с късно начало на

заболяването. При възрастни пациенти с наследствена форма на транстиретинова амилоидоза може да се наблюдава прогресия на сърдечното засягане дори и след чернодробна трансплантация, което се причинява от отлагане на див тип белтък⁴.

Съставът на амилоидното отлагане при пациентите с транстиретинова амилоидоза може да варира и по отношение на белтъчната структура. При отлагания, съдържащи транстиретинов белтък с пълна дължина, амилоидните фибрили се обозначават като Тип В. Този тип фибрили се срещат най-вече при пациенти с Val30Met с ранно начало на заболяването, както и при пациенти, носители на варианта Tyr114Cys. При повечето други генетични варианти на болестта, включително и при дивия тип транстиретинова амилоидоза се срещат фибрили, съставени от скъсен протеин, най-често С-краен фрагмент от транстиретиновия белтък, който започва от 49-та аминокиселинна позиция. Тези скъсени фрагменти обикновено са в комбинация с белтък с пълна дължина, като този вид транстиретинов амилоид се обозначава като Тип А⁹. Тези наблюдения са довели до хипотезата за наличие на няколко различни механизма на патогенеза при транстиретиновата амилоидоза, един от които включва протеолитично скъсяване и последващата допълнителна дестабилизация на транстиретиновия мономер³⁵.

Процесът на амилоидогенеза първоначално започва с образуване на олигомерни аморфни комплекси от транстиретинови мономерни и димерни, които в последствие чрез процесите на нуклеация (*nucleation*) и посяване (*seeding*) водят до полимеризация и образуване на протофибриларни и фибриларни амилоидни отлагания⁶. Ефектът на фибриларните амилоидни отлагания може да се различава в зависимост от състава им, но най-общо механизмът на токсичност и тъканна увреда включва натрупване в базалните мембрани на ендотелните клетки на кръвоносните съдове в ендоневриума и Швановите клетки, базалните мембрани на кардиомиоцитите и васкулатурата на гладката мускулатура (Фигура 6)³⁶. Молекулните механизми на цитотоксичност включват свързване на транстиретиновите структури с клетъчни мембранни йонни канали, което води до тяхното отваряне и нарушаване на функциите на клетъчните мембрани⁶.



Фигура 6. Амилоидните фибрили, образувани върху базална мембрана. Напречен разрез на сурален нерв от биопсична проба на пациент с Val30Met с ранно начало от ендемична област. Уранил ацетат и олово цитратно оцветяване. Амилоидните фибрили се откриват асоциирани с базалните мембрани (върхове на стрелки), обграждащи микрокръвоносен съд на ендоневриума. Отлаганията от амилоидни фибрили са обозначено със стрелки. Мащабна лента $0,5 \mu\text{m}^4$.

Освен напълно изграденият амилоиден фибрил, тъканна и клетъчна токсичност могат да упражняват и олигомерните молекулни предшественици на амилоида³⁷. Патологичният ефект от натрупване на транстиретинови олигомерни структури включва промяна в пропускливостта на ендотела на кръвоносните съдове и нарушаване на неговата бариерна функция³⁸. Друг аспект по отношение на патогенезата е процесът на възпаление³⁹ и потенциалният отговор на имунната система към чуждите за организма епитопи на транстиретиновата структура, които в нативно състояние не са достъпни до клетките на имунната система и биха провокирали автоимунен отговор⁴⁰.

Огромна част от изследванията върху амилоидни отлагания доказват наличието на скъсен транстиретинов С-краен белтъчен фрагмент, съдържащ от 49-ти до 127-ми аминокиселинни остатъци³⁵. Това предполага наличието на широко застъпен протеолитичен процес в механизма на патогенеза при транстиретиновата амилоидоза, разкъсващ специфично връзката между Lys-48 и Thr-49. След протеолизата транстиретиновите молекули са силно амилоидогенни и образуват стабилни фибриларни отлагания⁶. Някои *TTR* патологични варианти са по-податливи на протеолитично срязване спрямо други. При *in vitro* проучване, проведено върху мутантен Ser52Pro белтък, се доказва селективната трипсинова протеолиза на мутантния пред нормалния белтък чрез изследване на хибриден транстиретинов комплекс. Доказва се, че отделянето на лизираните фрагменти се влияе от наличието на допълнителен биомеханичен стрес в средата, какъвто съществува например в сърцето³⁵. Ser52Pro е един от силно дестабилизиращите амилоидогенни варианти³⁵, който се открива и при български пациенти. Изясняването на механизма на амилоидно отлагане при този генетичен вариант спомага за разкриването на все повече информация относно различните процеси с ефект върху развитието на болестта. Конкретните протеолитични ензими, които участват в разграждането на транстиретиновата молекула все още не са известни, но се предполага, че това са най-вероятно трипсин-подобни серинови протеази⁴¹.

Друг аспект на патофизиологията на транстиретиновата амилоидоза е въздействието на вътреклетъчните и извънклетъчни системи за контрол върху правилното белтъчно нагъване и превенция на белтъчното агрегиране. Вътреклетъчната система е представявана от молекулни шаперони, локализирани в ендоплазмения ретикулум на клетката. Ролята на тези молекули е да свързват синтезираните полипептидни вериги и да осигуряват правилната белтъчна конформация и правилен белтъчен транспорт. Вариантни белтъчни молекули, които са резултат от грешки в белтъчната синтеза или от промени в гените, които ги кодират, често не могат да приемат правилна пространствена структура. Това се отчита от шапероновите молекули, действащи като своеобразна система за контрол на качеството. Такива погрешно нагънати белтъчни молекули се разграждат от протеазомната система на ендоплазмения ретикулум. Съществуват силно нестабилни и склонни към агрегиране транстиретинови варианти (Asp18Gly)^{42,43}, които се детектират и разграждат от системите на ендоплазмения ретикулум преди да бъдат секретирани от

черния дроб, което предпазва организма от развитие на тежка и бързо прогресираща амилоидоза. Други варианти не са до такава степен дестабилизиращи и успяват да достигнат етапа на секреция в кръвния ток на организма. В такива случаи защита срещу амилоидогенезата представляват извънклетъчните шаперони⁴¹. Тези молекули разпознават хидрофобни пептидни участъци на повърхността на белтъка, резултат от неправилно нагъване на молекулата и ги свързват, защитавайки организма от процесите на белтъчна агрегация. Известни извънклетъчни шаперони са хаптоглобин, алфа-2-микроглобулин и клъстерин, които се откриват в завишени количества при пациенти с транстиретинова амилоидоза⁴⁴. С възрастта се наблюдава отслабване на шапероновите системи за контрол на белтъчната хомеостаза, което представлява вероятен фактор на стареенето при развитие на амилоидоза⁴¹.

1.2.2. Генетични модификатори на наследствената транстиретинова амилоидоза

Генотип-фенотипната корелация, която е известна по отношение на различните патогенни амилоидогенни варианти в *TTR* гена, не е достатъчна за да обясни хетерогенността (интерпопулационна, интерфамилна) в клиничната изява при пациенти, носители на един и същ патологичен вариант. Налице са редица проучвания, които изследват съществуването на генетични модификатори на заболяването с ефект върху възрастта на начало, системното засягане и генната експресия.

Открито е наличието на протективни варианти в *TTR* гена, които са белтък-стабилизиращи и възпрепятстват амилоидогенезата⁴⁵. Това са Arg104His и Thr119Met, които са *missense* замени и водят до термодинамична или кинетична стабилизация на белтъчната структура⁴⁶. Това са най-често транс-действащи генетични фактори, които се локализируют на другия алел спрямо патологичния вариант⁴⁷ и намаляват или премахват амилоидогенния ефект. Протективното действие на тези генетични замени е установено и изследвано главно при пациенти с Val30Met.

В няколко независими Val30Met популации е наблюдавана корелация между пола на родителя, от който се предава патологичния вариант и тежестта на заболяването (*parent-of-origin* ефект)⁴⁸. Тази зависимост се наблюдава при майчино предаване на болестта, поради което са проведени изследвания на митохондриалния геном при

португалски и шведски пациенти за търсене на митохондриална хаплогрупа или конкретен митохондриален полиморфизъм, които биха обяснили наблюдавания ефект⁴⁹. Достатъчна статистическа значимост се наблюдава за един митохондриален полиморфизъм само при португалските Val30Met пациенти, което показва, че вероятно става въпрос за мултилокусна регулация на наблюдавания ефект в другите популации.

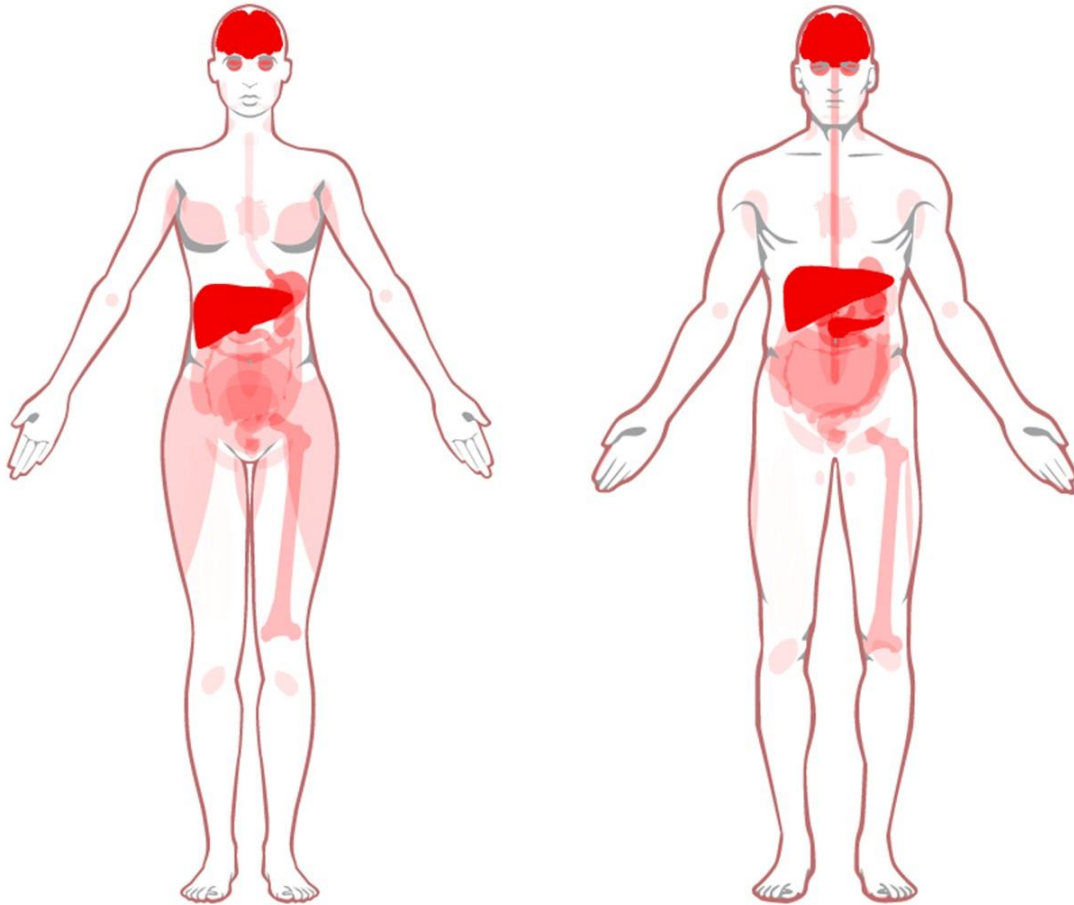
Хипотезата за ефекта на некодиращи генетични модификатори с регулаторна функция върху експресията на транстиретина става все по-атрактивна и бива тествана в различни популации от пациенти с транстиретинова амилоидоза^{50,51}. Наличието на популационни или дори индивидуални различия в генетични локуси, които функционират като свързващи места за транскрипционни фактори, енхансерни елементи, дистални и проксимални регулатори на транскрипцията, елементи, кодиращи микроРНК^{52,53} биха могли да обяснят разликите в експресионния профил на вариантния транстиретин, а от там и наблюдаваните разлики във възрастта на начало и клиничната изява на транстиретиновата амилоидоза^{54,55}. Подходите за тези анализи са много, но обикновено включват стратификация на изследваните пациенти спрямо произход и клинична изява, подбор на изследваните генетични локуси и статистически анализ на откритите варианти. Функционалността на откритите генетични находки може да бъде директно тествана чрез експресионен анализ при пациентите⁵⁶ или теоретично тествана спрямо наличните данни за тъканно специфичната генна експресия от базите данни (напр. Консорциума *GTEX*)⁵⁷. Профилът на потенциалните регулаторни генетични варианти, за които е доказана статистическа значимост и съгласуваност с фенотипните данни обикновено варира между изследваните популации от пациенти. Това налага цялостно провеждане на изследвания за търсене на модификатори на болестта във всяка отделна популация, тъй като наличието на унифицирани за всички пациенти рискови генетични фактори е малко вероятно.

1.2.3. Значение на генната експресия при наследствената транстиретинова амилоидоза

Наличието на фактори с потенциално влияние върху експресията на транстиретина налага по-детайлно изучаване на тъканно специфичната и алел-специфичната експресия, която би обяснила наличието на разлики в хода на заболяването. В следствие на развитието на технологиите за анализ на генната експресия на ниво клетка, тъкан и дори

цял организъм в момента е достъпна детайлна информация относно нивата на експресия на *TTR* гена във всички човешки тъкани (Фигура 7)⁵⁸. Освен в черния дроб, значителна експресия се открива в клетките на хороидния плексус, панкреаса и бъбреците. Въпреки това, проучванията свързани с алел-специфичната експресия на *TTR* гена са изключително недостатъчни за да може да се направят по-генерални изводи относно влиянието на генната експресия върху развитието на транстиретиновата амилоидоза. В проучване на тъканни биопсии от черен дроб при осем шведски пациенти с Val30Met наследствена транстиретинова амилоидоза, се наблюдава едновременна биалелна експресия на нормалния и на вариантния транстиретинов алел⁵⁹. Проучването е проведено в контекста на хипотеза относно влиянието на специфични регулаторни варианти разпознавани от микро-РНК молекули с потенциален ефект върху алел-специфичната експресия на транстиретина. Такъв ефект не се установява в това изследване. Необходими са по-обширни проучвания свързани с анализ на различни видове тъканни проби и проследяване на експресията във времето, за да може да се потвърди или отхвърли евентуален процес на моноалелна експресия при пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза. Автозомната случайна моноалелна експресия е процес, който се проучва все повече в контекста на различни заболявания. Регулаторните механизми, стоящи зад този процес са в етап на проучване и вероятно включват участието на епигенетични модификации на ниво ДНК и хроматин, некодиращи РНК молекули, влиянието на цис- и транс-действащи генетични фактори и междухромозомни взаимодействия⁶⁰.

Изучаването на епигенетичния профил при пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза показва влияние на носителството на Val30Met върху метилирането на определени регулаторни локуси с ефект върху експресията на редица други гени, които вероятно имат роля в патогенезата на болестта^{61,62}. Необходими са допълнителни изследвания на по-големи пациентски извадки за анализ на междумолекулните взаимодействия, връзката между генотипните различия и епигенетичните промени, които биха обяснили молекулярните механизми, модифициращи хода на транстиретиновата амилоидоза.



Фигура 7. Диаграма на тъканната РНК и белтъчна експресия на транстиретина според обединени данни от *Human Protein Atlas* (proteinatlas.org)⁵⁸. Най-високи нива (тъмночервен цвят) се наблюдават в хороидния плексус, черния дроб, панкреаса и бъбреците.

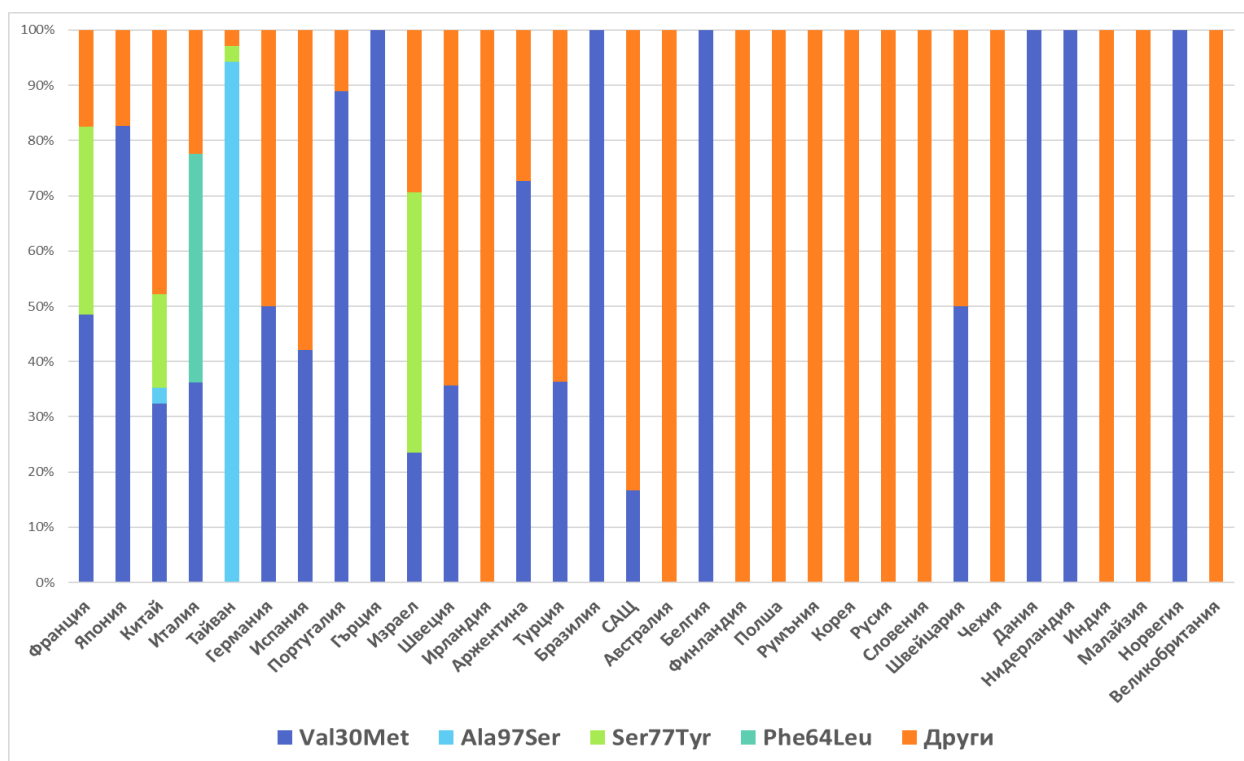
1.3. Епидемиология на наследствената транстиретинова амилоидоза

1.3.1. Световна епидемиология на наследствената транстиретинова амилоидоза

До края на 20-ти век наследствената транстиретинова амилоидоза се е смятала за рядко заболяване с честота от 1-10 / 10 000, което е било характерно за ендемични региони в северна Португалия⁶³, северна Швеция⁶⁴ и два региона в Япония⁶⁵. След това се откриват нови ендемични региони в Кипър⁶⁶ и Майорка⁶⁷. Поради нарастването на информираността на клиничните специалисти и генетичното тестване се появяват и все повече спорадични случаи, често с късно начало. В момента наследствена транстиретинова амилоидоза се открива в над 29 страни по света, включително редица

държави в Европа⁶⁸, САЩ⁶⁹ и Азия⁷⁰. В проучване проведено през 2018 г., включващо данни от Португалия, Япония и Швеция, както и от страни като Италия, Франция, България, Нидерландия, Турция, Кипър и Германия средното разпространение на наследствената транстиретинова амилоидоза е оценено на 10 186 / 1 000 000, с диапазон 5 526-38 468 / 1 000 000⁷¹.

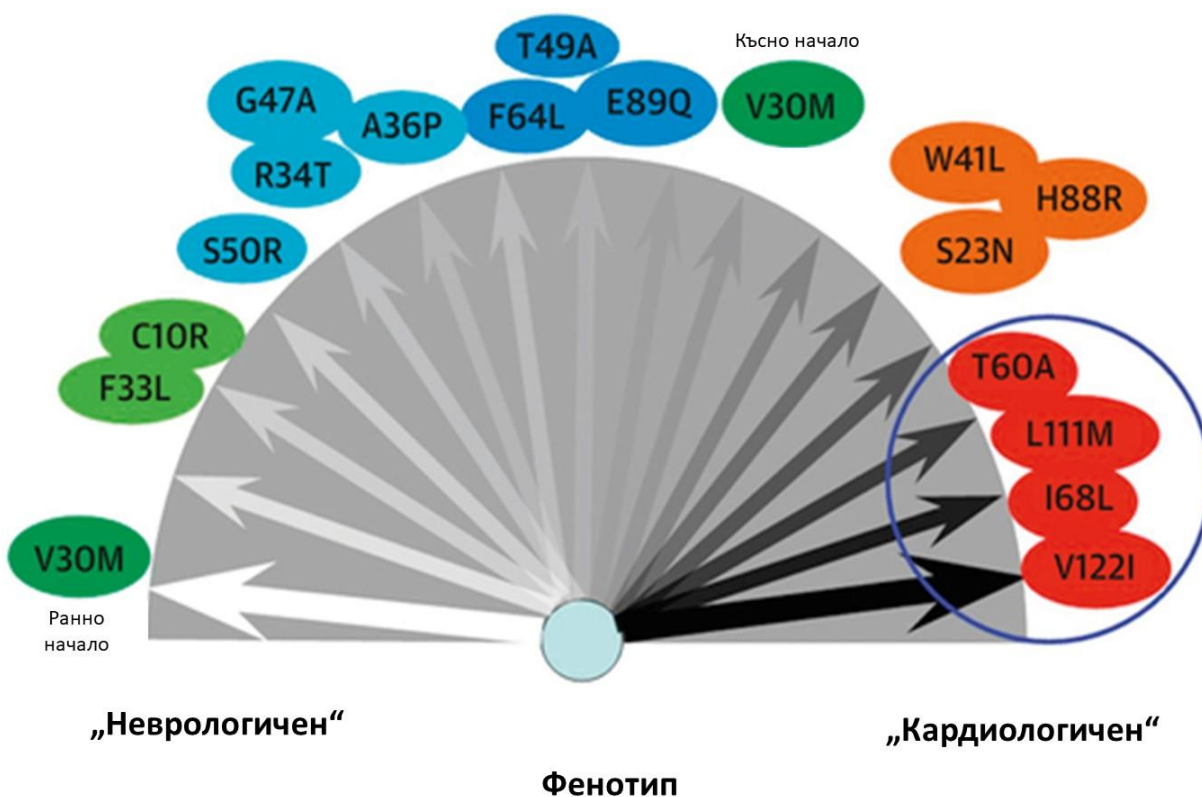
Най-честият патологичен генетичен вариант асоцииран с транстиретинова амилоидоза в ендемичните региони по света е TTR(NM_000371.4):c.148G>A, p.Val30Met или още известен в литературата като Val30Met. Освен в ендемични региони, този вариант се среща и при много спорадични случаи с късно начало на заболяването^{63-65,67,72}. Друг изключително чест патологичен вариант е TTR(NM_000371.4):c.424G>A, p.Val142Ile (Val122Ile), който се среща предимно при пациенти от Африкански произход⁷³. На Фигура 8 са показани резултатите от световно епидемиологично проучване при пациенти с TTR-ФАП, от което ясно се вижда огромното разнообразие от TTR генетични варианти⁷⁴.



Фигура 8. Световно процентно разпространение на TTR патологични варианти при пациенти с TTR-ФАП. Категория „Други“ включва над 50 различни патологични генетични варианти⁷⁴.

Голяма част от проучванията върху наследствената транстиретинова амилоидоза са базирани върху пациенти с Val30Met. Изучаването на ендемичните и спорадични случаи свързани с този патологичен вариант е поставило основата на днешните разбирания за патофизиологията на заболяването. Доказано е, че географският произход и наличието на фамилна история до някаква степен могат да предскажат развитието на клиничната симптоматика при пациенти с Val30Met от Португалия, Швеция и Япония. При заболели от ендемичните региони болестта най-често протича с еднаква честота при мъже и жени, с ранно начало (20-40 годишна възраст), сетивна дисоциация, периферна невропатия, автономна невропатия и сърдечни проводни нарушения в крайния стадий на болестта. Въпреки това се наблюдават разлики в клиничната изява при пациенти от различните ендемични региони. При така наречените спорадични случаи с Val30Met клиничната картина силно наподобява тази при дивия тип транстиретинова амилоидоза, поради наличието на късна изява на болестта (над 50 годишна възраст), по-често се среща при мъже и е налично предимно сърдечното засягане^{4,72}. Поради това пенетрантността се оценява като непълна и силно зависи от посочените фактори – географски и етнически произход, както и наличие на фамилна история⁴⁸. Вероятно съществуването на безсимптомни носители на патологични варианти в *TTR* гена и понякога късната изява на заболяването са причината някои случаи да бъдат оценявани като спорадични.

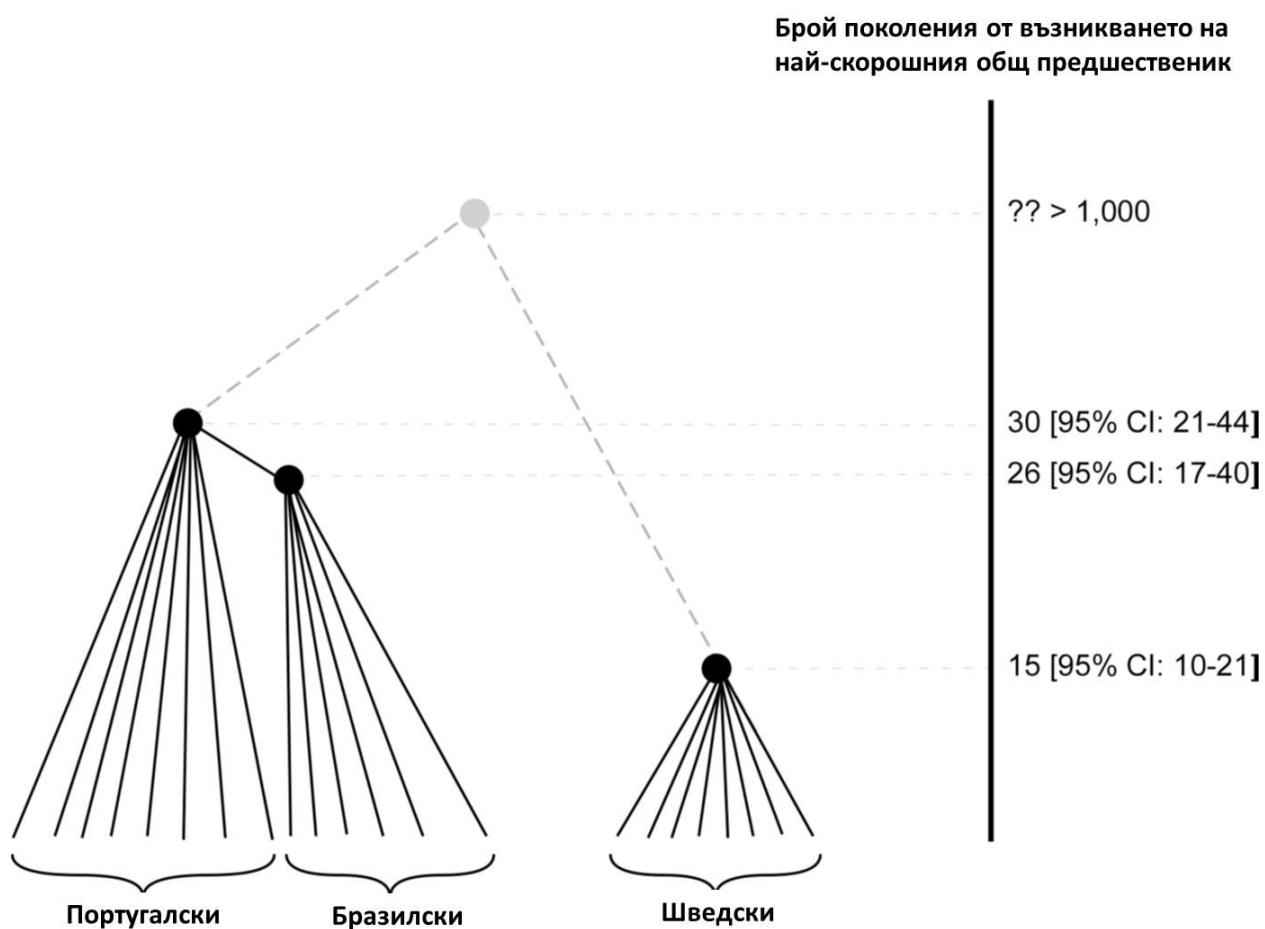
Хетерогенността в клиничната изява се дължи от части на наличната генотип-фенотипна корелация по отношение на патологичния вариант в *TTR* гена. Известните до момента над 130 генетични дефекти, свързани с транстиретинова амилоидоза обуславят клиничен спектър, който обхваща от ясно неврологично засягане с полиневропатен синдром до предимно сърдечно засягане с развитие на тежка кардиомиопатия, където неврологичните симптоми са по-леки или почти липсват (Фигура 9). Пример за генетичен вариант с предимно сърдечно засягане е честият за африканския регион Val122Ile, който се смята за една от най-честите генетични причини за развитие на сърдечна недостатъчност в популацията^{73(p122)}.



Фигура 9. Спектър на фенотипната изява на наследствена транстиретинова амилоидоза при различни *TTR* патологични варианти⁷⁵.

Провеждани са редица популационно-генетични проучвания в различните ендемични региони, където се среща вариантът Val30Met, целящи доказване на ефект на родоначалника за този генетичен дефект и определяне на възрастта на вероятния общ предшественик. Тези проучвания се базират на търсене на общ за пациентите хаплотип от алели на генетични маркери в близост до *TTR* гена, спрямо който може косвено да се съди за степента на родството между Val30Met пациентите от изследваната популация, както и за броя поколения, които се преминали от възникването на генетичния дефект. Според хаплотипно проучване на португалски, бразилски и шведски Val30Met носители, съществува близък общ предшественик между португалските и бразилските пациенти (Фигура 10). За разлика от тях, шведските пациенти са носители на различен хаплотип, който предполага независимо или много отдалечено във времето възникване на дефекта при хипотетичен общ прародител⁷⁶. Интересен е фактът, че се наблюдават разлики в клиничните характеристики на болестта в зависимост от хаплотипа (произхода) на пациента. Например португалските пациенти обикновено показват много по-ранно начало

на изява на клиничната симптоматика в сравнение с шведските Val30Met носители^{48,77}. В други изследвания се доказва различен хаплотип за италианските пациенти⁷⁸. Японските носители също имат общ предшественик, който вероятно има общ произход с португалския хаплотип, но не и с шведския⁷⁹. Популационно-генетичното характеризирание на генетичните дефекти, асоциирани с наследствена транстиретинова амилоидоза и изследването на между-популационните генетични различия при пациентите с един и същ патологичен *TTR* вариант спомага за разкриването на все повече фактори, които биха повлияли на клиничната изява на болестта⁸⁰.

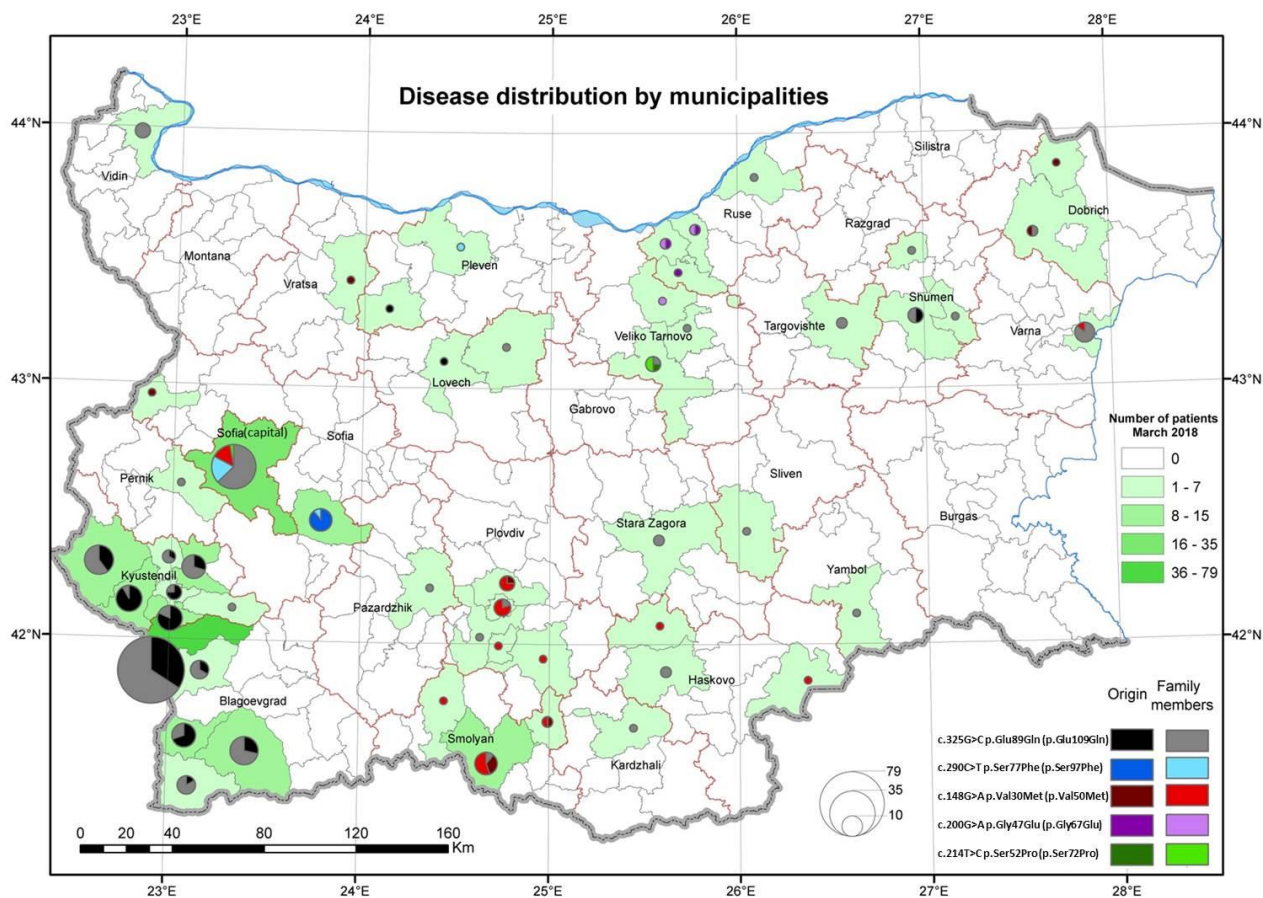


Фигура 10. Схема на трите различни линии на произход при пациентите с Val30Met от Португалия, Бразилия и Швеция. CI – доверителен интервал (*confidence interval*)⁷⁶.

Наблюдаваната фенотипна хетерогенност при пациентите с наследствена транстиретинова амилоидоза и тясната ѝ връзка с епидемиологията и географското разпространение на заболяването предполагат наличието на допълнителни генетични и епигенетични фактори, модифициращи прогресията на болестта. Необходими са още

проучвания в тази посока, за да бъдат изяснени тези механизми, което би спомогнало за по-успешната диагностика и за провеждането на по-качествено генетично консултиране.

1.3.2. Епидемиология, генетична и фенотипна вариабилност на наследствената транстретинова амилоидоза в България



Фигура 11. Карта на разпространението на *TTR* патологичните варианти в България⁸¹.

България е една от страните, за които е характерна висока честота на наследствената транстретинова амилоидоза със средна честота на генетично носителство $1 / 54\,500$ и средно разпространение на заболяването $1 / 28\,700$ ¹⁶. Генетичната вариабилност силно се различава от тази в останалите европейски държави, като от 2008 година до момента в България са открити 5 патологични генетични варианта в *TTR* гена, чиито номенклатурни названия и честота сред пациентите са описани в Таблица 1^{82,83}.

Таблица 1. Честота на различните патологични варианти в *TTR* гена сред пациентите с транстиретинова амилоидоза в България

<i>TTR</i> патологичен вариант (NM_000371.3, GRCh37)	Брой носители в България	Честота сред пациентите
c.325G>C, p.Glu109Gln (Glu89Gln)	267	78.53%
c.148G>A, p.Val50Met, (Val30Met)	35	10.29%
c.290C>T, p.Ser97Phe (Ser77Phe)	28	8.24%
Двоен хетерозиготен носител c.148G>A, p.Val50Met, (Val30Met) + c.325G>C; p.Glu109Gln (Glu89Gln)	1	0.29%
c.200G>A; p.Gly67Glu (Gly47Glu)	7	2.06%
c.214T>C, p.Ser72Pro (Ser52Pro)	2	0.59%
Общ брой носители	340	

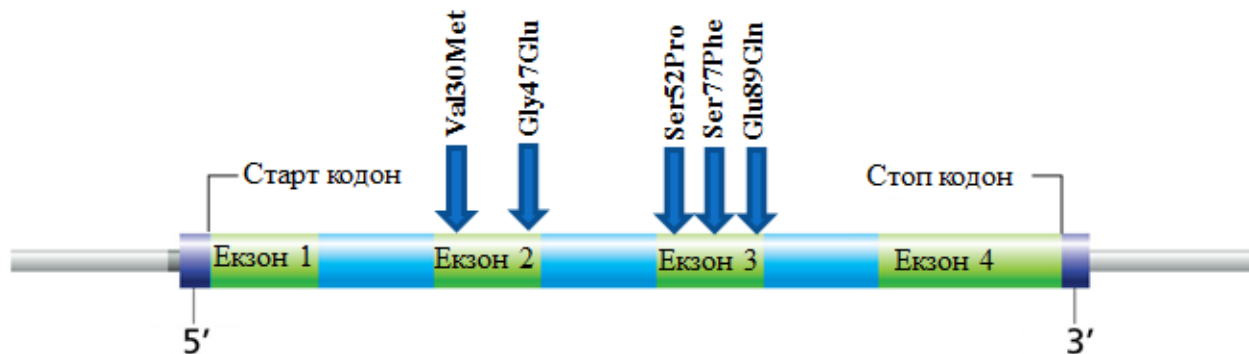
Най-честият *TTR* патологичен вариант в България е c.325G>C, p.Glu109Gln, който на кратко е наричан Glu89Gln. За този вариант съществува голям ендемичен регион в югозападната част на България, областите Благоевград и Кюстендил (Фигура 11). Там честотата на новопоявилите се случаи възлиза на 1 / 7 636, докато честотата на разпространение на болестта е 1 / 4 150⁸⁴. Въпреки наличието на характерно географско огнище, Glu89Gln може да се срещне и при пациенти от други райони на страната поради налични миграционни процеси⁸⁵. Glu89Gln се среща също с висока честота в Италия, където клиничната картина до голяма степен е сходна с тази в България⁸⁶. За този вариант в България е характерен смесен фенотип, включващ засягане на периферната нервна система, сърцето и гастроинтестиналния тракт. Средната възраст на начало на заболяването е между 50 и 60 годишна възраст без значителни разлики при двата пола, но са известни случаи с много рано (35 години) и много късно (71 години) начало⁸³⁻⁸⁵. Симптомите могат да включват двустранен карпал тунел синдром, сетивна и моторна периферна невропатия, автономна невропатия със засягане на гастроинтестиналния тракт и еректилна дисфункция, рестриктивна кардиомиопатия^{84,87}. Най-честите първоначални симптоми се свързват със засягане на периферната нервна система и развитие на полиневропатен синдром. Въпреки това, съществуват случаи на първоначално тежко сърдечно засягане или първоначално засягане на гастроинтестиналната система. В редки случаи болестта презентира с едновременно засягане на всички споменати системи^{19,83}.

Вторият по честота *TTR* генетичен вариант сред пациентите с наследствена транстиретинова амилоидоза в България е известният Val30Met. За него също е характерен известен фокус на разпространение в област Смолян, но като цяло географското разпространение на Val30Met в България е разпръснато и от части се припокрива с региона на Glu89Gln¹⁶. Доказателство за това е наличието на двоен хетерозиготен пациент, носител на двата патологични варианта. За област Смолян честотата на носителство се определя на 1 / 9 000, а разпространението на заболяването е 1 / 3 200¹⁶. При голяма част от пациентите с Val30Met липсва позитивна фамилна анамнеза за болестта, което до голяма степен се дължи на сравнително късното начало на заболяването (средно 64 години, диапазон 55-76) и по-лекия фенотип в сравнение с другите генетични варианти. Поради това много от тези случаи се съобщават като спорадични. Повечето пациенти показват наличие на аксонна сетивна и двигателна полиневропатия, левокамерна и предсърдна хипертрофия^{19,83,84}.

При около 8% от българските пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза се открива варианта Ser77Phe. Той е изключително характерен за региона на Вакарел, Софийска област, където честотата на носителство е изчислена на 1 / 1 600, а разпространението на заболяването е 1 / 850¹⁶. Клиничният фенотип е смесен, с късно начало (средно 57 години) и подобно на Glu89Gln включва засягане предимно на периферните нерви и сърцето, в късен стадий и гастроинтестинални нарушения^{84,86}.

При две семейства от Ромски произход беше открит варианта Gly47Glu. Клиничната симптоматика прогресира изключително бързо с много ранно начало (средно 28.5 години) и включва едновременно засягане на периферната и автономната нервни системи, сърцето, храносмилателната система, както в някои случаи и бъбреците. И двете семейства са с произход от североизточна България, област Русе. Отчетено е по-ранно начало на заболяването при следващите поколения носители на Gly47Glu, което имитира наличието на генетична антисипация^{83,84}. Вероятно наличието на комбинация от генетични и епигенетични фактори биха обяснили това явление⁸⁸.

Вариантът Ser52Pro е открит до момента само в едно семейство от град Велико Търново с двама засегнати пациента. Фенотипът отново е смесен, но с по-ранно начало на изява (45 години) и сравнително бърза прогресия^{83,84}.



Фигура 12. Относителна локализация спрямо *TTR* гена на откритите в български пациенти патологични амилоидогенни варианти.

Описаните до момента патологични варианти при пациентите с наследствена транстиретинова амилоидоза в България се локализират в екзон 2 и екзон 3 на *TTR* гена, които се оформят като своеобразна гореща точка за *TTR* патологични варианти в България (Фигура 12). Поради това е предложен алгоритъм за генетично тестване при пациенти със съмнение за транстиретинова амилоидоза в България, който включва първоначално секвениране на екзони 2 и 3 за търсене на чести изменения. Целият ген се изследва най-често при пациенти със съмнение за див тип транстиретинова амилоидоза, поради необходимостта от отхвърляне на наследствената форма на заболяването.

1.4. Обобщение

ATTRv е тежко мултисистемно генетично заболяване, което се среща със сравнително висока честота в България. Наличието на ендемичност, както и специфичната за страната генетична и клинична хетерогенност при пациентите с това заболяване са предпоставка за провеждане на популационно-генетични и молекулярно-биологични проучвания с цел разкриване на потенциални фактори за наблюдаваните разлики във фенотипната изявата на ATTRv. Изучаването на българската ATTRv популация би допринесло за натрупването на повече данни относно механизмите на патогенеза и определянето на допълнителни молекулни процеси с ефект върху хода на заболяването.

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

2.1. Цели

- Изследване на генетичната хетерогенност, ефекта на генетични фактори и генната експресия върху фенотипната хетерогенност при пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза в България.
- Оценка на ефекта на родоначалника по отношение на най-честите патологични варианти в *TTR* гена.

2.2. Задачи

- Търсене на патологични варианти в *TTR* гена за пълно генетично профилиране на наследствената транстиретинова амилоидоза в България.
- Неонатален скрининг за носителство на патологичния *TTR* вариант Gly47Glu сред новородени от Ромски произход.
- Изследване на асоциацията между генетични полиморфизми с вероятна регулаторна функция и разликите във възрастта на начало на заболяването и системното засягане при носители на патологичния *TTR* вариант Glu89Gln.
- Изследване на експресионния профил на *TTR* гена при носители на патологичния *TTR* вариант Glu89Gln.
- Изследване на генетични маркери в близост до *TTR* гена за търсене на общ хаплотип при носителите на един и същ патологичен вариант.
- Теоретично определяне на възрастта на най-скорошния общ предшественик при носителите на един и същ патологичен вариант в *TTR* гена.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Клиничен и биологичен материал

В настоящия дисертационен труд бяха изследвани общо 586 проби, чието разпределение спрямо етапа на проучването е описано в Таблица 2.

Таблица 2. Обобщение на изследваните проби по етапи.

	Етап на изследването	Брой изследвани проби
1.	Скрининг за търсене на патологични варианти в <i>TTR</i> гена	
	Скрининг при предполагаеми нови пациенти - венозна кръв	59
	Скрининг при роднини на доказани <i>ATTRv</i> пациенти - венозна кръв	23
	Скрининг при предполагаеми пациенти, отрицателни за патологични варианти в екзони 2 и 3 на <i>TTR</i> гена - тотална ДНК от венозна кръв	56
	Неонатален скрининг за определяне честотата на носителство на <i>TTR</i> варианта Gly47Glu сред Роми – филтърни бланки	100
2.	Анализ на регулаторни генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на заболяването - тотална ДНК от венозна кръв на Glu89Gln <i>ATTRv</i> пациенти.	124
3.	Експресионен анализ на <i>TTR</i> гена - тотална РНК изолирана от урина и/или кръвна плазма на Glu89Gln <i>ATTRv</i> пациенти.	19
4.	Хаплотипен анализ за определяне ефект на родоначалника (<i>ATTRv</i> пациенти, здрави роднини и контроли) - тотална ДНК от венозна кръв.	205
Общ брой изследвани проби		586

3.2. Скрининг за търсене на патологични варианти в *TTR* гена

3.2.1. Скрининг при пациенти

Бяха изследвани 59 пациента с предполагаема клинична диагноза транстиретинова амилоидоза. Пациентите бяха насочени за генетичен анализ от специалистите в експертните референтни центрове по транстиретинова амилоидоза в УМБАЛ "Александровска" и УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, град София. ДНК беше изолирана от венозна кръв по стандартен солеви метод (т.3.2.2). След това ДНК пробите бяха изследвани чрез директно секвениране по Sanger (т.3.2.3) за търсене на амилоидогенни мутации в *TTR* гена. Беше използван системен подход за генетично тестване, базиран на предварителните данни за наличието на мутационен горещ регион (*TTR* екзони 2 и 3). Това включва първоначално секвениране на екзони 2 и 3, с последващо секвениране на останалите екзони 1 и 4 на *TTR* гена, при наличие на убедителни клинични показания за АТТТ и отрицателен първичен резултат. За изследване на достоверността на изборния системен подход бяха избрани и 56 ДНК проби на предполагаеми АТТТv пациенти от ДНК банката на Генетична Медико-диагностична Лаборатория Геника, град София, които показват първоначален отрицателен резултат от секвенирането на екзоните от горещия *TTR* регион, с цел търсене на нови варианти извън него. В семействата на новооткритите позитивни АТТТv пациенти беше проведен скрининг за носителство на фамилния *TTR* патологичен вариант, при което целево бяха анализирани кръвни проби на 23 роднини. Всички проби бяха анализирани след подписване на информирано съгласие за извършване на генетично изследване.

3.2.1.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от периферна кръв по солеви метод

Този метод включва разрушаване на еритроцитите, утаяване на ядрените кръвни клетки и последващото им разрушаване. Изполването на белтъците е следващата стъпка, с последна стъпка на утаяване на тотална ДНК.

Използваният материал е 3-6 мл венозна кръв в епруветка с антикоагулант ЕДТА. Взетата кръв се излива в стерилна пластмасова епруветка от 50 ml, като към нея се добавя

30 ml студен лизиращ буфер (pH=7.4, NH₄Cl – 155mM, KHCO₃ - 10mM, Na₂EDTA – 0.1mM). Епруветката се разклаща добре и се инкубира на 4°C за 30 мин. След това се центрофугира за 15 мин. при 3000 rpm. Супернатантата се отлива и се изхвърля. Към получената след центрофугиране утайка, се добавя 10 ml студен лизиращ буфер и отново се разбърква добре. Следва центрофугиране при същите условия и надстоящата течност отново се отлива. Получената утайка съдържа ядрени клетки, към които се добавя 7,5 ml SE (нуклеолизиращ) буфер (pH=8.0, NaCl – 75mM, Na₂EDTA – 25 mM). Освен това се прибавят и 50 µl протеиназа К (10mg/ml) и 400 µl 10% натриев додецил сулфат (SDS). Вортексира се добре и се инкубира на 37°C за цяла нощ. Следващата стъпка е изсолване на белтъците. Добавя се 2 ml преситен 6M натриев хлорид и се вортексира добре. След това се центрофугира за 15 мин на 3000 rpm при стайна температура. В резултат на центрофугирането белтъците се утаяват на дъното. След това идва стъпката за преципитация на ДНК. Супернатантата, получена в резултат на предходното центрофугиране, се отлива внимателно отново в стерилна пластмасова епруветка от 50 ml, като към нея се добавят 2 обема леден абсолютен етанол. ДНК преципитира и изплува на повърхността. След това тя се събира със стерилен накрайник за пипета и се промива в 70% етанол. Изсушава се на въздух и се разтваря в TE-буфер (pH=7.4, TRIS/HCl (pH=7.4) – 10mM, EDTA (pH=8.0) – 1mM). Използваната апаратура включва центрофуга Hermle, Germany, центрофуга miniSpin Eppendorf, вортекс Heidolph Reax Top, термостат Memmert, Germany.

3.2.1.2. Секвениране по Sanger

Патологичните амилоидогенни варианти в *TTR* гена са най-често единични нуклеотидни замени (SNP) или малки делеции / дупликации, които много лесно и бързо се детектират чрез използване на метода на Sanger за директно секвениране.

Процедурата включва следните стъпки:

- Намножаване чрез полимеразна верижна реакция (*polymerase chain reaction, PCR*) на целевия ДНК фрагмент
- Ензимно пречистване на намножения продукт
- Провеждане на секвенционна реакция
- Пречистване с леден етанол / EDTA на секвенираните фрагменти

- Електрофоретично разделяне на секвенираните фрагменти
- Визуализация и анализ на резултатите

Първоначално четирите екзона на *TTR* гена се размножават по отделно чрез полимеразна верижна реакция, използвайки специфични праймери (Таблица 3) и оптимизиран PCR протокол, показан на Таблица 4 и 5 .

Таблица 3. Праймери, използвани за размножаване на *TTR* гена.

<i>TTR</i> екзон	Праймери
Екзон 1	F: CAGCAGGTTTGCAGTCAGATT R: CCAGCTCAGTAAGCTCAGTGGAA
Екзон 2	F: CCTGATAATGGGATCAGTGTGTAA R: CCTCTGCCTACGTTTTTCAAT
Екзон 3	F: GGGGAAATGTTTCATAACATGTTT R: GGGAACSTTTGGTCATTCAT
Екзон 4	F: GGACTTCCGGTGGTCAGTCAT R: GCCTGGACTTCTAACATAGCATA

Таблица 4. Реактиви за провеждане на полимеразна верижна реакция на екзоните на *TTR* гена.

Компонент на реакционната смес	Крайна концентрация	Обем (µl)
Високомолекулна ДНК	-	2
Праймер F (10 mM)	0.4 pmol/µl	1
Праймер R (10 mM)	0.4 pmol/µl	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM), (GENET BIO, Chungnam, Korea)	5 pmol/µl	2
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	1x	2.5
Термостабилна полимераза Prime Taq 250U, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.05 U	0.1
Дестилирана вода	-	16.4
Общ обем на реакцията:		25

Таблица 5. Програма за провеждане на полимеразна верижна реакция на екзоните на *TTR* гена.

Етап	Температура	Продължителност	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 мин	1
Денатурация	94°C	30 сек	
Хибридизация на праймерите	60°C	30 сек	30
Синтез на нова верига	72°C	40 сек	
Краен синтез	72°C	5 мин	1
Съхранение	4°C	-	-

Намножените фрагменти от *TTR* гена се подлагат на ензимно пречистване с PureIT ExoZAP (Genaxxon) преди провеждането на секвенционната реакция. Ензимната реакция се провежда в епруветка тип Eppendorf от 0.2 ml, където се смесват 2 µl амплификационен продукт и 0.5 µl ExoZAP. Инкубира се на 37°C за 30 мин, след което реакцията се спира чрез температурно инактивиране на ензимите на 80°C за 15 мин.

За провеждане на секвенционната реакция се използва кит за секвениране BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Към пречистената матрица се добавят 0.1 µl 10 mM праймер, 2 µl 5x секвенционен буфер, 0.5 µl BigDye Terminator v.3.1 и двойно дестилирана вода до краен обем 10 µl.

Програмата за провеждане на секвенционната реакция включва:

- Първоначална денатурация – 96°C за 20 сек;

Повторение 25 пъти на цикъл от следните стъпки:

- Денатурация – 96°C за 10 сек
- Хибридизиране на праймера – 50°C за 5 сек
- Синтез на верига – 60°C за 4 мин

Секвенираните ампликони се преутаяват с 80 µl абсолютен леден етанол и 0.4µl 250 mM EDTA. След това утайките се промиват с 80 µl 80% леден етанол, изсушават се на стайна температура и се разтварят в 20 µl Hi-Di формамид (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Анализа на секвенциите се провежда с автоматичен секвенатор тип капилярна електрофореза ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) и се визуализират с програмата Sequencing Analysis v.5.1.1.

3.2.2. Неонатален скрининг за определяне честотата на носителство на *TTR* варианта Gly47Glu сред Роми

Тъй като вариантът Gly47Glu до момента на настоящото изследване се открива само при две семейства от Ромски произход в сравнително близки региони на Северна България, беше изказана хипотеза за наличие на ендемичен регион за този дефект сред ромското население там. За тестване на тази хипотеза беше проведен генетичен скрининг върху филтърни бланки на новородени от ромски произход от региона на градовете Полски Тръмбеш и Русе. Бяха предоставени 100 филтърни бланки за анализ от

Национална Генетична Лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом“, град София. ДНК беше изолирана чрез използване на кит за изолиране на ДНК от филтърни бланки *Dried Blood Spot DNA Isolation Kit, Norgen Biotek*. Така подобрите и изолирани ДНК проби бяха използвани за амплифициране и директно секвениране на екзон 2 на *TTR* гена за търсене на варианта Gly47Glu по описаната в т.3.2.1.2 методология.

3.3. Анализ на регулаторни генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на заболяването

3.3.1. ДНК проби

За анализ на корелацията между носителството на потенциални регулаторни полиморфизми и клиничната изява на наследствената транстиретинова амилоидоза бяха подобрани 124 ДНК проби на пациенти, които са доказани носители на *TTR* патологичния вариант Glu89Gln от ДНК банката на Генетична Медико-Диагностична Лаборатория Геника, град София. Данни за възрастта на начало на заболяването и първоначалното системно засягане на всички изследвани пациенти бяха предоставени от референтния център по транстиретинова амилоидоза в УМБАЛ "Александровска", гр. София.

3.3.2. Генотипизиране на единични нуклеотидни полиморфизми

На базата на литературни данни^{54,89} бяха подобрани единични нуклеотидни полиморфизми в региона на *TTR* гена с потенциална регулаторна функция, за които бяха генотипизирани избраните Glu89Gln ДНК проби (Таблица 6). За целта беше проведено намножаване чрез полимеразна верижна реакция на регионите върху 18-та хромозома, в които попадат целевите единични нуклеотидни полиморфизми. Така намножените фрагменти бяха секвенирани чрез метода за директно секвениране на Sanger (т.3.2.1.2).

Таблица 6. Единични нуклеотидни полиморфизми подобрани за анализ в избраната Glu89Gln кохорта. NA – неприложим показател.

dbSNP ID	Геномна локализация Chr18 (GRCh38/hg38)	Локализация TTR NM_000371.4	Прогнозен ефект (Predict SNP / Ensembl VEP)
rs875119	g.31587128T>C	NA	<i>upstream</i> неутрален генетичен вариант, модификатор
rs3764478	g.31590520G>T	NA	<i>upstream</i> неутрален генетичен вариант, модификатор

rs1800458	g.31592902G>A	c.76G>A, p.Gly26Ser	<i>missense</i> неутрален генетичен вариант, модификатор
rs72922947	g.31593821G>A	c.200+795G>A	интронен неутрален генетичен вариант, модификатор
rs7235277	g.31596910G>C	c.336+1655G>C	интронен неутрален генетичен вариант, модификатор
rs62093482	g.31598936C>T	c.*261C>T	3'UTR неутрален генетичен вариант, модификатор
rs1791228	g.31599077C>T	NA	<i>downstream</i> неутрален генетичен вариант, модификатор
rs4799586	g.31612973T>C	NA	междугенен неутрален генетичен вариант, модификатор
rs1667245	g.31588155C>G	NA	<i>upstream</i> неутрален генетичен вариант, модификатор
rs76184052	g.31588452T>C	NA	<i>upstream</i> неутрален генетичен вариант, модификатор
rs35197841	g.31588262_31588264delTAG	NA	<i>upstream</i> неутрален генетичен вариант, модификатор
rs1080093	g.31593717C>G	c.200+691C>G	интронен неутрален генетичен вариант, модификатор
rs723744	g.31592513G>T	c.70-383G>T	интронен неутрален генетичен вариант, модификатор

3.3.3. Статистически анализ за корелация

След определяне на алелните честоти на изследваните полиморфизми беше проведен Хи-квадрат тест на Пийрсън чрез използване на софтуер за анализ *IBM SPSS Statistics 26* за проверка на корелацията с възрастта на начало на заболяването и първоначалното системно засягане при изследваните пациенти.

3.4. Експресионен анализ на *TTR* гена

3.4.1. Пациенти и проби

За анализ на експресионния профил на транстиретина (мутантен срещу див тип алел) бяха избрани 19 АТТRv пациента с хетерозиготно носителство на *TTR* варианта Glu89Gln. Тези пациенти бяха избрани на базата на налични вътрефамилни разлики във възрастта на начало на заболяването. За изследване на динамиката на експресионния профил на транстиретина бяха взети проби на някои подбрани пациенти по два пъти в

рамките на една година. Всяка проба беше обработена и изследвана в повторение. За контрола на използваната методология беше използвана проба от свеж биопсичен материал от черен дроб на здрав човек (без данни за транстиретинова амилоидоза).

3.4.2. РНК секвениране на *TTR* гена

3.4.2.1. Изолиране на РНК

Тотална РНК беше изолирана от трите вида проби (кръвна плазма, урина и черен дроб) чрез използване на реагента TRIzol™ (Invitrogen, US).

Кръвните проби бяха взети във вакутейнери, съдържащи EDTA и бяха центрофугирани за 10 мин. / 3000 rpm / 4°C за отделяне на плазмата. След това отделената плазма беше допълнително центрофугирана за 10 мин. / 13000 rpm / 4°C и супернатантата беше внимателно отстранена, а получената утайка, съдържаща плазмените левкоцити беше използвана за изолиране на РНК с TRIzol.

За съхранение и транспортиране на пробите от урина беше добавяна 2 ml 0.5M EDTA с рН 8. Така стабилизирани проби от урина бяха центрофугирани за 10 мин / 3000 rpm / 4°C. Утайката беше разтворена в 1 ml PBS (Phosphate-buffered saline) буфер и отново центрофугирана за 1 мин. / 3200 rpm / 4°C и супернатантата беше отстранена преди стартиране на протокола за изолиране на РНК с TRIzol.

Чернодробният биопсичен материал беше хомогенизиран ръчно преди стартиране на протокола за изолиране на РНК с TRIzol.

Протокол за изолиране на РНК с TRIzol:

- Към утайката от клетки се добавя 1ml TRIzol и се инкубира 5 мин. на стайна температура.
- Към пробите се добавя 200 µl хлороформ на 1 ml TRIzol. Миксира се чрез вортекс за 15 сек. Пробите се инкубират на стайна температура за 10 мин. Следва центрофугиране за 15 мин / 13 000 rpm. След центрофугирането РНК молекулите се отделят в горната водна фаза, която трябва внимателно да се прехвърли в нова 1.5 ml епруветка. Добавят се 2 µl гликоген за стабилизиране на РНК, вортексира се и се инкубира за 2 мин на стайна температура.

- Преутаяване на РНК – добавя се 500µl изопропанол на 1 ml TRIzol, размесва се чрез вортекс за 10 сек. Пробата се инкубира за 10 мин на стайна температура и се центрофугира за 10 мин / 13 000 rpm. Супернатантата се отстранява чрез пипетиране с връхчета за пипета с филтър.
- Промиване на РНК – утайката от РНК се промива два пъти със 70% етанол (1 ml етанол на 1 ml TRIzol), пробите се вортексират и центрофугират на 8 700 rpm / 5 мин / от 2 до 8°C.
- Утайката от РНК се изсушава на стайна температура от етанола и се разтваря в 20µl DEPC-третирана вода.

3.4.2.2. Обратна транскрипция

След изолиране на тотална РНК от пробите беше проведена реакция на обратна транскрипция за получаване на кДНК (копи ДНК) чрез използване на кит RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). За целта бяха използвани 5µl от предварително изолираната РНК от всяка проба. Програмата за провеждане на обратна транскрипция включваше следните етапи на инкубация: 25°C за 10 мин, 42°C за 15 мин, 48°C за 15 мин и 85°C за 5 мин. Получените кДНК матрици бяха съхранявани при -20°C преди последващите анализи. За проверка на реакцията на обратна транскрипция беше проведена контролна полимеразна верижна реакция върху *house-keeping* гена B2M (бета 2 микроглобулин) с условия на провеждане: 95°C за 10 мин., следвани от 35 цикъла, включващи 95°C за 30сек. и 60°C за 75 сек., с краен синтез от 72°C за 5 мин. Програмата завършва с етап на крайна амплификация от 5 мин. на 72°C. Проведените контролни реакции бяха тествани и визуализирани чрез електрофореза върху 3% агарозен гел.

3.4.2.3. Намножаване и секвениране на транскриптите на транстиретиновия транскрипт

За изследване на *TTR* транскрипта бяха дизайнирани кДНК специфични праймери, които комплементират с краищата на съседни *TTR* екзони:

- правият F праймер съвпада със сплайсинг мястото между екзони 1 и 2 (TTR-1/2F-5'- GGCCCTACGGGCACCGGTGAA-3');

- обратният R праймер комплементира с мястото на сплайсинг между екзони 3 и 4 (TTR-3/4R-5'- GCTGTGAATACCACCTCTGCAT-3').

Чрез този подход за дизайн на праймери беше избегнато намножаването на неспецифични фрагменти, резултат от остатъчна геномна ДНК в пробата. Вариантът Glu89Gln се локализира в екзон 3, попадайки в амплифицирания кДНК фрагмент. За целта беше използван PCR протокол, показан на Таблица 7 и 8, след което кДНК фрагментите на *TTR* транскрипта бяха тествани и визуализирани чрез 3% агарозна гел електрофореза и изследвани чрез директно секвениране по Sanger (т.3.2.1.2).

Таблица 7. Реактиви за провеждане на полимеразна верижна реакция на транстиретиновия транскрипт.

Компонент на реакционната смес	Крайна концентрация	Обем (µl)
кДНК	-	2
Праймер F (10 mM)	0,5 pmol/µl	0.5
Праймер R (10 mM)	0,5 pmol/µl	0.5
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM), (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0.8 pmol/µl	0.8
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	1x	1
Термостабилна полимераза Prime Taq 250U, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0,025 U	0,05
Дестилирана вода без ДНКази и РНКази	-	5,15
Общ обем на реакцията:		10

Таблица 8. Програма за провеждане на полимеразна верижна реакция на транстиретиновия транскрипт.

Етап	Температура	Продължителност	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 мин	1
Денатурация	94°C	30 сек	40
Хибридизация на праймерите	58-62°C	45 сек	
Синтез на нова верига	72°C	45 сек	1
Краен синтез	72°C	5 мин	
Съхранение	4°C	-	-

3.4.3. Количествено определяне на алел-специфичната експресия на транстиретина

3.4.3.1. Дизайн на експеримента

За количествен анализ на алел-специфичната генна експресия в изследваните проби бяха използвани допълнителни праймери за провеждане на полимеразна верижна реакция. Бяха конструирани нови обратни праймери, които комплементират алел-специфично с екзон 3 на *TTR* гена. Използваните праймери са както следва:

- Прав праймер (6-FAM-белязан): 5'- GGCCCTACGGGCACCGGTGAA – 3', праймерът съвпада със секвенцията на правия праймер от предходната реакция, но е флуоресцентно белязан за провеждане на фрагментен анализ;
- Обратен праймер (без несъответствия с нормалната секвенция за намножаване на нормалния алел): 5'- GCTGTGAATACCACCTCTGCATGCTC– 3';
- Обратен праймер (с едно несъответствие за намножаване на алела с.325G>C (Glu89Gln)): 5'- GCTGTGAATACCACCTCTGCATGCTG– 3'.

За матрица за провеждане на алел-специфична полимеразна верижна реакция бяха използвани 1:100 разредени ампликони от предходния етап и PCR програма, състояща се само от 10 цикъла, за да може да се проследи експоненциалната фаза на намножаване. След това получените фрагменти бяха подложени на фрагментен анализ на автоматичен секвенатор тип капилярна електрофореза ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) и анализирани със софтуер за фрагментен анализ GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Площта на получените пикове беше използвана за относителен количествен анализ и сравнение между двата алелни типа транскрипт (мутантен и див тип) от всяка анализирана проба.

3.4.3.2. Фрагментен анализ

За визуализиране на кДНК фрагментите правият праймер, използван за PCR е белязан с флуоресцентно багрило 6-FAM (Таблица), което се детектира от лазера на апарата. Това багрило има абсорбционен максимум при 494 nm и емисионен максимум

при 518 nm. Получените резултати се обработват с програмата GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystem, Foster City, USA), чрез която се получават крайните данни за размерите на съответните микросателитни ДНК фрагменти.

Към 1 µl продукт от полимерзната верижна реакция се прибавят 20 µl Hi-Di формаид (Applied Biosystem, Foster City, USA) и 0.2 µl ROX500 Size Standard (Applied Biosystem, Foster City, USA). Молекулният вътрешен стандарт ROX500 Size Standard служи за оразмеряване на ДНК фрагменти с дължина между 35 и 500 базови двойки. Представлява смес от 16 ДНК фрагмента с известна дължина, белязани с флуоресцентно багрило ROX, което има абсорбционен максимум при 575 nm и емисионен максимум при 602 nm. Така приготвените проби се денатурират на 95°C в продължение на 5 мин и се охлаждат бързо на лед. Формаидът служи за подържане на ДНК фрагментите в едноверижно състояние след денатурацията и предотвратява хибридизацията на комплементарните ДНК вериги, което е от особена важност за детекцията и определянето на размера на фрагментите.

След подготовката пробите се накапват на специална плака и се поставят за разделяне и анализ в секвенатора. Следва стартиране на програмата за фрагментен анализ, при което се задават и съответните настройки (Таблица 9).

Таблица 9. Условия за провеждане на капилярна електрофореза

Module:	GS STR POP4 (1ml) D
Inj секс:	5
Inj kV:	15
Run kV:	15
Run T°C:	60
Run time:	26-29 мин

3.5. Хаплотипен анализ за определяне ефект на родоначалника

Хаплотипният анализ в настоящата работа е базиран на изследване на генетични маркери, до известна степен скачени с конкретния патологичен вариант в *TTR* гена. Спрямо тези маркери може да бъде проследена относителната степен на родство между пациентите, носители на един и същ генетичен дефект. Спрямо разпада на хаплотипа на

хипотетичния родоначалник би могло да се съди за броя поколения, които са изминали от внасянето на генетичния дефект в изследваната популация.

3.5.1. ДНК проби за извършване на хаплотипен анализ

Анализът беше проведен върху налични ДНК проби, изолирани от венозна кръв на български пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза, техни роднини, както и контролни ДНК проби, избрани от ДНК банката на Генетична Медико-Диагностична Лаборатория Геника, град София (Таблица 10). Бяха изследвани 8 големи семейства с доказано носителство на Glu89Gln варианта, за които няма данни за роднинска връзка помежду им. Въпреки това, всички те произлизат от ендемичния за този вариант регион в югозападна България. Изследвани са общо 36 Glu89Gln носители, които бяха със или без клинична симптоматика към момента на изследването. От семействата на тези носители бяха избрани 31 ДНК проби на здрави роднини, които имат негативен генетичен резултат за носителство на Glu89Gln варианта.

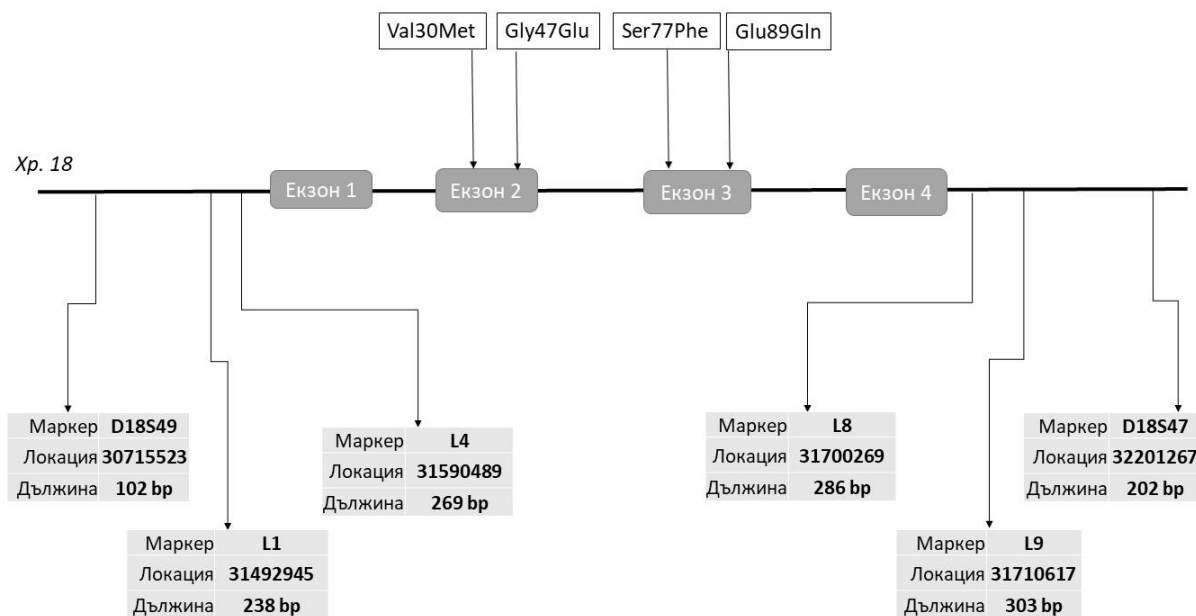
За останалите генетични варианти бяха включени всички доказани към момента на изследването семейства, като броят на носителите и на здравите роднини е представен обобщено в Таблица . Отново изборът и категоризацията на ДНК пробите се базираше на предварително извършеното генетично изследване на *TTR* гена. Контролна група от 40 ДНК проби на здрави хора без фамилна история за наследствена транстиретинова амилоидоза също бяха подбрани от ДНК банката на Генетична Медико-Диагностична Лаборатория Геника.

Таблица 10. ДНК проби избрани за хаплотипен анализ, разпределени според *TTR* генетичния статус.

<i>TTR</i> патогенен вариант	<i>Glu89Gln</i>	<i>Val30Met</i>	<i>Ser77Phe</i>	<i>Gly47Glu</i>
Носители (брой)	36	26	25	6
Нормални здрави роднини (брой)	31	15	18	8
Семейства (брой)	8	10	11	2

Вариантът Ser52Pro не беше включен в настоящото изследване поради наличието само на едно доказано семейство с двама засегнати пациента.

3.5.2. Микросателитен фрагментен анализ



Фигура 13. Геномна локализация на избраните микросателитни маркери (спрямо геномно асемблиране GRCh38/hg38). Относителното положение на изследваните патологични варианти в *TTR* гена също е отбелязано. Средна дължина в базови двойки - bp.

Бяха избрани 6 микросателитни (*STR* – *short tandem repeat*) маркера в близост до *TTR* гена (18q12) за изследване наличието на специфичен хаплотип при избраните семейства с наследствена транстиретинова амилоидоза (Фигура 13). Тези маркери бяха избрани на базата на публикувани предишни изследвания в други популации върху пациенти с Val30Met^{76,78}. Изборът на тези 6 маркера е базиран и на относителната им локализация спрямо патологичните варианти в *TTR* гена, поради факта че по-голямата отдалеченост би довела до по-висока честота на рекомбинация между локусите и по-бърз разпад на хипотетичния хаплотип (Таблица 11).

Избраните микросателитни маркери са намножени чрез полимеразна верижна реакция за последващ анализ на тяхната дължина. Използваните праймери и условията на провеждане на реакцията за показани на Таблицы 12, 13 и 14. Използваният апарат е конвенционален *PCR* апарат *T100 Thermal Cycler, BioRad*.

Таблица 11. Теоретична честота на рекомбинация между микросателитните маркери и Glu89Gln варианта.

<i>STR</i> маркер	Разстояние от Glu89Gln локуса [CM]	Честота на рекомбинация спрямо Glu89Gln локуса
D18S49	0.879721	0.0088
L1	0.102299	0.00102
L4	0.004755	0.00005
TTR Glu89Gln	NA*	NA*
L8	0.105025	0.00105
L9	0.115373	0.00115
D18S47	0.60273	0.00603

*NA= неприложимо

Таблица 12. Праймери, използвани за размножаване на избраните микросателитни маркери.

Маркер	Праймери
D18S49	F: 6FAM-TATTGTTAGGGTGTGCTCCTT R: GCTTCCTTCTGGAATATCTCC
L1	F: 6FAM-TGCAACGAAGCTTCAAGAGA R: 6FAM-AAGCAAATTGCAATGGGAAG
L4	F: 6FAM-TTCCTCCTGGCCGACTTATT R: TAGTGCTCCAAACCGGACTT
L8	F: 6FAM-AACCTGGGAGATAGAGCTTGC R: TCTCCTTAATCTAAGAAAGCCACAT
L9	F: 6FAM-GGCCGTCACAGGTCATAGAA R: CCACCAGAGGAAACCAACCT
D18S47	F: 6FAM-GAACATTTTGAACGTTAACAGCC R: AGGCAATCAAAATAAATGGCC

Таблица 13. Реактиви за провеждане на полимеразна верижна реакция на STR маркерите.

Компонент на реакционната смес	Крайна концентрация	Обем (µl)
Високомолекулна ДНК	-	1
Праймер F (10 mM) – 5' 6-FAM - белязан	0,4 pmol/µl	1
Праймер R (10 mM)	0,4 pmol/µl	1
Разтвор на дезоксинуклеотидтрифосфати, дНТФ (5mM), (GENET BIO, Chungnam, Korea)	5 pmol/µl	2
10x Prime Taq буфер (GENET BIO, Chungnam, Korea)	1x	2,5
Термостабилна полимераза Prime Taq 250U, (GENET BIO, Chungnam, Korea)	0,05 U	0,1
Дестилирана вода	-	17,4
Общ обем на реакцията:		25

Таблица 14. Условия за провеждане на полимеразна верижна реакция на STR маркерите.

Етап на програмата за полимеразна верижна реакция	Температура	Продължителност	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	5 мин	1
Денатурация	94°C	40 сек	
Хибридизация на праймерите	60°C	60 сек	25
Синтез на нова верига	72°C	60 сек	
Краен синтез	72°C	5 мин	1
Съхранение	4°C	-	-

За правилното оразмеряване на намножените ДНК фрагменти е проведен фрагментен анализ чрез използване автоматичен секвенатор тип капилярна електрофореза ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) по описаната в т.4.5.2 методология.

3.5.3. Реконструкция на хаплотипа

Проведена е теоретична реконструкция на хаплотиповете на изследваните индивиди чрез алгоритъма на Excoffier-Laval-Balding (ELB), разработен за реконструкция на хаплотипове от генотипни данни с неизвестна фаза, който е част от софтуерния пакет Arlequin v.3.01⁹⁰. Фазата е неизвестна когато не е ясно дали хаплотипът на целевия локус е идентичен с родителския хаплотип или е резултат от рекомбинация. Изследването е извършено на база на данните от проведения фрагментен анализ за алелите на шестте микросателитни маркера.

ELB алгоритъмът е итеративен метод, чрез който се реконструират хаплотипове от мултилокусни генотипни данни с неясна скаченост, каквито са и настоящите данни. Обновяване на скачеността се прави чрез „прозорец“ от съседни локуси, при което размерът на този „прозорец“ зависи от локалната степен на неравновесие в скачеността. Алгоритъмът работи чрез повтаряне (т.нар. итерации) на следните стъпки:

1. **Избор на индивид** – на случаен принцип сред всички индивиди.
2. **Избор на хетерозиготен локус** – на случаен принцип от тези локуси, които не са „посетени“ от последното изпълнение на стъпка 1.
3. **Избор и обновяване на прозорец** – избира един от двата текущи прозореца, асоциирани с избраните индивид и локус след провеждане на стъпки 1 и 2. Следва

опит за обновяване, при което последователно се предлага, след това се приема или отхвърля прибавянето и отпадането на локус от прозореца.

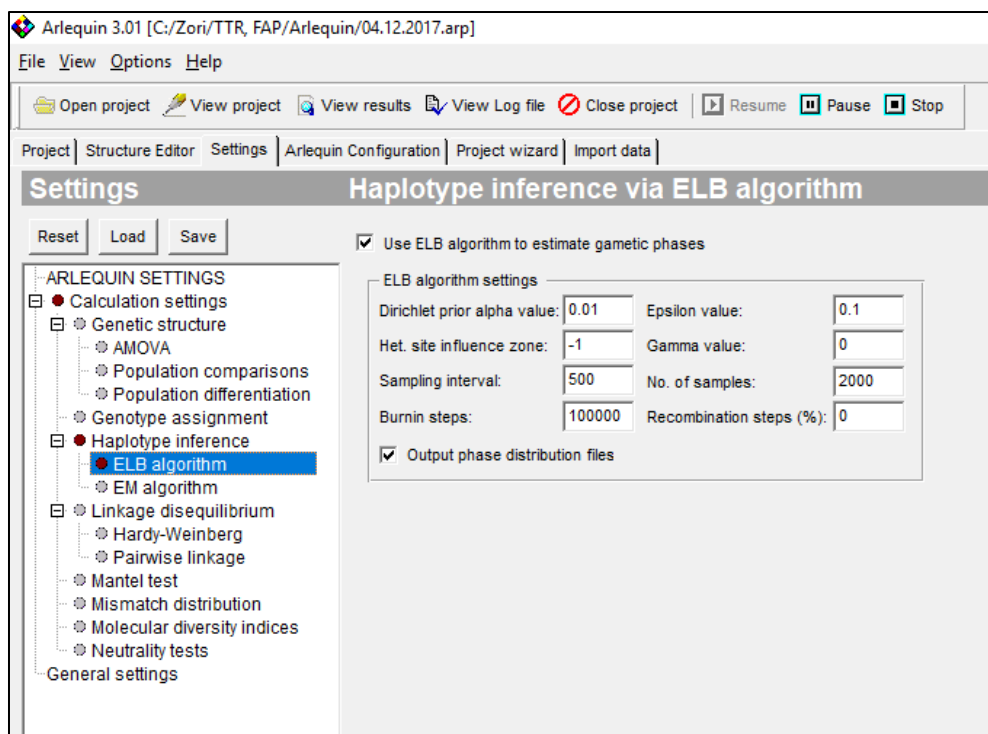
4. **Обновяване на скачеността** – базирано на досегашните хаплотипни изчисления и текущото разпределение на фазата на скачване в избрания в стъпка 3 прозорец.
5. **Повтаряне на стъпки от 2 до 4** – повтарят се докато не бъде „посетен“ всеки индивид и всеки негов хетерозиготен локус ^[18].

При стартиране на програмата Arlequin v.3.01 трябва да се зареди входящ файл (текстови файл с разширение „.agr“), който съдържа генотипните данни за алелите на микросателитните маркери на всеки индивид. След това се избира алгоритъм, който ще се изпълнява (в този случай - ELB алгоритъм) и се задават следните стойности на основните параметри:

- *Dirichlet alpha prior = 0.01*
- *Epsilon = 0.1*
- *Heterozygote site influence zone = -1*
- *Gamma = 0*

За останалите параметри се избират стойностите, зададени по подразбиране в програмата (Фигура 14)⁹⁰. Следва стартиране на изчислението. След завършване на работата на програмата резултатите с най-вероятните хаплотипове се запазват автоматично в избрана от оператора директория.

След реконструкцията на теоретичните хаплотипове, техните честоти, заедно с честотите на алелите на микросателитните маркери бяха анализирани и сравнени сред подгрупите от носители, здрави роднини и контроли за оценка на възможен ефект на родоначалника за всеки *TTR* патогенен вариант.



Фигура 14. Настройки на Arlequin v.3.01 за изпълнение на ELB алгоритъм

3.5.4. Статистическа оценка

Статистическата значимост на предложената хипотеза за съществуване на ефект на родоначалника при изследваните групи от пациенти беше изчислена на базата на наблюдаваните алелни честоти на микросателитните маркери в подгрупите на пациенти, здрави роднини и контроли. За целта беше използван Хи-квадрат тестът на Пиърсън⁹¹ имплементиран в софтуерния пакет *IBM SPSS Statistics 26*.

3.5.5. Определяне „възраст на мутацията“ – възрастта на най-скорошния общ предшественик

За изследване на разпада на хипотетичния хаплотип на родоначалника за всеки изследван патологичен *TTR* вариант и определяне на броя поколения, изминали от интродуцирането на конкретния генетичен вариант в изследваната популация беше използвана програмата *DMLE+ v.2.3*. Този софтуер изчислява Байесова вероятност (т.нар. обратна вероятност) чрез *MCMC (Markov chain Monte Carlo)* алгоритъм. Изчисленията се

базират на наблюдаваното неравновесие в скачеността между генетични маркери, изграждащи определен хаплотип, който търпи разпад в поколенията⁹².

Програмата DMLE+ v.2.3. позволява във входящия файл да бъдат въведени както генотипни, така и хаплотипни данни. В случая се използват резултатите от реконструирането на най-вероятните хаплотипове от микросателитните маркери, изчислени с ELB алгоритъма на програмата Arlequin v.3.01. Входящите данни се въвеждат в текстови файл, в който е необходимо да бъдат въведени и допълнителни параметри. Те участват в следната формула, зададена в алгоритъма, който се изпълнява:

$$f(\theta, Y, \tau, p | X, Z, \theta, \Omega, \Lambda) = f(X, Y_{-0} | \theta, \theta, \tau, p, Y_0) g(\tau | \Lambda) f(Y_0 | p) \times f(Z | p) f(\theta | \Omega) \pi(p) / f(X, Z | \theta, \Omega, \Lambda)^{[19]}$$
, където

- **X** е матрица от генотиповете (или хаплотиповете) на носителите на изследвания фенотип. В случая това са носителите на Glu89Gln в *TTR* гена.
- **Z** е матрица от генотиповете (или хаплотиповете) на случайно избрани (етнически еквивалентни) нормални индивиди. Това са данните от микросателитните маркери на контролната група.
- **p** е матрица от генните честоти на контролната група.
- **Y₀** е матрица от прародителските хаплотипове на носителите на мутацията.
- **Y₀** е прародителският хаплотип на индивида, при когото е възникнала мутацията.
- **θ** е позицията на мутацията спрямо първият изследван маркер. В случая това е D18S49 (Таблица 10).
- **Θ** е вектор от генетични параметри, като разстоянията между маркерните локуси спрямо първия маркер.
- **Λ** е вектор от демографските данни, като скорост на нарастване на популацията, честота на мутацията в популацията и т.н. В случая скоростта на нарастване на популацията е 0.005, а пропорцията на изследваните проби спрямо размера на популацията е 0.002.
- **τ** е генеалогичното дърво, което стои зад хаплотипните данни на носителите на мутацията.
- **Ω** е предварителната информация относно позицията на мутацията, налична в базите данни.

Различните алели се задават с цифров код, а не с конкретната дължина в базови двойки. При провеждането на изчислението е необходимо и задаването на определен брой итерации (10^6). След изпълнение на алгоритъма, резултатът с вероятностното (т.нар. нормално или Гаусово) разпределение на изчисленията за възрастта на най-скорошния общ предшественик се появява в отделен прозорец на програмата.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Скринингови изследвания за търсене на патологични *TTR* варианти

4.1.1. Скрининг при пациенти

Резултатите от скрининга при индексни пациенти с предполагаема диагноза *ATTRv* са показани в Таблица 15. Освен известните до момента патологични варианти *Glu89Gln*, *Val30Met* и *Ser77Phe*, беше открит нов за България амилоидогенен вариант *c.220_221delGAinsCT, p.Glu74Leu (Glu54Leu)*. Също така беше открит още един нов за българската популация генетичен вариант *c.14G>A, p.Arg5His*, който беше класифициран като вариант с неясно клинично значение.

Таблица 15. Резултати от генетичното тестване при индексни пациенти, насочени за секвениране на *TTR* гена. Вариантите са номенклатурно представени спрямо кодиращата последователност на транскрипт NM_000371.4(*TTR*).

Индексни пациенти		
Положителни	<i>c.325G>C; p.Glu109Gln (Glu89Gln)</i>	5
	<i>c.148G>A, p.Val50Met, (Val30Met)</i>	1
	<i>c.290C>T, p.Ser97Phe (Ser77Phe)</i>	1
	<i>c.220_221delGAinsCT, p.Glu74Leu (Glu54Leu)</i>	1
Общо положителни		8
Отрицателни с вариант с неясно значение	<i>c.14G>A, p.Arg5His</i>	1
Отрицателни		106
Общ брой изследвани пациенти		115

Таблица 16. Резултати от генетичното тестване при роднини на *ATTRv* пациентите.

Роднини на <i>ATTRv</i> пациенти		
Положителни	<i>c.325G>C, p.Glu109Gln (Glu89Gln)</i>	6
	<i>c.148G>A, p.Val50Met, (Val30Met)</i>	3
	<i>c.220_221delGAinsCT, p.Glu74Leu (Glu54Leu)</i>	3
Общо положителни		12
Отрицателни		11
Общ брой роднини		23

При някои от положителните *ATTRv* пациенти беше възможно провеждането на скрининг в семействата за търсене на безсимптомни носители на открития фамилен

дефект (Таблица 16). Резултатите показаха наличието на 12 позитивни роднини в тези семейства.

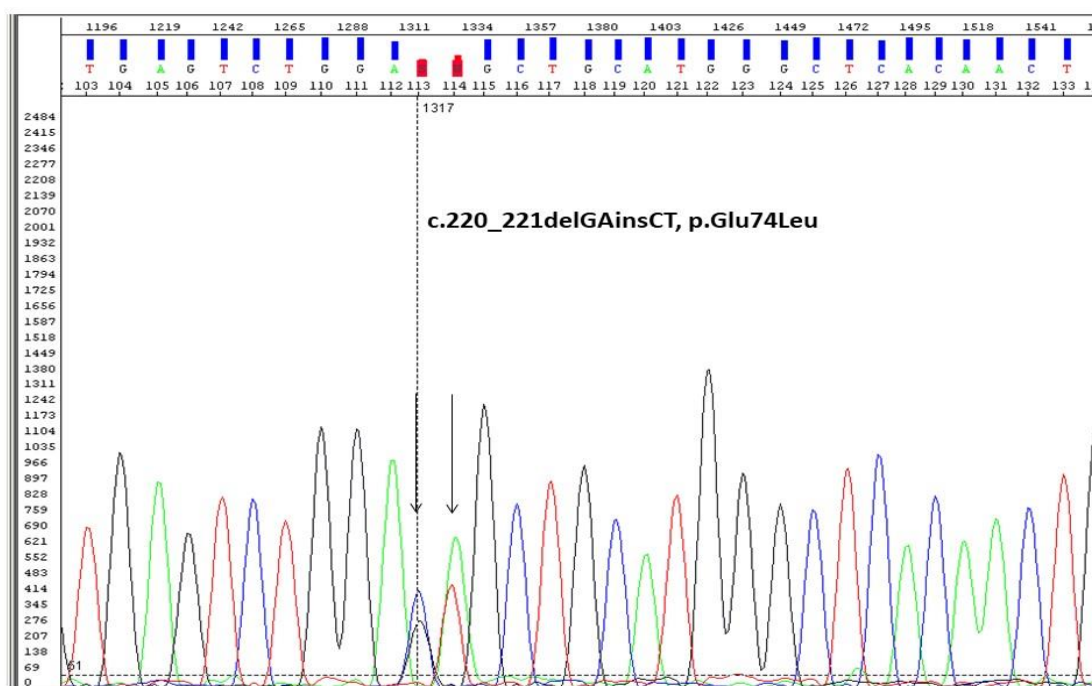
Наличните клинични данни за новооткритите *TTR* положителни пациенти до голяма степен съвпадат с генотип-фенотипната корелация известна до момента (Таблица 17). Пациентите с *Glu89Gln* показват смесен фенотип, засягащ едновременно периферната нервна система, сърдечната дейност и гастроинтестиналния тракт. Пациентът, носител на варианта *Ser77Phe* също проявява периферна полиневропатия и сърдечна амилоидоза, но с до момента липсваща гастроинтестинална симптоматика. Клиничната картина при пациента с *Val30Met* е предимно с неврологичен характер и с характерната по-късна възраст на начало на заболяването.

Таблица 17. Клинична характеристика на *ATTRv* пациентите. В скоби е показан броят на клинично описаните положителни пациенти.

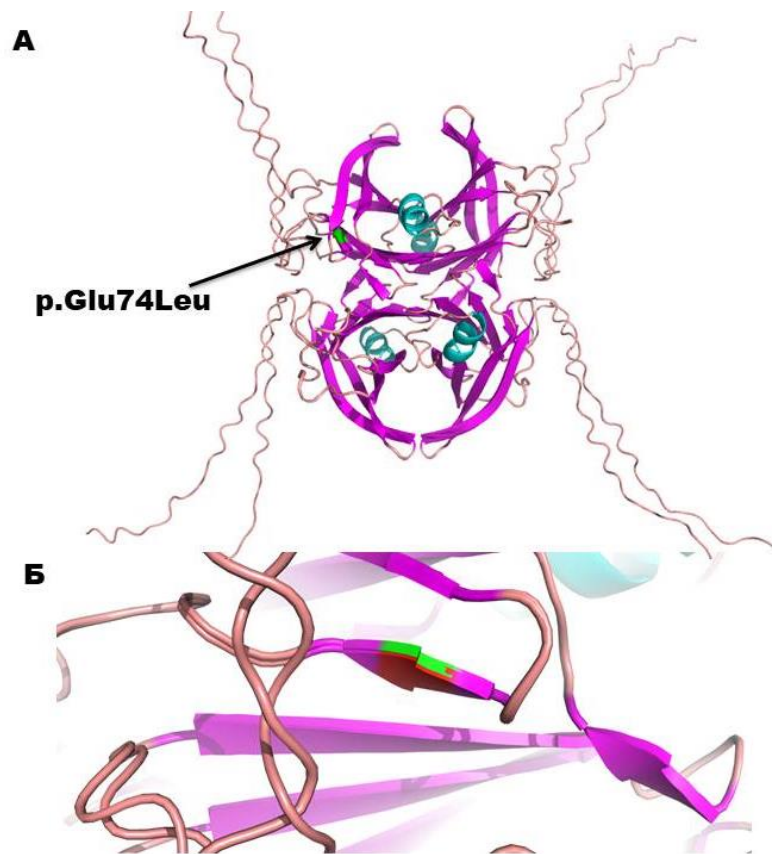
Системно засягане	<i>Glu89Gln</i> (6)	<i>Val30Met</i> (1)	<i>Ser77Phe</i> (1)	<i>Glu54Leu</i> (2)
Неврологично	Синдром на карпалния канал	Полиневропатен сетивно-двигателен синдром	Полиневропатен сетивно-двигателен синдром	Синдром на карпалния канал
	Полиневропатен сетивно-двигателен синдром	Периферен вестибуларен синдром	Стеноза на спиналния канал	Полиневропатен сетивно-двигателен синдром
	Периферен вестибуларен синдром			Лумбален вертебрален синдром
Кардиологично	Амилоидна кардиомиопатия		Амилоидна кардиомиопатия	Амилоидна кардиомиопатия
	Лявокамерна хипертрофия			Лявокамерна хипертрофия
Гастроинтестинално	Запек	Редуване на запек и диария		
	Диария			
	Загуба на тегло			
Средна възраст на начало на заболяването	49.8	66	56	47.5

Вариантът *p.Glu74Leu* (*Glu54Leu*) е нов за България и се открива само при едно семейство от град Търговище. Индексният пациент беше насочен за изследване по повод на открита лявокамерна хипертрофия със съмнение за сърдечна амилоидоза. Докладват се данни за двустранен синдром на карпалния канал и полиневропатен синдром. При него се

намери комплексен генетичен вариант, представляващ замяна на два съседни нуклеотида в екзон 3 на *TTR* гена (Фигура 15). След провеждане на сегрегационен анализ в семейството се установи, че двете нуклеотидни замени се локализират върху един алел (c.220_221delGAinsCT) и водят до промяна на отрицателно заредената аминокиселина глутамат с неутралната аминокиселина левцин на 74 позиция от аминокиселинната последователност на транстиретина. Вариантът Glu54Leu е съобщаван при пациенти с ATTRv от Швеция, Белгия и Великобритания⁹³, но е по-подробно описан само при едно семейство от Швеция⁹⁴. Свързва се с тежко сърдечно и понякога с по-леко неврологично засягане, а възрастта на начало на заболяването е от ранен тип. Измененият генетичен локус засяга D-веригата от β -листовата структура на белтъка⁹⁵ и нарушава хидрофобни и други слаби взаимодействия, с което се смята за силно амилоидогенен⁹⁴ (Фигура 16).



Фигура 15. Електрофореграма от секвенирането на екзон 3 на *TTR* гена при пациента, носител на варианта p.Glu74Leu (Glu54Leu). Със стрелки са показани двете съседни нуклеотидни замени.



Фигура 16. Белтъчен модел⁹⁶, илюстриращ локализацията на варианта p.Glu74Leu (Glu54Leu) в тетрамерния транстиретин (A) и в увеличение на β -лист от мономерния белтък (B).

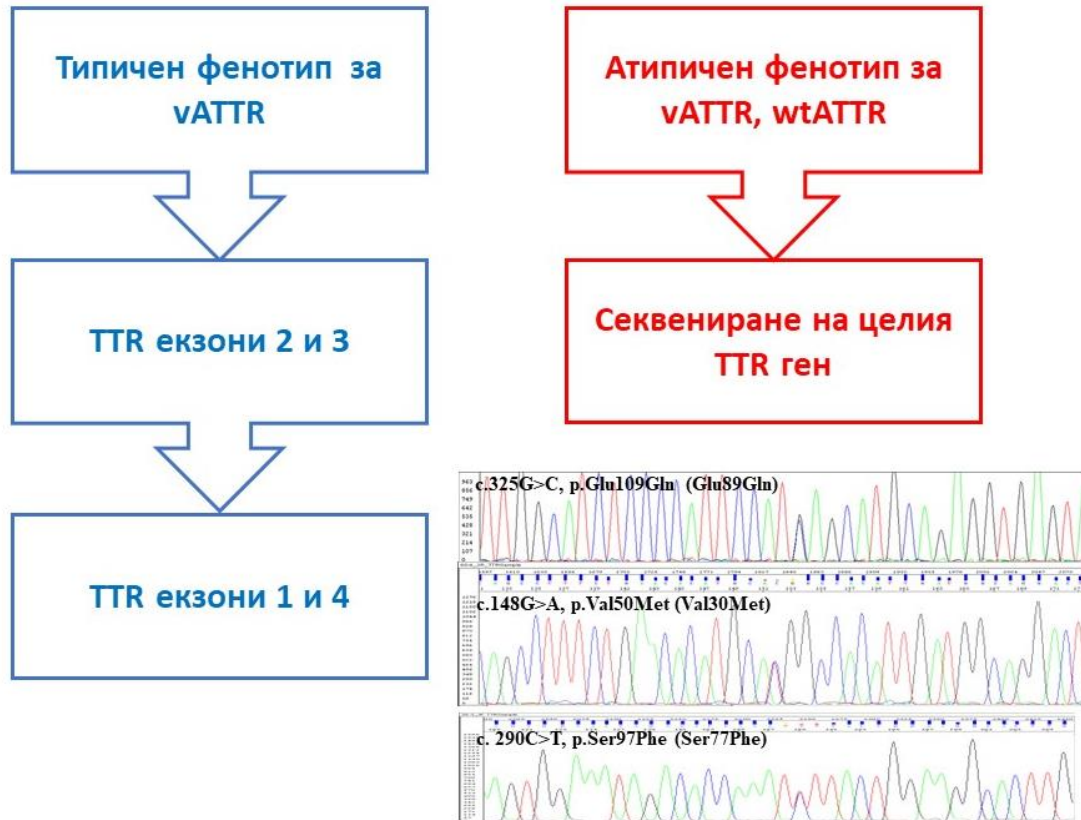
Налични са данни за поне 5 амилоидогенни патологични варианта в кодон 74 от кодиращата последователност на *TTR* гена²⁵. p.Glu74Leu (Glu54Leu) се среща в два генетични варианта, които поради изродяването на генетичния код водят до една и съща аминокиселинна замяна (c.220_221delGAinsCT и c.220_221delGAinsTT). Вариантът c.220_221delGAinsTT е съобщаван веднъж при пациент от Белгия и веднъж при пациент от Шотландия⁹⁷. Тук от особено значение е коректното номенклатурно съобщаване на откриваните нови генетични варианти в научните публикации и базите данни, за да е възможно генетичното и фенотипно проследяване на популациите от пациенти с един и същ генетичен вариант.

Вариантът TTR(NM_000371.4):c.14G>A, (p.Arg5His) беше първоначално класифициран като вариант с неясно клинично значение, въпреки че до момента не е съобщаван като вариант, директно асоцииран с ATTRv. Според препоръките за класификация на генетичните варианти на Американския Колеж по Медицинска Генетика

и Геномика (ACMG)⁹⁸, *TTR* вариантът с.14G>A, p.Arg5His се класифицира като вероятно непатогенен (доказателствени категории BS2, BP4, PP2). Това е рядък вариант, наличен в популационната база данни GnomAD v.2.1.1⁹⁹ с обща алелна честота 0.013% (алел А се среща с честота 36/282806, включително и веднъж в хомозиготно състояние). В база данни ClinVar вариантът с.14G>A, p.Arg5His е съобщаван под номер 181697 като вероятно непатогенен, вариант с неясно клинично значение, както и като вариант с конфликтна интерпретация. Той попада в региона на сигналната белтъчна секвенция (от 1-ви до 20-ти аминокиселинен остатък), който бива пост-транслационно отстранен и не присъства във функционалния транстиретинов белтък. PhyloP¹⁰⁰ алгоритъмът за изчисление на теоретична консервативност на даден белтъчен регион, изчислява отрицателна стойност от -0.5, която се свързва с ниска консервативност на аминокиселината аргинин на пета позиция в аминокиселинната последователност. Пациентът, при който се открива вариантът p.Arg5His страда от диабет тип II и в следствие бива диагностициран с диабетна сетивно-двигателна полиневропатия. Всички тези данни сочат към вероятната липса на амилоидогенна функция на *TTR* варианта с.14G>A, p.Arg5His, но неговото пълно клинично значение трябва да бъде допълнително верифицирано чрез функционални, клинични и популационни проучвания.

Резултатите от генетичния скрининг при пациенти с предполагаема диагноза ATTRv потвърдиха екзони 2 и 3 на *TTR* гена като гореща точка в България за натрупване на амилоидогенни варианти, водещи до наследствена транстиретинова амилоидоза. Диагностичният алгоритъм за генетично изследване при пациенти със съмнение за транстиретинова амилоидоза беше проверен и обобщен в схемата, показана на Фигура 17.

Информацията за честотата на наличните в България патологични *TTR* варианти беше обновена (Таблица 18). Към момента българският ATTRv генофонд беше допълнен с един нов амилоидогенен вариант Glu54Leu. Въпреки малките размери на *TTR* гена и относително добре проучения механизъм на патогенеза, все още се откриват нови генетични варианти, асоциирани с развитие на ATTRv, както и такива с трудна клинична или фенотипна интерпретация. В допълнение, резултатите от скрининга за безсимптомни носители в засегнатите семейства доказаха значимостта на тези изследвания по отношение на ранната диагностика и лечение на ATTRv.



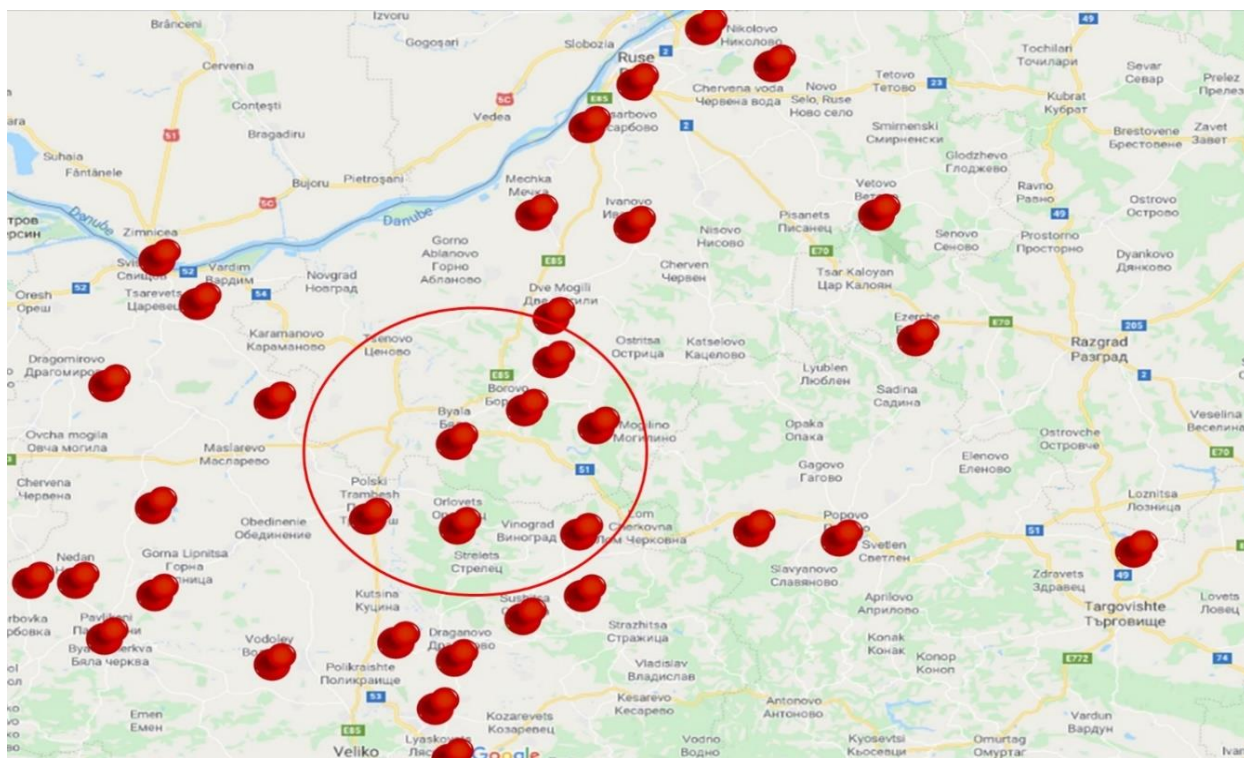
Фигура 17. Алгоритъм за генетично тестване при пациенти със съмнение за транстиретинова амилоидоза в България. Показани са електрофореграми от директно секвениране по Sanger при носители на трите най-чести патологични варианти в *TTR* гена за България, локализирани в екзони 2 и 3.

Таблица 18. Обобщение на честотата на откриваните до момента *TTR* патологични варианти в България.

<i>TTR</i> патологичен вариант (NM_000371.3, GRCh37)	Брой носители в България	Честота
c.325G>C; p.Glu109Gln (Glu89Gln)	278	77.22%
c.148G>A, p.Val50Met, (Val30Met)	39	10.83%
c.290C>T, p.Ser97Phe (Ser77Phe)	29	8.06%
Двоен хетерозиготен носител c.148G>A, p.Val50Met, (Val30Met) + c.325G>C; p.Glu109Gln (Glu89Gln)	1	0.28%
c.200G>A; p.Gly67Glu (Gly47Glu)	7	1.94%
c.214T>C, p.Ser72Pro (Ser52Pro)	2	0.56%
c.220_221delGAinsCT, p.Glu74Leu (Glu54Leu)	4	1.11%
Общ брой носители	360	

4.1.2. Скрининг при новородени за определяне честотата на носителство на *TTR* варианта Gly47Glu

Тъй като хипотезата за наличие на ендемичен регион за *TTR* варианта Gly47Glu беше приета като възможна, се премина към изследване на честотата на носителство на този генетичен вариант сред Ромското етническо население от района на произход на двете доказани семейства. За целта бяха подбрани 100 филтърни бланка на новородени от региона на град Полски Тръмбеш и град Русе (Фигура 18). Резултатите при всички изследвани проби бяха отрицателни за патологични варианти в екзон 2 на *TTR* гена. Освен Gly47Glu, не беше открит и най-честият за този екзон *TTR* патологичен вариант Val30Met. Поради това беше отхвърлена хипотезата за ендемичност на Gly47Glu в изследвания регион на България.



Фигура 18. Географско разпределение на филтърните бланки, изследвани за носителство на варианта Gly47Glu. Двете доказани ATTRv семейства с този вариант са от района на град Полски Тръмбеш с настояща популация 13 000 души (показан с червен кръг).

Резултатите от това скринингово изследване показаха, че вариантът Gly47Glu най-вероятно се е появил в резултат на скорошно единично спорадично събитие и двете открити засегнати семейства най-вероятно са близкородствени. Съществуват още 4

различни амилоидогенни замени в кодон 47 от кодиращата последователност на *TTR* гена, което отново прави този локус мутационна гореща точка²⁵. Вариантът Gly47Glu до момента е бил съобщаван при отделни случаи на пациенти от Италия, Германия, Турция и др., без да има данни за наличие на ендемичност или ефект на родоначалника в тези популации^{101(p47),102(p47),103}.

4.2. Анализ на регулаторни генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на заболяването

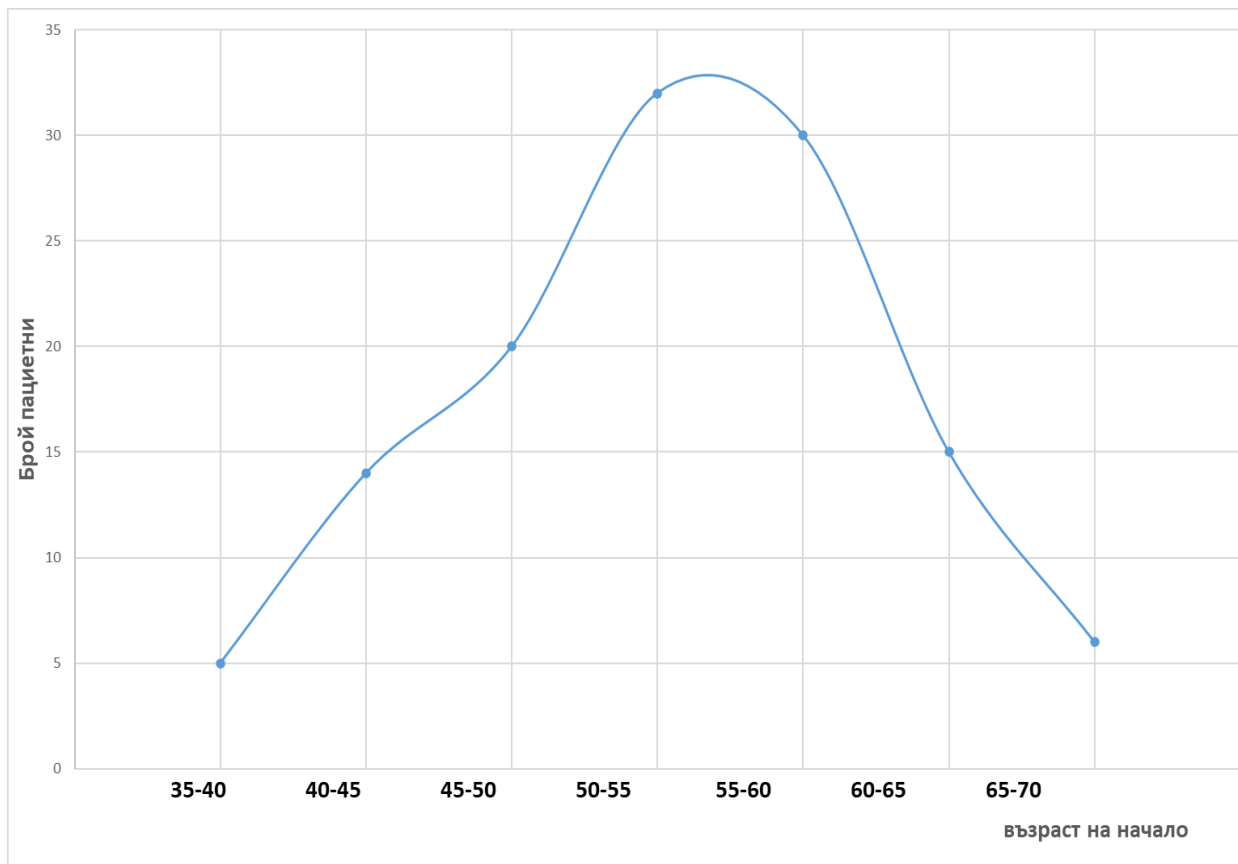
За анализ на генетични полиморфизми с потенциален ефект върху клиничната изява на наследствената транстиретинова амилоидоза в Българската популация бяха подбрани 14 единични нуклеотидни полиморфизма, които бяха генотипизирани при 124 ДНК проби на пациенти, носители на *TTR* варианта Glu89Gln. Данните от директното секвениране на тези генетични варианти бяха използвани за изчисление на алелните честоти в избраната Glu89Gln кохорта. Резултатите бяха сравнени с наличната информация за честотата на генетичните варианти в Европейската популация от базата данни GnomAD v.2.1.1⁹⁹ (Таблица 19). Сравнението показва, че честотата на тези варианти в изследваната пациентска група до голяма степен съвпада с общите данни за Европейската популация.

Таблица 19. Алелна честота на изследваните генетични полиморфизми при *ATTRv* пациентите с *Glu89Gln* в България. Честотите са сравнени с данни за Европейската популация.

Полиморфизъм	Европейци gnomAD v2.1.1				Glu89Gln България			
	Алел	Честота	Алел	Честота	Алел	Честота	Алел	Честота
rs875119	T:	0.949	C:	0.051	T:	0.984	C:	0.016
rs3764478	G:	0.888	T:	0.112	G:	0.863	T:	0.137
rs1800458	G:	0.926	A:	0.074	G:	0.927	A:	0.073
rs72922947	G:	0.986	A:	0.014	G:	1.000	A:	0.000
rs7235277	G:	0.673	C:	0.327	G:	0.642	C:	0.358
rs62093482	C:	0.972	T:	0.028	C:	0.984	T:	0.016
rs1791228	C:	0.536	T:	0.464	C:	0.540	T:	0.460
rs4799586	T:	0.955	C:	0.045	T:	0.984	C:	0.016
rs1667245	C:	0.999	G:	0.001	C:	1.000	G:	0.000
rs35197841	TAGTAG:	0.999	TAG:	0.001	TAGTAG:	0.978	TAG:	0.022
rs76184052	T:	1.000	C:	0.000	T:	1.000	C:	0.000
rs72922938	C:	0.983	T:	0.017	C:	1.000	T:	0.000
rs723744	G:	0.671	T:	0.329	G:	0.511	T:	0.489
rs1080093	C:	0.625	G:	0.375	C:	0.556	G:	0.444

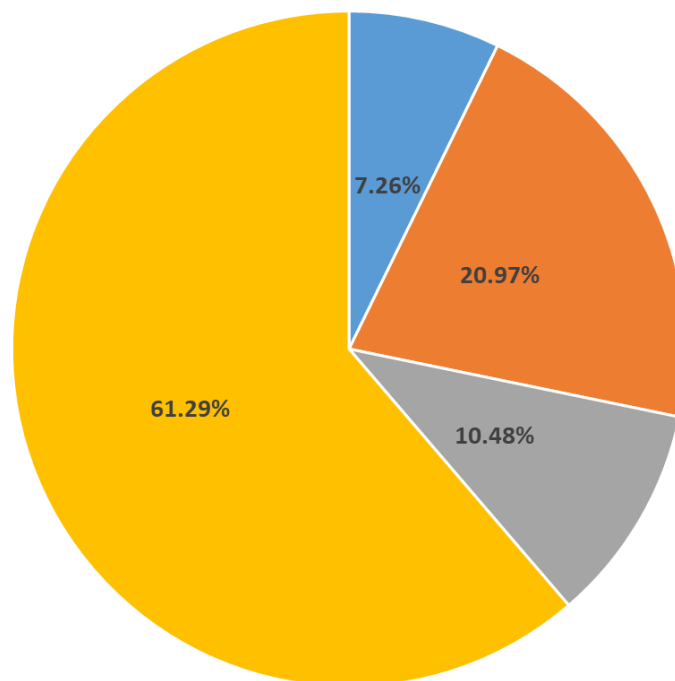
След това беше проведен анализ за корелация между генотипа на пациентите по отношение на изследваните полиморфизми и клиничната изява на ATTRv. Клиничната изява беше анализирана по отношение на два параметъра – възраст на начало на заболяването и първоначално системно засягане.

Проведеният статистически анализ целеше проучване на възможен модифициращ болестта ефект на някои генетични полиморфизми, чийто ефект вече е бил проучван в други ATTRv популации^{51,54}. За целта беше необходимо провеждането на т.нар. стратификация на пациентската група спрямо изследваните параметри (възраст на начало и първоначално системно засягане). Поради това, преди статистическата обработка на генетичните резултати беше проведено характеризиране на изследваната група от пациенти по отношение на изследваните фенотипни характеристики. Първоначално беше направена оценка на разпределението на пациентите спрямо възрастта на начало на заболяването (Фигура 19). За целта условно пациентите бяха разделени в следните възрастови групи: 35-40 год., 40-45 год., 45-50 год., 50-55 год., 55-60 год., 60-65 год., 65-70 год. Резултатите показаха, че над 50% от пациентите попадат във възрастовия диапазон на начало 50-60 годишна възраст, което обуславя най-висока вероятност пациент с Glu89Gln да развие заболяването си именно в този възрастов диапазон. Въпреки това, от голям интерес са малкият брой пациенти, попадащи в екстремумите на възрастовата крива на нормално разпределение. По литературни данни от проучвания основно върху Val30Met пациенти, възрастта на начало на заболяването най-често се определя като ранна (под 40 години) и късна (над 50 години)¹⁰⁴. Поради спецификата на възрастовото разпределение, която се наблюдава при българските Glu89Gln пациенти, за целите на последващия статистически анализ групата беше допълнително разделена на пациенти с ранно (под 45 годишна възраст), средно (45-55 годишна възраст) и късно начало (над 55 годишна възраст). Съобщаваната разлика във възрастта на начало спрямо пола на пациента не беше взета предвид в настоящото проучване.



Фигура 19. Разпределение на ATTRv пациентите с Glu89Gln спрямо възрастта на начало на заболяването.

По отношение на първоначалното системно засягане, пациентите бяха разделени в групи, в зависимост от това дали началната симптоматика е била свързана с нарушение на периферната нервна система, сърце, гастроинтестинален тракт или смесено засягане (Фигура 20). Най-честият първоначален симптом е свързан с развитието на полиневропатия, докато сърдечното и гастроинтестинално презентиране на заболяването се среща при по-малък процент от Glu89Gln пациентите⁸³.



■ Смесен тип ■ Сърдечно засягане ■ Гастроинтестинален тракт ■ Периферна нервна система

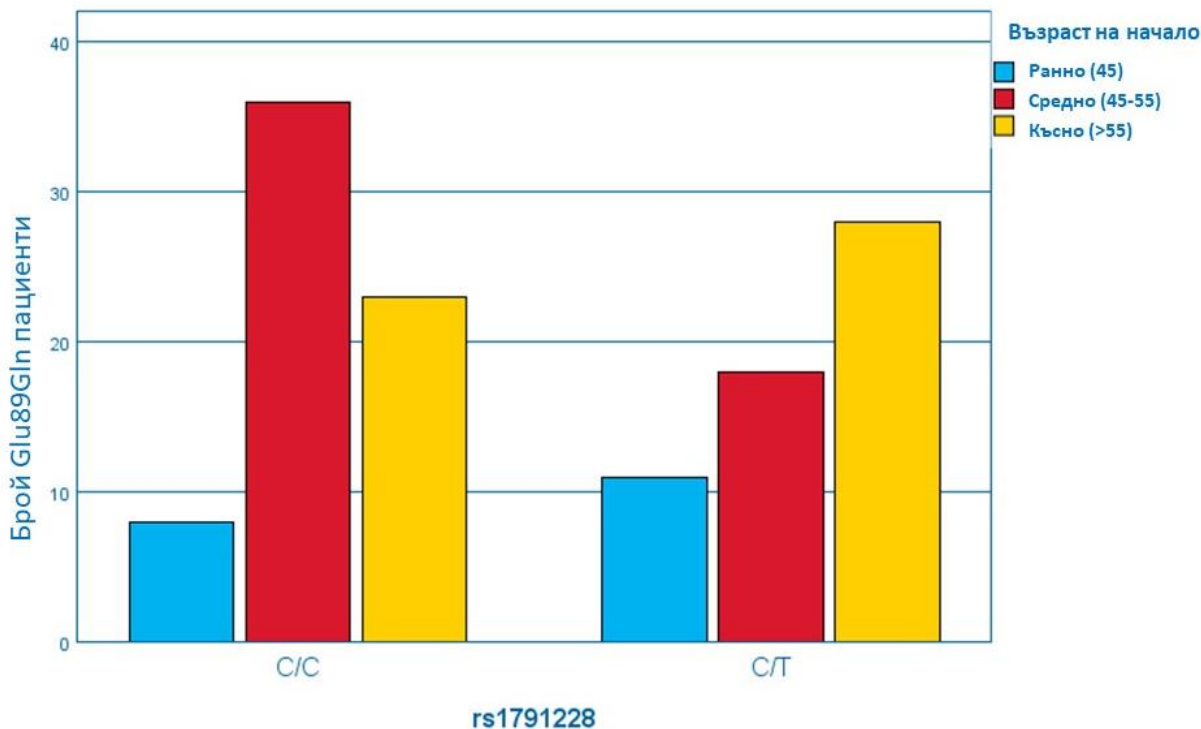
Фигура 20. Първоначално системно засягане при Glu89Gln ATTRv пациентите.

Корелацията между носителство на даден алел на генетичен полиморфизъм и клиничната изява на ATTRv (възраст на начало на заболяването и системно засягане) беше изследвана чрез Хи-квадрат тест на Пиърсън (Таблица 20). Статистически значима корелация беше изчислена единствено за полиморфизма rs1791228 по отношение на възрастта на начало на заболяването при алфа ниво на значимост 0.05.

Таблица 20. Резултати от Хи-квадрат тест за корелация между изследваните генетични полиморфизми и възрастта на начало и системното засягане при Glu89Gln ATTRv пациенти. Маркирани с червен цвят са резултатите, удовлетворяващи алфа ниво на значимост 0.05.

rs ID	rs875119	rs3764478	rs1800458	rs7235277	rs62093482
Възраст на начало (p-стойност)	0.268	0.399	0.405	0.223	0.268
Първоначално системно засягане (p-стойност)	0.122	0.768	0.874	0.837	0.733
rs ID	rs1791228	rs4799586	rs35197841	rs723744	rs1080093
Възраст на начало (p-стойност)	0.045	0.268	0.464	0.398	0.809
Първоначално системно засягане (p-стойност)	0.388	0.122	0.733	0.231	0.668

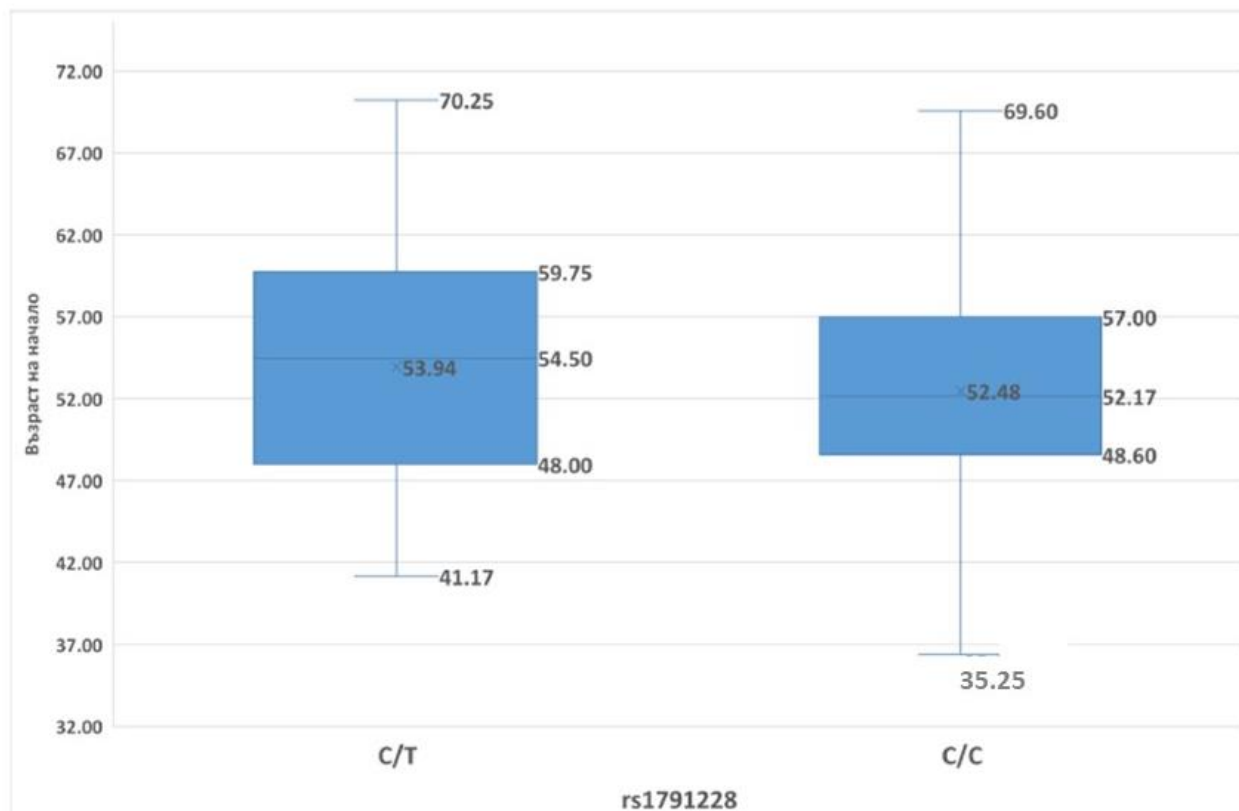
Хипотезата, която може да бъде предложена на база на тези резултати е, че пациентите, които са хетерозиготни носители на алел Т на варианта rs1791228 е по-вероятно да развият заболяването в по-късна възраст в сравнение с хомозиготните носители на алел С (Фигура 21). Не бяха открити хомозиготни носители на алел Т.



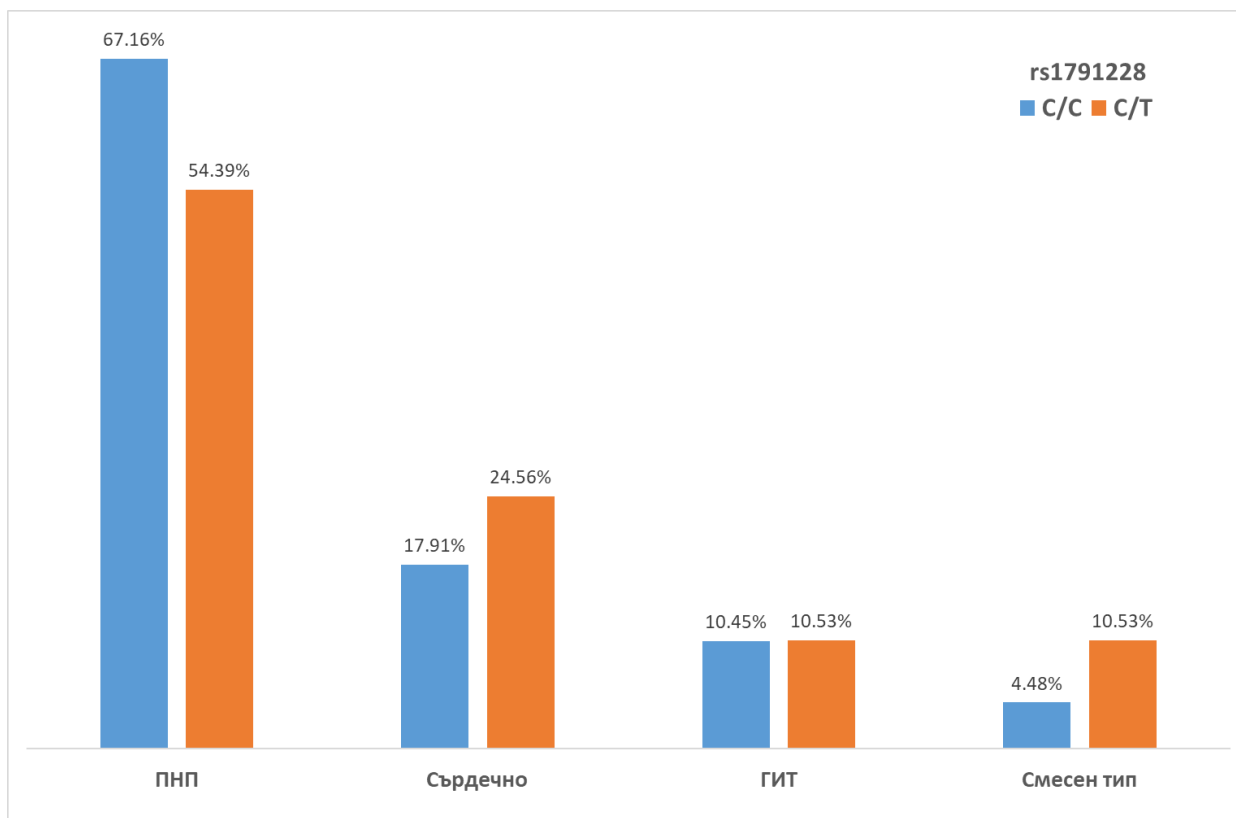
Фигура 21. Разпределение на Glu89Gln пациентите спрямо възрастта на начало на заболяването и rs1791228 генотипа.

Поради предложената хипотеза се премина към по-подробно разглеждане на пациентите, носители на rs1791228. Детайлният анализ показва, че средната възраст на начало на заболяването при носителите на алел Т (54.50) е с около две години по-висока от тези, които носят хомозиготен генотип C/C (52.17). От Фигура 22 се вижда, че групата на хомозиготните носители на по-честия С алел може да достигне до много по-ранно начало на заболяването в сравнение с групата с генотип C/T. Въпреки това, над половината от индивидите в двете генотипни групи показват възраст на начало в диапазона 48 – 57 (CC) и 48 – 59 (CT) годишна възраст. Вероятно по-голям брой пациенти в групата на пациенти с ранна изява на болестта (под 45 годишна възраст) би внесъл корекции в изчислената статистическа вероятност. Въпреки, че статистическият тест не показва наличие на корелация между rs1791228 генотипа и първоначалното системно

засягане, беше направен допълнителен анализ на пациентите и по отношение на тази хипотеза (Фигура 23). Наблюдава се сравнително повишение на процента хетерозиготни С/Т пациенти в групата с първоначално сърдечно и първоначално смесено засягане.



Фигура 22. Графика на численото разпределение и средната възраст на начало при двете rs1791228 генотипни групи – C/C и C/T. Минималната възраст на начало при хетерозиготните носители е 41.17, докато минималната възраст при хомозиготните C/C индивиди е 35.25. Въпреки това, средната възраст при двете групи се различава само с две години.



Фигура 23. Графика на численото разпределение и първоначалното системно засягане при двете rs1791228 генотипни групи – C/C и C/T. Хетерозиготните носители на алел Т показват тенденция към първоначално сърдечно или смесено засягане спрямо хомозиготните носители на по-честия алел С. ПНП - полиневропатия, ГИТ -гастроинтестинален тракт.

Полиморфизмът rs1791228 вече е съобщаван в корелация с възрастта на начало на заболяването при португалски пациенти с Val30Met⁵⁵. Това е некодиращ вариант, локализиран *down stream* от *TTR* гена, който е възможен транскрипционен регулатор. *In silico* анализи показват възможната сплайсинг роля на този генетичен вариант чрез активиране на точка на разклоняване („*branch point*“), която е неактивна в дивия тип секвенция⁵⁵. Друг предложен регулаторен механизъм на rs1791228 е нарушаването на свързващо място за транскрипционния фактор TEAD1(Фигура 24)^{105,106}. TEAD1 има роля в регулацията на тъканно специфичната генна експресия в кардиомиоцитите чрез транскрипционна активация на гените за сърдечно-мускулния тропонин Т, скелетно-мускулния актин и тежките вериги на миозина^{107(p1)}. Изследваният генетичен вариант rs1791228 е докладван във възможен хаплотип с патологичната замяна Val122Ile, която се характеризира с предимно сърдечно засягане¹⁰⁵. Тези данни съвпадат с наблюдаваните корелации в българската Glu89Gln кохорта, но статистическата или математическа

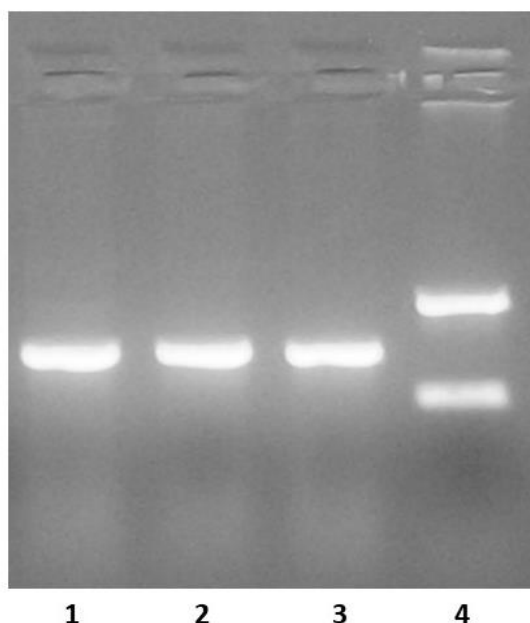
зависимост не е достатъчна за абсолютно определяне на клиничния фенотип на ATTRv. Съвкупността от генетични маркери с различна функционална тежест и значимост, в комбинация с епигенетични фактори най-вероятно са в основата на наблюдаваната клинична хетерогенност, която остава да бъде проучвана в бъдещи изследвания.



Фигура 24. Схема на свързващите места на транскрипционни фактори, потенциално нарушаващи се от T алела на полиморфизма rs1791228. Източник: *RegulomeDB v2.0.3*¹⁰⁸.

4.3. Анализ на генната експресия на транстиретина

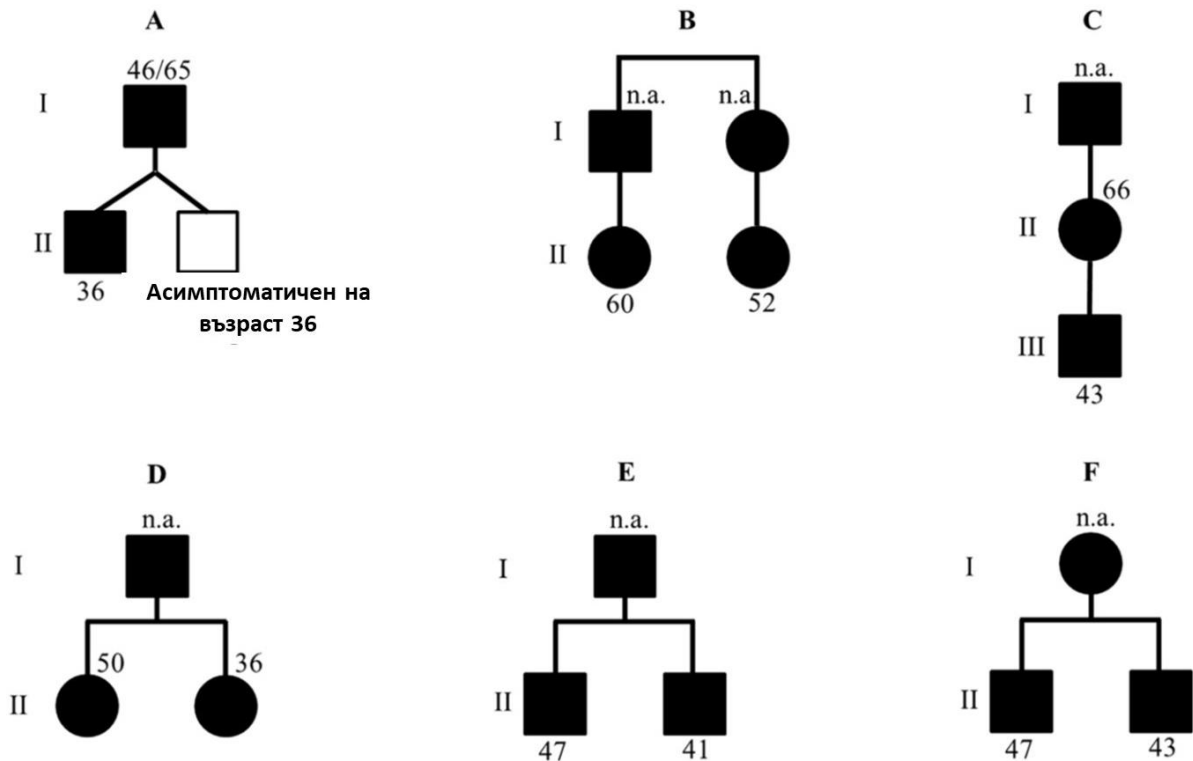
Предложената методология за анализ на генната експресия първоначално беше тествана върху РНК проба изолирана от чернодробна тъкан с очаквана висока експресия на транстиретин. Резултатите от оптимизирането на полимеразната верижна реакция показаха намножаване на кДНК фрагмент с предвидената дължина от 290 базови двойки (Фигура 25), който чрез директно секвениране по Sanger беше потвърден транстиретинов иРНК транскрипт. Последващия анализ върху пациентските проби от кръв и урина беше проведен чрез използване на оптимизирания PCR протокол с температура на хибридизация на праймерите от 62°C.



Фигура 25. Агарозна електрофореза на кДНК фрагменти на транстиретиновия транскрипт от PCR оптимизацията върху контролна РНК проба, изолирана от черен дроб. Ивици от 1 до 3 представляват кДНК фрагменти намножени с праймери, които комплементират с краищата на съседни *TTR* екзони чрез различна температура на хибридизация на праймерите: 1 - 58°C, 2 - 60°C, 3 - 62°C. Ивица 4 съдържа два контролни ДНК фрагмента с дължина 175 и 421 базови двойки, използвани за сравнително оразмеряване.

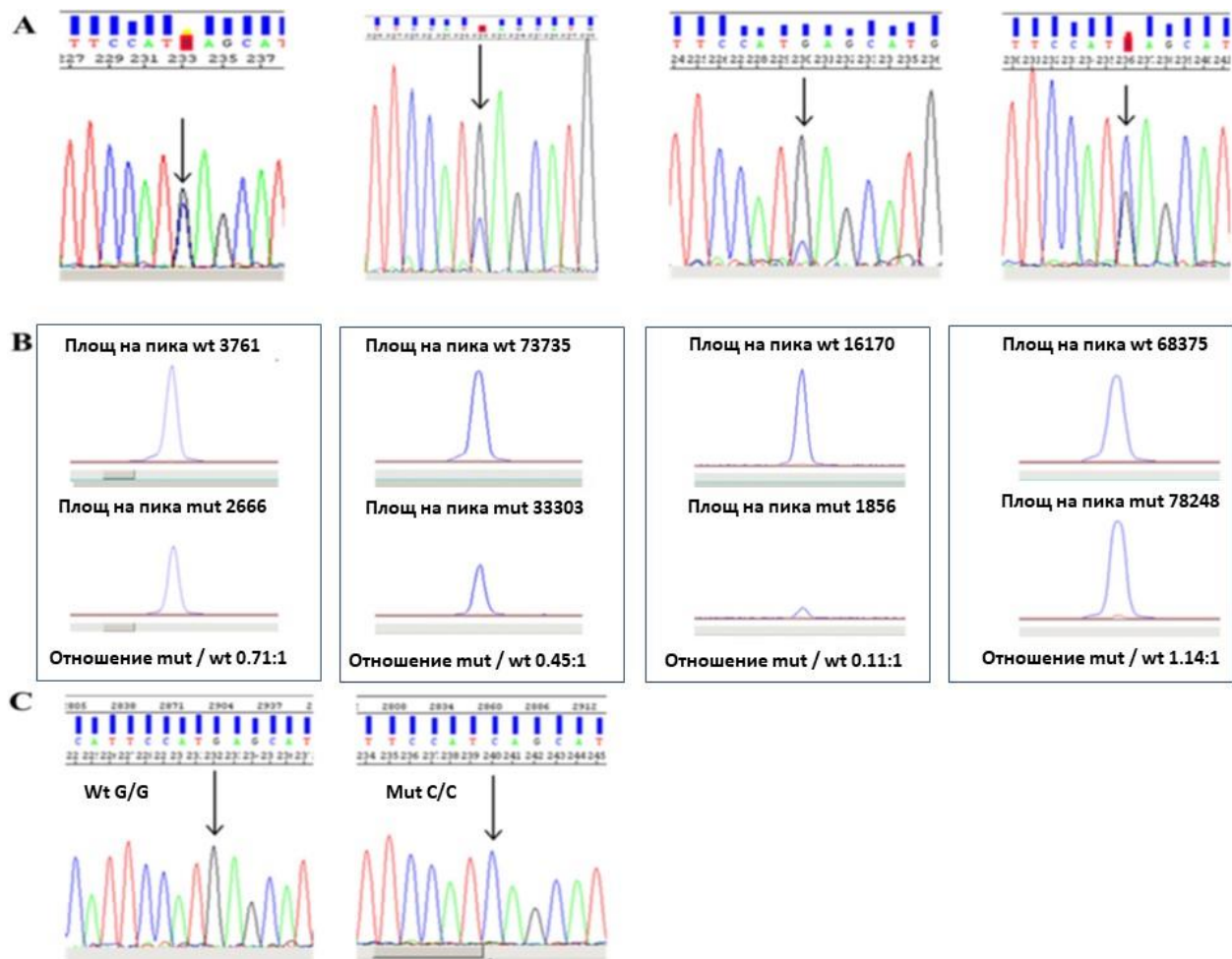
След това се премина към транскрипционен анализ на пациентските проби от кръв и урина. Бяха анализирани проби от 19 Glu89Gln пациента от 6 семейства, чиито родословия са показани на Фигура 26.

Анализът на резултатите от директното секвениране показва смесен транскрипционен профил на мутантен и див тип алел в различни съотношения (Фигура 27). Сравнителният анализ на профилите, получени от кръвна плазма и урина показва, че в двата типа проби се наблюдава сходен дял на експресия на мутантния алел (около 40%). За изчисление на относителното количествено съотношение между двата алелни варианта беше използван фрагментен анализ на алел-специфични кДНК фрагменти. За нормализация при всяка проба беше използвана за 1 единица площта на дивия тип алел. Резултатите показаха вариация на количеството мутантен транскрипт в диапазона 0.11 – 1.14 единици, което корелира с първоначалните данни от секвенционните електрофореграми.

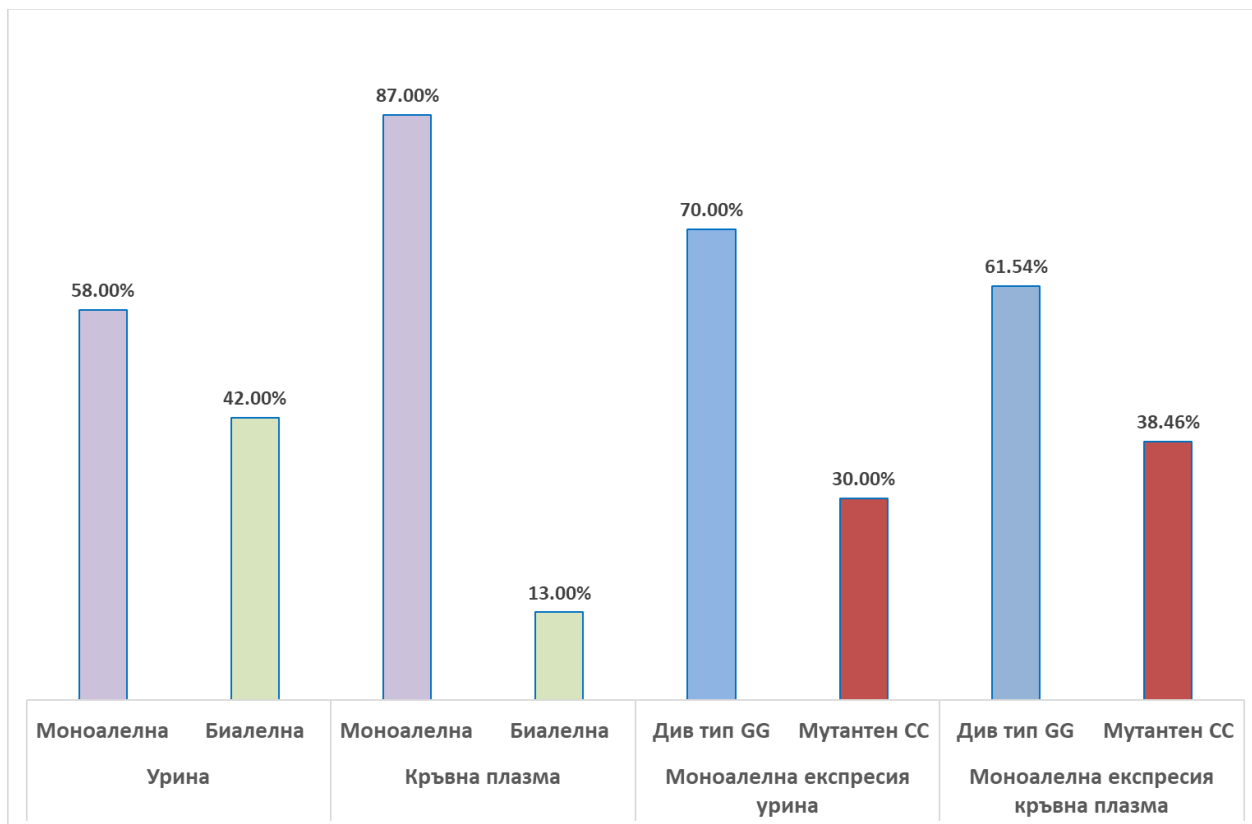


Фигура 26. Родословия на **Glu89Gln ATTRv** семействата, включени в изследването на транзитретиновата експресия. С римски цифри са означени поколенията, а с арабски цифри е означена възрастта на начало на заболяването. “n.a.” обозначава липсата на налична информация относно възрастта на начало на заболяването при някои от пациентите.

Изненадващо беше наличието на моноалелни транскрипционни профили, както в кръвни проби, така и в проби от урина. Обобщените резултати показаха 87% моноалелен профил при пробите от кръвна плазма срещу 13% биалелна експресия. За пробите от урина резултатите показаха 58% моноалелна срещу 42% биалелна експресия (Фигура 28). При някои пациенти беше докладван тъканно специфичен тип на транзитретинова експресия (моноалелна експресия в урина срещу биалелна експресия в плазма и обратното). Пробите от кръвна плазма показаха наличие на по-висок процент моноалелна експресия на мутантния алел в сравнение с пробите от урина.



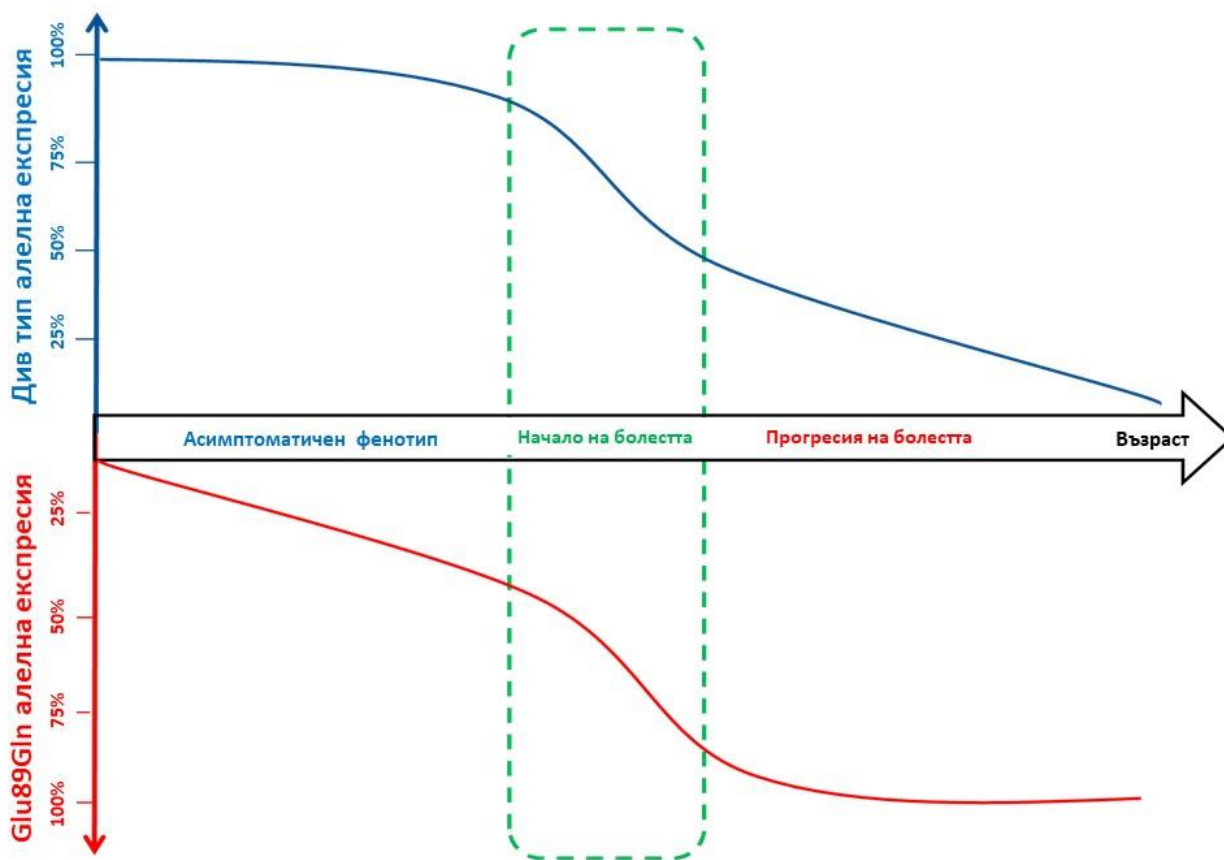
Фигура 27. Експресия на транстретина при някои от изследваните проби. **A.** Секвенционни електрофореграми от директно секвениране по Sanger на кДНК фрагментите. **B.** Относителен количествен анализ на дивия тип алел (wt) и мутантния (mut) алел в същите изследвани проби. **C.** Проби, показващи 100% моноалелна експресия.



Фигура 28. Резултати от анализа на алел-специфичната транстиретинова генна експресия в изследваните проби.

От огромен интерес бяха резултатите на семейството с двама монозиготни близнака, носители на Glu89Gln. В това семейство се наблюдава разлика във възрастта на начало на заболяването от над 10 години. Бащата е бил опериран от карпал тунел синдром първоначално в дясно на възраст 46 години и след това в ляво на 50 годишна възраст. На 58 годишна възраст преживява исхемичен инсулт, а на 64 години е открита и лявокамерна хипертрофия на сърцето. За разлика от него, единият от двамата му синове проявява симптоми на транстиретинова амилоидоза още на 35 годишна възраст (с 11 години по-рано). Неговите симптоми започват отново с двустранен карпал тунел синдром и в следствие се развива полиневропатен синдром. На 42 годишна възраст е диагностициран и с рестриктивна кардиомиопатия. Неговият брат близък е асимптоматичен до 46 годишна възраст, когато започват леки неврологични оплаквания в областта на горните крайници. И при двамата братя са взети два пъти проби за транскрипционен анализ в рамките на една година. При пациента с по-ранно начало на заболяването още при първоначалното изследване на транстиретиновата експресия се

наблюдава наличие на биалелен профил в урина и див тип моноалелен профил в кръв, докато при пациента с по-късна изява първоначално и двете изследвани проби (кръв и урина) показват моноалелна експресия на дивия тип транскрипт. Повторното изследване при двамата братя вече показва наличие на експресия на мутантния алел и при двамата братя. На базата на тези резултати предлагаме хипотетичен експресионен механизъм, който включва възраст-зависима алел-специфична транскриптивна експресия: преобладаваща експресия на дивия тип алел в по-ранна възраст, която постепенно превключва към експресия на мутантния алел с напредване на възрастта (Фигура 29).



Фигура 29. Хипотетичен модел на възраст-зависима алел-специфична експресия на *TTR* гена при пациенти с Glu89Gln.

Моноалелната експресия би могла да бъде обяснена със зависимост от пола на засегнатия родител, т.е. чрез наличието на генен импринтинг. Друг известен механизъм е случайната моноалелна експресия, която възниква в резултат на случайна инактивация на единия хомоложен алел в клетката⁶⁰. Разпределението на пациентите с детектирана

моноалелна експресия, за които беше налична информация за пола на предаващия родител е показано в Таблица 21. Наблюдава се по-висока честота на дивия тип GG транскрипт в групата пациенти с бащино унаследяване. Въпреки това, поради наличието на биалелна експресия и малкия брой изследвани пациенти, не може да се направи крайно заключение относно механизма на генна експресия на транстиретиновия ген.

Таблица 21. Разпределение на Glu89Gln пациентите с установена моноалелна транстиретинова експресия спрямо пола на предаващия родител. GG – див тип, CC – мутантен генотип.

Плазма				Урина			
Моноалелна експресия				Моноалелна експресия			
Алел	Майчино унаследяване	Бащино унаследяване	Общ брой	Алел	Майчино унаследяване	Бащино унаследяване	Общ брой
GG	16.67%	83.33%	6	GG	20.00%	80.00%	5
CC	80.00%	20.00%	5	CC	0.00%	100.00%	2

Наличието на междуфамилни и вътрефамилни разлики в клиничната изява на различни автозомно-доминантни генетични заболявания, включително и наследствената транстиретинова амилоидоза са обект на проучване по отношение на молекулните механизми, които стоят зад наблюдавания фенотип¹⁰⁹. Съществуват множество проучвания върху наличието на епигенетични молекулни промени свързани със стареенето, в т.ч. метилиране на регулаторни участъци от генома, хистоновы модификации и др., които от своя страна могат да доведат до използване на алтернативни промотори и пространствена реорганизация на хроматина с течение на времето¹¹⁰. Тези т.нар. епигенетични „часовници“¹¹¹ биха могли да са в основата на наблюдаваните различия в транскрипционните профили на изследваните Glu89Gln ATTRv пациенти, при които превключването между моно- и би-алелна транстиретинова експресия хипотетично може да има отношение към изявата и прогресията на заболяването.

Резултатите от нашите пациенти показаха наличие на динамично променлива във времето моноалелна и биалелна експресия, което насочва към по-сложен механизъм на тъканно-специфична генна транскрипция, който вероятно се определя от набор от генетични и епигенетични фактори. Изследването на монозиготни близнаци е изключително ценно при анализ на подобни биологични процеси¹¹². Въпреки предложението хипотетичен модел на възраст-зависима алел-специфична транстиретинова експресия, доказателствената връзка между конкретния алелен тип на транстиретинова

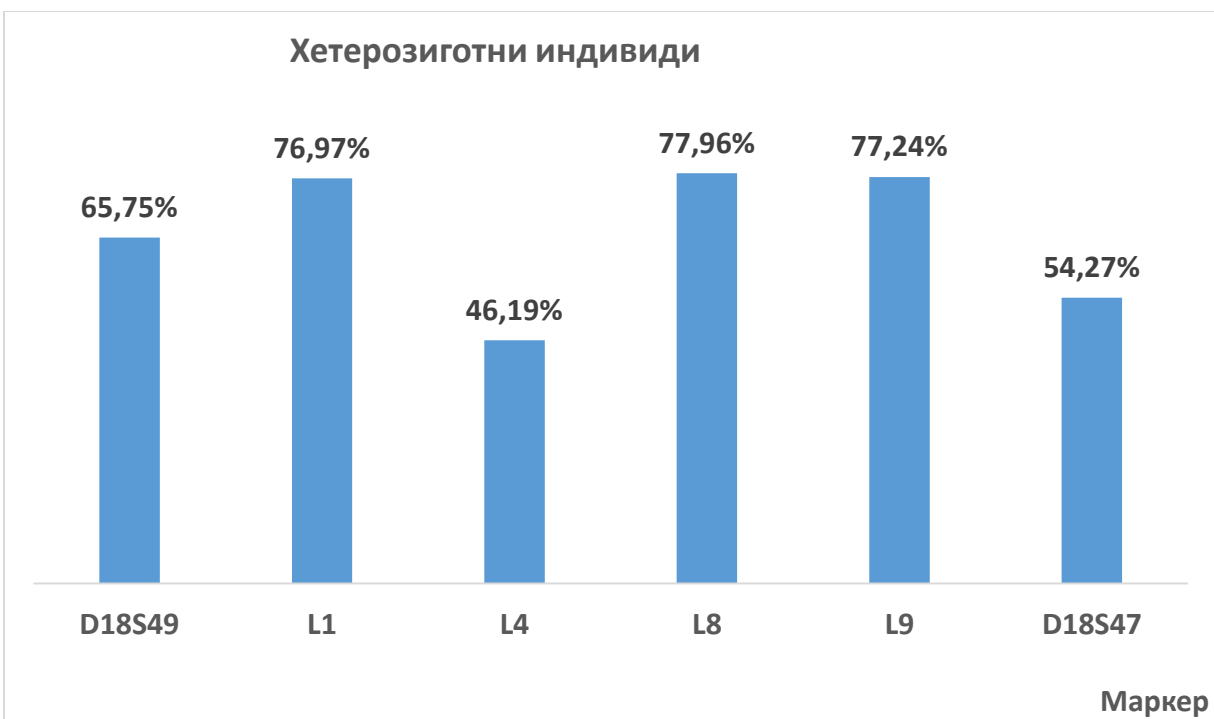
експресия и наличието на специфичен болестен фенотип за момента остава неясна. Вероятно е необходимо проследяване на по-голяма извадка от пациенти още от стадий асимптомен носител до проява на първите клинични оплаквания с последващ прогрес на заболяването, за да може да се изследва по-точно експресионната хипотеза. Въпреки това, наблюдаваните резултати поставят обещаваща основа за изясняване на клиничната проява на транстиретиновата амилоидоза в контекста на най-честия за България ендемичен *TTR* генетичен вариант Glu89Gln.

4.4. Хаплотипен анализ за определяне ефект на родоначалника

4.4.1. Микросателитен фрагментен анализ

Микросателитните маркери в региона на *TTR* гена бяха успешно намножени и анализирани чрез фрагментен анализ при всички 205 изследвани ДНК проби на семейства с носителство на четирите най-чести патологични варианта в България, както и при контролните ДНК проби. След получаване на данни за алелите на маркерите при всяка проба беше проведен анализ на степента на хетерозиготност в изследваната популация (Фигура 30). Резултатите показват, че за пет от шестте маркера над половината от индивидите носят хетерозиготен генотип. Това означава, че подбраните маркери могат да бъдат използвани за статистически анализ и са подходящи за проследяване на унаследяването на *TTR* вариантите в нашата популация.

Бяха анализирани алелните честоти на микросателитните маркери в подгрупите на АТТ_{Rv} пациентите, носещи всеки от четирите *TTR* патологични варианта (Glu89Gln, Val30Met, Ser77Phe, Gly47Glu). Най-честите алели бяха наречени алели на хипотетичен хаплотип на родоначалника и техните честоти бяха сравнени в подгрупите на нормалните роднини и контролната група (Таблица 22). Резултатите показаха, че тези алели се срещат преимуществено в групата на АТТ_{Rv} пациентите. Наличието на ефект на родоначалника обикновено води до неравновесна скаченост (*linkage disequilibrium*) между алелите на определени локуси, унаследени от родоначалния индивид. Този ефект би обяснил разликата между наблюдаваните алелни честоти и честотите, които биха били очаквани при наличие на случайна алелна асоциация (равновесие на Харди-Вайнберг¹¹³).



Фигура 30. Процентна хетерозиготност на избраните микросателитни маркери в изследваната популация. Процентната хетерозиготност на маркер L4 е малко по-ниска от 50% (46.19%), поради което беше решено този маркер да не се изключва от изследването.

Таблица 22. Честота на алелите на хипотетичния хаплотип на родоначалника за *TTR* вариантите *Glu89Gln*, *Val30Met*, *Ser77Phe* и *Gly47Glu*.

	<i>D18S49</i>	<i>L1</i>	<i>L4</i>	<i>L8</i>	<i>L9</i>	<i>D18S47</i>
Glu89Gln	<i>115 bp</i>	<i>245bp</i>	<i>267bp</i>	<i>292bp</i>	<i>324bp</i>	<i>202bp</i>
<i>Glu89Gln</i> пациенти (<i>N=36</i>)	0.50	0.32	0.72	0.50	0.40	0.39
<i>Здрави роднини</i> (<i>N=31</i>)	0.08	0.00	0.48	0.25	0.21	0.29
<i>Контролна група</i> (<i>N=40</i>)	0.01	0.03	0.00	0.19	0.08	0.01
Val30Met	<i>104 bp</i>	<i>242bp</i>	<i>262bp</i>	<i>291bp</i>	<i>323bp</i>	<i>198bp</i>
<i>Val30Met</i> пациенти (<i>N=26</i>)	0.35	0.48	0.58	0.46	0.40	0.56
<i>Здрави роднини</i> (<i>N=15</i>)	0.30	0.10	0.57	0.43	0.27	0.67
<i>Контролна група</i> (<i>N=40</i>)	0.10	0.10	0.34	0.34	0.14	0.46
Ser77Phe	<i>107bp</i>	<i>244bp</i>	<i>264bp</i>	<i>291bp</i>	<i>323bp</i>	<i>198 bp</i>
<i>Ser77Phe</i> пациенти (<i>N=25</i>)	0.52	0.28	0.88	0.56	0.48	0.78
<i>Здрави роднини</i> (<i>N=18</i>)	0.08	0.17	0.78	0.47	0.33	0.50
<i>Контролна група</i> (<i>N=40</i>)	0.35	0.03	0.46	0.34	0.14	0.46
Gly47Glu	<i>104bp</i>	<i>242bp</i>	<i>262bp</i>	<i>295bp</i>	<i>307bp</i>	<i>202 bp</i>
<i>Gly47Glu</i> пациенти (<i>N=6</i>)	0.67	0.58	0.58	0.50	0.25	0.67
<i>Здрави роднини</i> (<i>N=8</i>)	0.44	0.13	0.44	0.06	0.06	0.13
<i>Контролна група</i> (<i>N=40</i>)	0.10	0.10	0.34	0.06	0.00	0.43

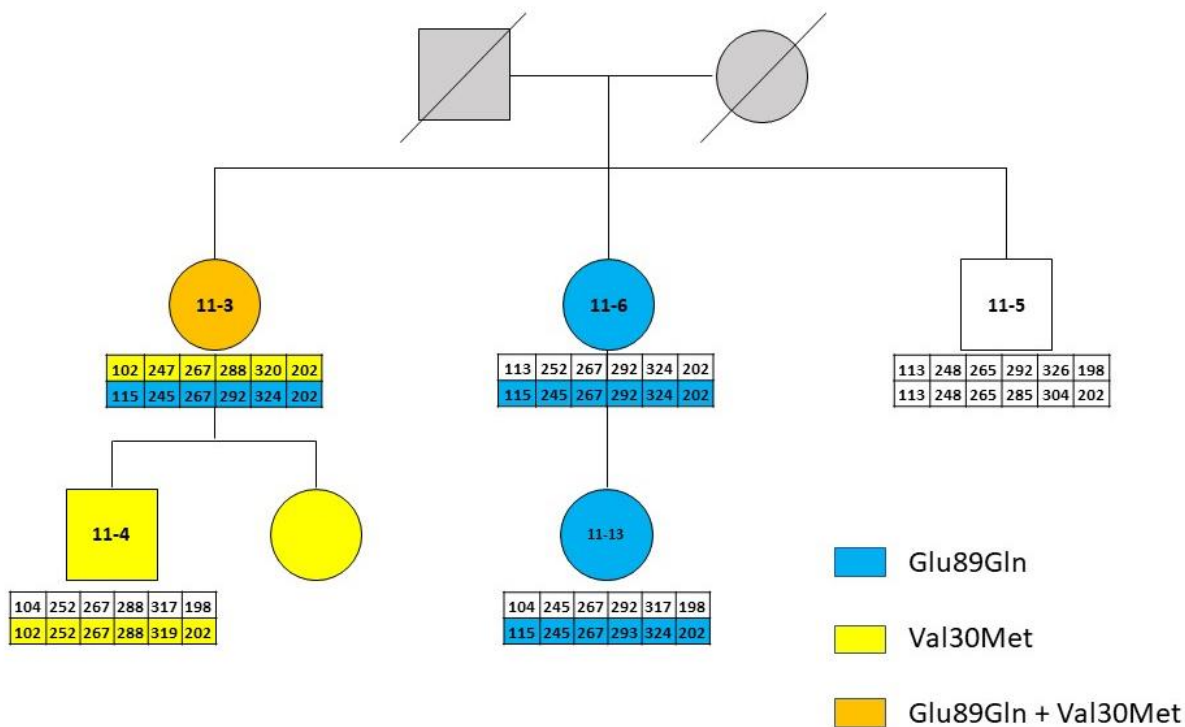
4.4.2. Реконструкция на хаплотипа

На базата на резултатите от проведения фрагментен анализ беше извършена теоретична реконструкция на хаплотипа на всеки от индивидите в подгрупите пациенти, здрави роднини и контроли чрез ELB алгоритъма на програмата Arlequin v.3.01. Беше доказано, че най-честите математически реконструирани хаплотипове за ATTRv пациентите се състоят от алелите на хипотетичния хаплотип на родоначалника и тези хаплотипове отново се срещат предимно само в групата на пациентите. Резултатите са обобщени в Таблица 23.

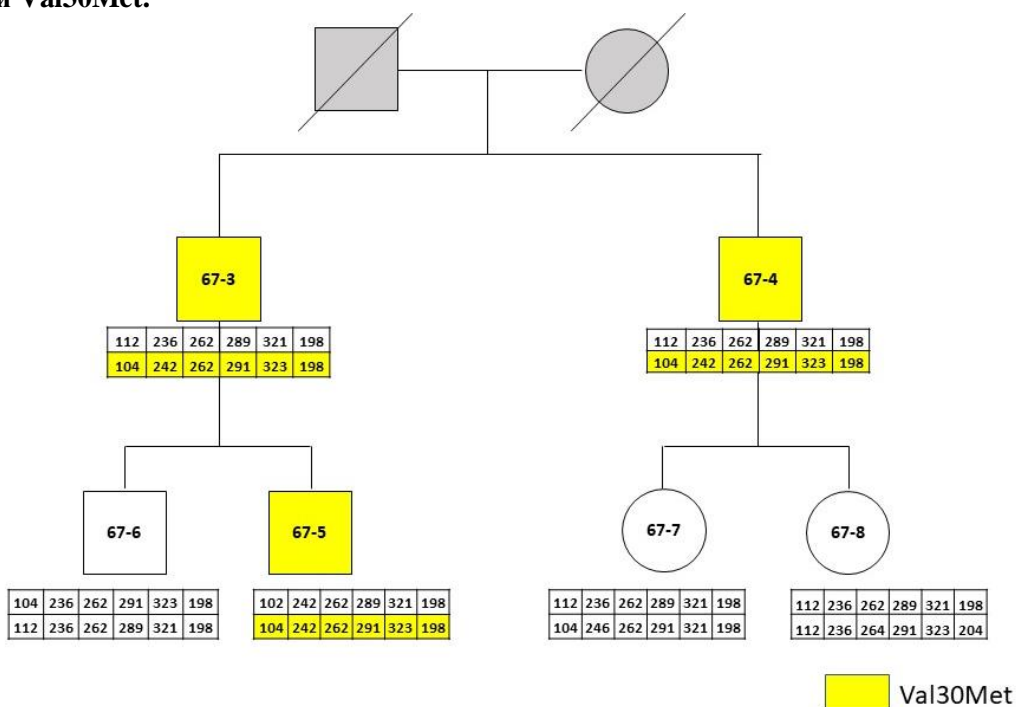
Таблица 23. Най-чести хаплотипове за изследваните TTR варианти Glu89Gln, Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu в изследваните ATTRv семейства.

D18S49	L1	L4	TTR			D18S47	ATTRv пациенти	Здрави роднини
			патологичен вариант	L8	L9			
115	245	267	<i>Glu89Gln</i>	292	324	202	37%	0%
104	242	262	<i>Val30Met</i>	291	323	198	27%	0%
107	244	264	<i>Ser77Phe</i>	291	323	198	23%	0%
104	242	262	<i>Gly47Glu</i>	295	307	202	21%	7%

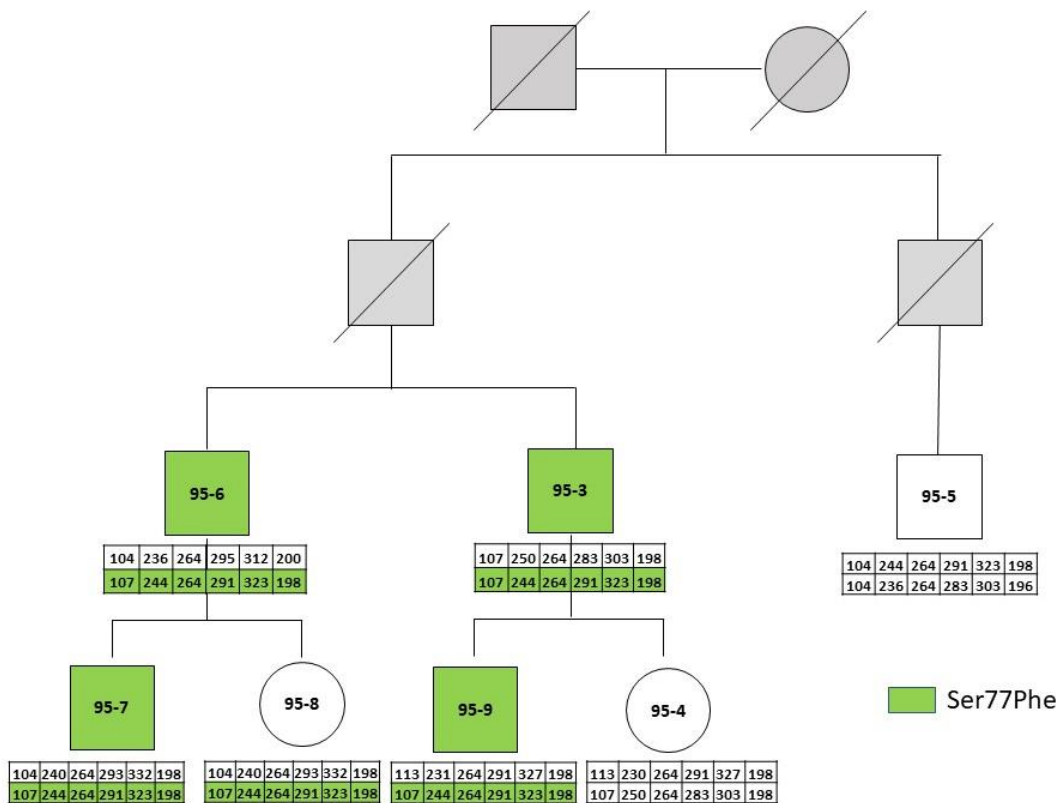
На Фигури 31, 32 и 33 са подбрани родословията на някои от изследваните семейства за демонстрация на унаследяването на реконструирани хаплотипове в поколението и зависимостта от носителството на конкретен TTR патологичен вариант. От особен интерес е семейството, при което е отрит двойният хетерозиготен носител Glu89Gln / Val30Met. Забелязва се, че скаченият хаплотип с алела Val30Met в това семейство е претърпял разпад в сравнение с теоретичния хаплотип на родоначалника, определен спрямо всички Val30Met носители.



Фигура 31. Родословно дърво и унаследяване на хаплотипа при семейство с носителство на Glu89Gln и Val30Met.



Фигура 32. Родословно дърво и унаследяване на хаплотипа при семейство с носителство на Val30Met.



Фигура 33. Родословно дърво и унаследяване на хаплотипа при семейство с носителство на Ser77Phe.

4.4.3. Статистическа оценка

Таблица 24. Резултати от проведения Хи-квадрат тест на Пийърсън. Показани са р-стойностите при алфа ниво на значимост 0.05.

<i>TTR</i> патогенен вариант	<i>D18S49</i> Родоначален алел	<i>L1</i> Родоначален алел	<i>L4</i> Родоначален алел	<i>L8</i> Родоначален алел	<i>L9</i> Родоначален алел	<i>D18S47</i> Родоначален алел
<i>Glu89Gln</i>	<0.0001	<0.0001	0.0050	0.0040	0.0160	<0.0001
<i>Val30Met</i>	0.0034	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0010
<i>Ser77Phe</i>	<0.0001	0.0010	0.0110	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<i>Gly47Glu</i>	0.0170	<0.0001	0.0170	<0.0001	0.0180	<0.0001

На базата на данните за алелните честоти на микросателитните маркери сред подгрупите на ATTRv пациенти, здрави роднини и контроли беше направена статистическата оценка на хипотезата за наличие на ефект на родоначалника за всеки от четирите *TTR* патологични варианти. Проведеният Хи-квадрат тест показва наличие на асоциация между тестваните променливи (*TTR* статус и носителство на алелите на

хипотетичния родоначалник). Съответните р-стойности бяха разгледани при алфа ниво на значимост 0.05 (Таблица 24).

4.4.4. Определяне „възраст на мутацията“ – възрастта на най-скорошния общ предшественик

На базата на реконструкцията на хаплотиповете, извършена в хода на настоящата работа беше проведена математическа симулация за определяне на теоретичната възраст на най-скорошния общ предшественик за всеки от изследваните патологични варианти в *TTR* гена. Бяха анализирани данни за разпада на хипотетичния хаплотип на родоначалника чрез софтуера DMLE+ v.2.3. Беше взета предвид честотата на рекомбинация между изследваните локуси, базирана на данните от относителната локализация на изследваните микросателитни маркери спрямо всеки от патологичните *TTR* варианти. Резултатите представени в Таблица 25 са при 95% интервал на сигурност („*confidence interval*“) и с приближението, че едно поколение се равнява на 25 години¹¹⁴.

Таблица 25. Резултати от изчисленията на възрастта на най-скорошния общ предшественик представени в брой поколения. Едно поколение се равнява на 25 години.

<i>TTR</i> патологичен вариант	Средна възраст на най-скорошния общ предшественик (брой поколения)	Възраст с 95% интервал на сигурност
<i>Glu89Gln</i>	45	38-52
<i>Val30Met</i>	47	36-58
<i>Ser77Phe</i>	43	34-52
<i>Gly47Glu</i>	32	24-40

Проведените молекулярно-генетични и статистически изследвания показват с голяма степен на вероятност наличието на ефект на родоначалника за изследваните патологични варианти в *TTR* гена *Glu89Gln*, *Val30Met*, *Ser77Phe* и *Gly47Glu*. Силите, които действат върху популациите и могат до доведат до загуба на генетично разнообразие и до наличието на ефект на родоначалника за определен генетичен дефект включват кумулативното действие на миграции, бедствия, географска или културна изолация на населението от популацията¹¹⁵. В допълнение на т.нар. генетичен дрифт,

ATTRv е заболяване с късно начало, което не позволява действието на силите на естествения отбор да окажат влияние върху отпадането на патологичните *TTR* варианти от популацията. По отношение на Glu89Gln, предварителните данни за наличието на ясен ендемичен регион за този генетичен вариант в Южна България бяха подкрепени категорично от резултатите от хаплотипния анализ. От това стана ясно, че всички Glu89Gln пациенти най-вероятно произхождат от един общ предшественик, внесъл този вариант в нашата популация теоретично преди около 45 поколения. Вариантът Glu89Gln се среща предимно в Сицилия, Сардиния и Европейската част на Турция⁶⁸. Това географско разпределение в контекста на минали миграционни събития в района на Балканите и Средиземно море биха обяснили данните за ефект на родоначалника за Glu89Gln в България.

Val30Met вариантът показва по-разпръснато географско разпространение, в сравнение с другите ATTRv патологични варианти в България. Резултатите от хаплотипния анализ и теоретичното изчисление на възрастта на най-скорошния общ предшественик показват, че хипотетичният родоначалник, който би могъл да е внесъл Val30Met в нашата популация се е появил по-рано в сравнение с другите „родоначалници“. Пациентите с Val30Met показват по-голяма степен на разпад на хипотетичния хаплотип на родоначалника, което би могло да корелира с по-голяма „възраст на мутацията“. Val30Met е докладван в редица ендемични региони по света, включително Португалия, Испания, Италия, Швеция и Япония. В някои от тези страни са провеждани подобни популационно-генетични изследвания, поради което беше възможно да се направи сравнение между българския Val30Met хаплотип и публикувани хаплотипни данни от други популации^{76,78,79}. Резултатите са обобщени в Таблица 26. Българските Val30Met пациенти се различават значително спрямо пациентите от другите ендемични региони. Причината за това би могла да е по-далечния генетичен произход на българския Val30Met родоначалник. От друга страна, тъй като локусът на този генетичен вариант се приема за мутационна гореща точка, не е изключено Val30Met да е възникнал независимо по нашите земи като отделно генетично събитие. За сравнение, Бразилските и Португалските пациенти с Val30Met са с доказан общ произход⁷⁶.

Таблица 26. Сравнение между Val30Met хаплотиповете от различни ендемични популации по света. *За испанските, шведските и японските пациенти няма данни за маркерите D18S49 и D18S47.

<i>Val30Met</i> <i>хаплотип</i>	D18S49	L1	L4	L8	L9	D18S47
<i>България</i>	104	242	262	291	323	198
<i>Италия</i>	122	237	271	297	311	202
<i>Португалия</i>	113	237	271	291	311	202
<i>Бразилия</i>	113	237	271	291	311	202
<i>Испания</i>	*	235	271	291	321	*
<i>Япония</i>	*	235/237	271	299/305	311/327	*
<i>Швеция</i>	*	241	271	303	329	*

Българските пациенти с Val30Met показват смесен и относително лек фенотип (съществуват случаи с начало на заболяването над 70 годишна възраст), което затруднява снемането на фамилна анамнеза и може да усложни поставянето на точна диагноза и затруднява изследването на епидемиологията на заболяването. Въз основа на няколко проучвания върху Val30Met пациенти от Япония и Португалия може да се заключи, че се наблюдават по-ранна възраст на начало на болестта и по-тежка клинична изява при пациентите, за които е известно, че произхождат от ендемични за болестта региони, за разлика от така наречените „спорадични“ случаи без фамилна история за заболяването^{116,117}. Вероятно по-късната възраст на начало на ATTRv и по-леката клинична проява при някои от пациентите с Val30Met са причините, поради които някои от тези случаи имат трудна за проследяване семейна история и се считат за спорадични. От друга страна, в Швеция съществуват два отделни ендемични региона за Val30Met, при които се наблюдават разлики във възрастта на начало на заболяването спрямо района на произход¹¹⁸.

Семействата с варианта Ser77Phe в България произхождат от ясно очертан ендемичен регион (село Вакарел) и за тях също беше доказано, че най-вероятно произхождат от общ предшественик. Честотата на алелите на хипотетичния хаплотип на родоначалника се срещат с висока честота при носителите на Ser77Phe и най-вероятно този вариант се е появил в популацията по-скоро в сравнение с Glu89Gln и Val30Met. Вариантът Ser77Phe е докладван още във Френската популация¹¹⁹. В допълнение, на

същата генна позиция съществува описан и друг патологичен амилоидогенен вариант Ser77Tyr¹²⁰. Вероятно този локус също представлява гореща точка за натрупване на варианти в *TTR* гена.

Анализът на двете семейства, в които се открива вариантът Gly47Glu показва, че те най-вероятно произхождат от един общ предшественик. Въпреки това, липсата на други засегнати Gly47Glu семейства и отрицателните резултати от скрининга при новородени от региона на произход двете Gly47Glu семейства са доказателство, че хипотезата за ендемичен за Ромското население АТТ_{Rv} регион с характерен за него генетичен вариант по-скоро трябва да се отхвърли. Значително по-агресивният характер на този патологичен вариант, който се характеризира с начало на заболяването около 20-30 годишна възраст вероятно са причината за ниската честота в България, което потенциално би означавало отпадане на тази мутация от популацията с времето.

Произходът на АТТ_{Rv} пациентите оказва влияние върху очакваното проявление на болестта. Хипотезата за наличие на генетични и епигенетични фактори с влияние върху хетерогенността на клиничната изява на заболяването трябва да се изследва в контекста на различни подгрупи пациенти, които са носители на един и същ *TTR* вариант^{48,49,78}. Бъдещи сравнителни проучвания между АТТ_{Rv} популации, носители на различни от Val30Met патогенни варианти на *TTR* гена биха ни дали по-подробна картина за епидемиологията, разпространението и изявата на АТТ_{Rv} в света.

4.5. Обобщение на резултатите и заключение

Изследванията, проведени в рамките на настоящия дисертационен труд обхващат различни аспекти по отношение на разпространението, клиничната проява и молекулярните механизми на патогенеза при пациенти с наследствена транстиретинова амилоидоза в България. Патологичният *TTR* вариант Glu89Gln остава най-честият генетичен дефект, причиняващ АТТ_{Rv} сред нашите пациенти. Въпреки това, генофондът по отношение на амилоидогенни варианти в този малък ген беше допълнен с нов за страната вариант Glu54Leu. Високият дял положителни безсимптомни носители сред групата на роднините на пациентите доказва необходимостта от скрининг в засегнатите семейства с цел поставяне на навременна диагноза. Отрицателните резултати от скрининга при новородени от ромски произход от региона на град Полски Тръмбеш и

Русе отхвърлиха хипотетичната ендемичност за варианта Gly47Glu, с което вариантите, за които има доказани ендемични региони в България остават Glu89Gln, Val30Met и Ser77Phe.

Беше направено генотипизиране на чести полиморфизми върху 18-та хромозома в близост то *TTR* гена с потенциален модифициращ болестта ефект при пациенти с Glu89Gln. Резултатите от анализа показаха наличие на статистическа корелация между възрастта на начало на заболяването и носителството на алел Т на полиморфизма rs1791228, който показва хипотетичен протективен ефект за манифестиране на болестта. По-детайлното разглеждане на двете генотипни групи по отношение на този генетичен вариант в 3' нетранслируемия участък на *TTR* гена показва, че носителите на алел Т имат средна възраст на начало на заболяването само с две години по-голяма от тази при хомозиготните носители на по-честия С алел. Вероятно включването на повече пациенти от групата на ранния тип ATTRv би внесло корекции в наблюдаваните статистически резултати. Анализ на ефекта на rs1791228 върху първоначалното системно засягане в изследваната кохорта показва увеличение на дяла пациенти носители на алел Т с първоначално сърдечно и смесено засягане. Наблюдаваните резултати до голяма степен съвпадат със съобщаваните в литературата данни, но предложените молекулни механизми все още не са достатъчно добре проучени за да може да се направи достоверен извод за ефекта на този полиморфизъм върху развитието на ATTRv.

Проведеният анализ на транстиретиновата генна експресия върху проби от кръв и урина на Glu89Gln пациенти постави обещаващи основи за изучаването на механизмите на патогенеза в контекста на българския ATTRv фенотип. Беше установен смесен биалелен транскрипционен профил с различни съотношения между мутантен и див тип транстиретин, което хипотетично би могло да има отношение върху прогресията на заболяването. От изключително значение беше установяването и на моноалелна експресия при 87% от пробите от кръвна плазма и при 58% от пробите от урина. Съвместно с тези резултати и резултатите от изследването двама монозиготни близнака беше предложен хипотетичен механизъм за възраст-зависима алел-специфична генна експресия, който включва първоначална експресия на дивия тип алел, която постепенно се замества от експресия на мутантния алел. Въпреки, че са необходими още изследвания за изясняване на връзката между конкретния наблюдаван експресионен профил и развитието на ATTRv,

бяха поставени основи за проучвания върху молекулярни методи за прогностика на прогресията на заболяването.

Хаплотипният анализ на скачени с *TTR* гена генетични микросателитни маркери потвърди математически и статистически хипотезата за наличие на ефект на родоначалника за изследваните групи пациенти, носители на *TTR* вариантите Glu89Gln, Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu. Наблюдаваните разлики в разпада на хипотетичния прародителски хаплотип съвпадат с данните от разпространението и степента на разпръснатост на ендемичните региони в страната. Беше изчислена теоретичната възраст на най-скорошния общ предшественик за четирите вариантни групи, при което беше установено, че Val30Met е внесен най-отдавна в нашата популация. Резултатите от проведените популационно-генетични изследвания показаха наличието на уникален за света генетичен профил при българските *ATTRv* пациенти, който е потенциален материал за изследване на все още недостатъчно добре проучените разлики във фенотипната изява на заболяването.

5. ИЗВОДИ

- 5.1. Екзони 2 и 3 на *TTR* гена остават доказана гореща точка на натрупване на амилоидогенни варианти, причиняващи наследствена транстиретинова амилоидоза сред българските пациенти. Поради това, диагностичният алгоритъм за генетично тестване трябва да включва първоначално изследване на горещия регион, с последващ анализ на екзони 1 и 4 при наличие на убедителни клинични показания.
- 5.2. Двете засегнати Gly47Glu семейства са най-вероятно близкородствени и наличието на този вариант е резултат от скорошно единично мутационно събитие, с което хипотезата за наличие на ендемичен регион за Gly47Glu сред ромското население в Северна България се отхвърля.
- 5.3. Възрастта на начало на заболяването при ATTRv пациенти с Glu89Gln е в статистически значима корелация с генотипа по отношение на полиморфизма rs1791228, като този маркер показва и математическа връзка с наличието на първоначално сърдечно и смесено засягане. Данните от проведените изследвания съвпадат със съобщаваните в литературата корелации, но са необходими допълнителни проучвания за да може да се направи достоверен извод за ефекта полиморфизма rs1791228 върху развитието на ATTRv.
- 5.4. Смесеният транстиретинов транскрипционен профил (моно- и биалелна експресия) на изследваните проби от кръвна плазма и урина на пациенти с Glu89Gln показва частична корелация с клиничната изява на заболяването. Предложеният хипотетичен механизъм за възраст-зависима алел-специфична генна експресия включва първоначална експресия на дивия тип алел, която постепенно се измества към експресия на мутантния алел.

- 5.5. Детайлното анализиране на транстиретиновата експресия и нейното проследяване в хода на заболяването би могло да послужи като прогностичен маркер за развитието на ATTR ν , но механизмът на амилоидогенеза и тъканно засягане включва съвкупност и от множество други молекулни фактори (генетични и епигенетични).
- 5.6. Българският генофонд е уникален по отношение на произхода и епидемиологията на най-честите амилоидогенни *TTR* варианти за българската популация Glu89Gln, Ser77Phe и Val30Met, за които беше доказано достоверно наличието на ефект на родоначалника. Степента на разпръснатост на популацията от ATTR ν пациенти от ендемичните региони съвпада с разпада на хипотетичния хаплотип на родоначалника и теоретично изчислената „възраст на мутацията“.

6. ПРИНОСИ

Приноси с научно-приложен характер:

- 6.1. Генофондът по отношение на амилоидогенни варианти в *TTR* гена беше допълнен с нов за страната вариант Glu54Leu, който предстои да бъде фенотипно охарактеризиран и проследен в популацията.
- 6.2. Беше доказана уникалността на българския популационно-генетичен профил в сравнение с други *ATTRv* ендемични популации по света, което дава база за провеждане на изследвания, свързани с хетерогенността на клиничната изява на заболяването.

Приноси с методичен характер:

- 6.3. Беше разработен метод за качествено и количествено изследване на транстиретиновия транскрипт в лесно достъпен клиничен материал (кръвна плазма и урина). Методът позволява сравнителен анализ на алел-специфичната транстиретинова експресия, което потенциално може да послужи като маркер за прогресията на заболяването.
- 6.4. Успешно беше избран подход за изследване на ефект на родоначалника чрез прилагане на ELB алгоритъм за теоретична реконструкция на хаплотипове, който позволява анализ на големи извадки от данни за провеждане на редица популационно-генетични и корелационни изследвания.

7. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

7.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Kirov A, Sarafov S, **Pavlova Z**, Todorov T, Chamova T, Gospodinova M, Tournev I, Mitev V, Todorova A. Founder effect of the Glu89Gln TTR mutation in the Bulgarian population. *Amyloid*. 2019 Dec 26(4):181-185. doi: 10.1080/13506129.2019.1634539
Импакт фактор (2019): 4.323 **Забелязани цитирания: 10**
2. Yordanova I, **Pavlova Z**, Kirov A, Todorov T, Alexiev A, Sarafov S, Mateva L, Chamova T, Gospodinova M, Mitev V, Tournev I, Todorova A. Monoallelic expression of the TTR gene as a contributor to the age at onset and penetrance of TTR-related amyloidosis. *Gene*. 2019 Jul 15;705:16-21. doi: 10.1016/j.gene.2019.04.030.
Импакт фактор (2019): 2.984 **Забелязани цитирания: 3**
3. **Pavlova Z**, Sarafov S, Todorov T, Kirov A, Chamova T, Gospodinova M, Tournev I, Mitev V, Todorova A. Characterization of population genetic structure of hereditary transthyretin amyloidosis in Bulgaria. *Amyloid*. 2021 Dec 28(4):219-225. doi: 10.1080/13506129.2021.1935230
Импакт фактор (2021): 6.571 **Забелязани цитирания: 1**

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 13.878

7.2. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Pavlova Z**, Kirov A, Sarafov S, Todorov T, Chamova T, Gospodinova M, Mitev V, Tournev I, Todorova A. Prevalence of the Glu89Gln *TTR* mutation in the Bulgarian ATTR patients and investigation of possible founder effect. Poster presentation at ARiA VIII symposium 2019.
2. **Pavlova Z**, Todorov T, Chamova T, Gospodinova M, Mitev V, Tournev I, Todorova A. Population genetic profiling of hereditary transthyretin amyloidosis in Bulgaria and possible non-coding genetic modifiers. Poster presentation at ESHG Conference, June 11-14, 2022, Vienna, Austria (P20.013.C).

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Luigetti M, Romano A, Di Paolantonio A, Bisogni G, Sabatelli M. Diagnosis and Treatment of Hereditary Transthyretin Amyloidosis (hATTR) Polyneuropathy: Current Perspectives on Improving Patient Care. *Ther Clin Risk Manag.* 2020;16:109-123. doi:10.2147/TCRM.S219979
2. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, et al. Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid.* 2020;27(4):217-222. doi:10.1080/13506129.2020.1835263
3. Pinney JH, Whelan CJ, Petrie A, et al. Senile Systemic Amyloidosis: Clinical Features at Presentation and Outcome. *Journal of the American Heart Association.* 2(2):e000098. doi:10.1161/JAHA.113.000098
4. Koike H, Katsuno M. Transthyretin Amyloidosis: Update on the Clinical Spectrum, Pathogenesis, and Disease-Modifying Therapies. *Neurol Ther.* 2020;9(2):317-333. doi:10.1007/s40120-020-00210-7
5. Planté-Bordeneuve V, Said G. Familial amyloid polyneuropathy. *The Lancet Neurology.* 2011;10(12):1086-1097. doi:10.1016/S1474-4422(11)70246-0
6. Gonzalez-Duarte A, Ulloa-Aguirre A. A Brief Journey through Protein Misfolding in Transthyretin Amyloidosis (ATTR Amyloidosis). *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(23):13158. doi:10.3390/ijms222313158
7. Gasperini RJ, Klaver DW, Hou X, Aguilar MI, Small DH. Mechanisms of Transthyretin Aggregation and Toxicity. In: Harris JR, ed. *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease.* Subcellular Biochemistry. Springer Netherlands; 2012:211-224. doi:10.1007/978-94-007-5416-4_9
8. Bank RPD. RCSB PDB - 1BM7: HUMAN TRANSTHYRETIN (PREALBUMIN) COMPLEX WITH FLUFENAMIC ACID (2-[[3-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]AMINO] BENZOIC ACID). Accessed February 19, 2022. <https://www.rcsb.org/structure/1BM7>
9. Suhr OB, Lundgren E, Westermark P. One mutation, two distinct disease variants: unravelling the impact of transthyretin amyloid fibril composition. *J Intern Med.* 2017;281(4):337-347. doi:10.1111/joim.12585
10. Ihse E, Ybo A, Suhr O, Lindqvist P, Backman C, Westermark P. Amyloid fibril composition is related to the phenotype of hereditary transthyretin V30M amyloidosis. *J Pathol.* 2008;216(2):253-261. doi:10.1002/path.2411
11. Plante-Bordeneuve V. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy: an update. *J Neurol.* 2018;265(4):976-983. doi:10.1007/s00415-017-8708-4
12. Leach BI, Zhang X, Kelly JW, Dyson HJ, Wright PE. NMR Measurements Reveal the Structural Basis of Transthyretin Destabilization by Pathogenic Mutations. *Biochemistry.* 2018;57(30):4421-4430. doi:10.1021/acs.biochem.8b00642
13. Schmidt M, Wiese S, Adak V, et al. Cryo-EM structure of a transthyretin-derived amyloid fibril from a patient with hereditary ATTR amyloidosis. *Nat Commun.* 2019;10(1):5008. doi:10.1038/s41467-019-13038-z

14. Adams D, Koike H, Slama M, Coelho T. Hereditary transthyretin amyloidosis: a model of medical progress for a fatal disease. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(7):387-404. doi:10.1038/s41582-019-0210-4
15. Koike H, Misu K, Sugiura M, et al. Pathology of early- vs late-onset TTR Met30 familial amyloid polyneuropathy. *Neurology.* 2004;63(1):129-138. doi:10.1212/01.wnl.0000132966.36437.12
16. Национален консенсус за диагностика, лечение, проследяване и профилактика на херeditарната транстиретиновата амилоидоза. Accessed February 5, 2022. <http://www.nevrologiabg.com/wp-content/uploads/2019/06/BN-t20-supl-8-HTTRA.pdf>
17. Ando Y, Coelho T, Berk JL, et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2013;8(1):31. doi:10.1186/1750-1172-8-31
18. Conceição I, González-Duarte A, Obici L, et al. “Red-flag” symptom clusters in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2016;21(1):5-9. doi:10.1111/jns.12153
19. Nakov R, Sarafov S, Nakov V, et al. Gastrointestinal Manifestations in Hereditary Transthyretin Amyloidosis associated with Glu89Gln Mutation. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2019;28(4):421-426. doi:10.15403/jgld-362
20. Господинова М, Кинова Е, Симова Я, et al. Диагностичен алгоритъм при транстиретинова амилоидоза с кардиомиопатия Diagnostic algorithm in transthyretin amyloidosis with cardiomyopathy. *Българска Кардиология.* 2020;26(2):5-20. doi:10.3897/bgcardio.26.e53407
21. Mitsuhashi S, Yazaki M, Tokuda T, et al. Biochemical characteristics of variant transthyretins causing hereditary leptomeningeal amyloidosis. *Amyloid.* 2005;12(4):216-225. doi:10.1080/13506120500352404
22. Dyck PJB, González-Duarte A, Obici L, et al. Development of measures of polyneuropathy impairment in hATTR amyloidosis: From NIS to mNIS + 7. *Journal of the Neurological Sciences.* 2019;405:116424. doi:10.1016/j.jns.2019.116424
23. Adams D, Ando Y, Beirão JM, et al. Expert consensus recommendations to improve diagnosis of ATTR amyloidosis with polyneuropathy. *J Neurol.* 2021;268(6):2109-2122. doi:10.1007/s00415-019-09688-0
24. Gillmore JD, Damy T, Fontana M, et al. A new staging system for cardiac transthyretin amyloidosis. *Eur Heart J.* 2018;39(30):2799-2806. doi:10.1093/eurheartj/ehx589
25. Mutations in Hereditary Amyloidosis. Accessed February 12, 2022. <http://amyloidosismutations.com/>
26. TTR (transthyretin). Accessed February 19, 2022. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_TTR.html
27. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. Accessed February 19, 2022. <https://www.genecards.org/>
28. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-5467.

29. Ericzon BG, Wilczek HE, Larsson M, et al. Liver Transplantation for Hereditary Transthyretin Amyloidosis: After 20 Years Still the Best Therapeutic Alternative? *Transplantation*. 2015;99(9):1847-1854. doi:10.1097/TP.0000000000000574
30. Jones D. Modifying protein misfolding. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(11):825-827. doi:10.1038/nrd3316
31. Berk JL, Suhr OB, Obici L, et al. Repurposing Diflunisal for Familial Amyloid Polyneuropathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2013;310(24):2658-2667. doi:10.1001/jama.2013.283815
32. Zimmermann TS, Lee ACH, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006;441(7089):111-114. doi:10.1038/nature04688
33. Adams D, Suhr OB, Dyck PJ, et al. Trial design and rationale for APOLLO, a Phase 3, placebo-controlled study of patisiran in patients with hereditary ATTR amyloidosis with polyneuropathy. *BMC Neurol*. 2017;17(1):181. doi:10.1186/s12883-017-0948-5
34. Brannagan TH, Wang AK, Coelho T, et al. Early data on long-term efficacy and safety of inotersen in patients with hereditary transthyretin amyloidosis: a 2-year update from the open-label extension of the NEURO-TTR trial. *Eur J Neurol*. 2020;27(8):1374-1381. doi:10.1111/ene.14285
35. Marcoux J, Mangione P, Porcari R, et al. Mechano-enzymatic cleavage and TTR amyloidogenesis. Published 2017. Accessed February 20, 2022. <https://www.semanticscholar.org/paper/Mechano-enzymatic-cleavage-and-TTR-amyloidogenesis-Marcoux-Mangione/39fe698a5fad249b112f41c6bb7b2b1a74a8bf1f>
36. Misumi Y, Ando Y, Ueda M, et al. Chain reaction of amyloid fibril formation with induction of basement membrane in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Pathol*. 2009;219(4):481-490. doi:10.1002/path.2618
37. Koike H, Katsuno M. Ultrastructure in Transthyretin Amyloidosis: From Pathophysiology to Therapeutic Insights. *Biomedicines*. 2019;7(1):E11. doi:10.3390/biomedicines7010011
38. Koike H, Ikeda S, Takahashi M, et al. Schwann cell and endothelial cell damage in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*. 2016;87(21):2220-2229. doi:10.1212/WNL.0000000000003362
39. Azevedo EP, Guimaraes-Costa AB, Bandeira-Melo C, et al. Inflammatory profiling of patients with familial amyloid polyneuropathy. *BMC Neurol*. 2019;19:146. doi:10.1186/s12883-019-1369-4
40. Huang YM, Hong XZ, Shen J, et al. Amyloids in Site-Specific Autoimmune Reactions and Inflammatory Responses. *Frontiers in Immunology*. 2020;10. Accessed February 21, 2022. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02980>
41. Bezerra F, Saraiva MJ, Almeida MR. Modulation of the Mechanisms Driving Transthyretin Amyloidosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2020;13:234. doi:10.3389/fnmol.2020.592644
42. Hammarström P, Sekijima Y, White JT, et al. D18G transthyretin is monomeric, aggregation prone, and not detectable in plasma and cerebrospinal fluid: a prescription for central nervous system amyloidosis? *Biochemistry*. 2003;42(22):6656-6663. doi:10.1021/bi027319b

43. Sekijima Y, Hammarström P, Matsumura M, et al. Energetic characteristics of the new transthyretin variant A25T may explain its atypical central nervous system pathology. *Lab Invest.* 2003;83(3):409-417. doi:10.1097/01.lab.0000059937.11023.1f
44. Costa G da, Ribeiro-Silva C, Ribeiro R, et al. Transthyretin Amyloidosis: Chaperone Concentration Changes and Increased Proteolysis in the Pathway to Disease. *PLOS ONE.* 2015;10(7):e0125392. doi:10.1371/journal.pone.0125392
45. Almeida MR, Alves IL, Terazaki H, Ando Y, Saraiva MJ. Comparative studies of two transthyretin variants with protective effects on familial amyloidotic polyneuropathy: TTR R104H and TTR T119M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270(3):1024-1028. doi:10.1006/bbrc.2000.2554
46. Sekijima Y, Dendle MT, Wiseman RL, White JT, D'haeze W, Kelly JW. R104H may suppress transthyretin amyloidogenesis by thermodynamic stabilization, but not by the kinetic mechanism characterizing T119 interallelic trans-suppression. *Amyloid.* 2006;13(2):57-66. doi:10.1080/13506120600722449
47. Sant'Anna R, Almeida MR, Varejão N, et al. Cavity filling mutations at the thyroxine-binding site dramatically increase transthyretin stability and prevent its aggregation. *Sci Rep.* 2017;7:44709. doi:10.1038/srep44709
48. Hellman U, Alarcon F, Lundgren HE, Suhr OB, Bonaiti-Pellié C, Planté-Bordeneuve V. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid.* 2008;15(3):181-186. doi:10.1080/13506120802193720
49. Bonaïti B, Olsson M, Hellman U, Suhr O, Bonaïti-Pellié C, Planté-Bordeneuve V. TTR familial amyloid polyneuropathy: does a mitochondrial polymorphism entirely explain the parent-of-origin difference in penetrance? *Eur J Hum Genet.* 2010;18(8):948-952. doi:10.1038/ejhg.2010.36
50. Population diversity of the genetically determined TTR expression in human tissues and its implications in TTR amyloidosis | BMC Genomics | Full Text. Accessed May 1, 2021. <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3646-1>
51. Non-coding variants contribute to the clinical heterogeneity of TTR amyloidosis | European Journal of Human Genetics. Accessed May 1, 2021. <https://www.nature.com/articles/ejhg201795>
52. Olsson M, Norgren N, Obayashi K, et al. A possible role for miRNA silencing in disease phenotype variation in Swedish transthyretin V30M carriers. *BMC Med Genet.* 2010;11:130. doi:10.1186/1471-2350-11-130
53. Vita GL, Aguenouz M, Polito F, et al. Circulating microRNAs Profile in Patients With Transthyretin Variant Amyloidosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2020;13. Accessed February 22, 2022. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2020.00102>
54. Alves-Ferreira M, Coelho T, Santos D, et al. A Trans-acting Factor May Modify Age at Onset in Familial Amyloid Polyneuropathy ATTRV30M in Portugal. *Mol Neurobiol.* 2018;55(5):3676-3683. doi:10.1007/s12035-017-0593-4
55. Alves-Ferreira M, Azevedo A, Coelho T, et al. Beyond Val30Met transthyretin (TTR): variants associated with age-at-onset in hereditary ATTRv amyloidosis. *Amyloid.* 2021;28(2):100-106. doi:10.1080/13506129.2020.1857236

56. Norgren N, Olsson M, Nyström H, et al. Gene expression profile in hereditary transthyretin amyloidosis: differences in targeted and source organs. *Amyloid*. 2014;21(2):113-119. doi:10.3109/13506129.2014.894908
57. THE GTEx CONSORTIUM. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science*. 2020;369(6509):1318-1330. doi:10.1126/science.aaz1776
58. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. Accessed February 22, 2022. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abh2169>
59. Allele specific expression of the transthyretin gene in swedish patients with hereditary transthyretin amyloidosis (ATTR V30M) is similar between the two alleles - PubMed. Accessed February 23, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23185504/>
60. Random monoallelic expression of autosomal genes: stochastic transcription and allele-level regulation | Nature Reviews Genetics. Accessed February 23, 2022. <https://www.nature.com/articles/nrg3888>
61. De Lillo A, Pathak GA, De Angelis F, et al. Epigenetic profiling of Italian patients identified methylation sites associated with hereditary transthyretin amyloidosis. *Clinical Epigenetics*. 2020;12(1):176. doi:10.1186/s13148-020-00967-6
62. Epigenomic Profiles of African-American Transthyretin Val122Ile Carriers Reveals Putatively Dysregulated Amyloid Mechanisms - PubMed. Accessed February 23, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33428857/>
63. Sousa A, Coelho T, Barros J, Sequeiros J. Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)-type I in Póvoa do Varzim and Vila do Conde (north of Portugal). *Am J Med Genet*. 1995;60(6):512-521. doi:10.1002/ajmg.1320600606
64. PayPerView: Familial Amyloidotic Polyneuropathy in Sweden: Geographical Distribution, Age of Onset, and Prevalence - Karger Publishers. Accessed February 13, 2022. <https://www.karger.com/Article/Pdf/154146>
65. Kato-Motozaki Y, Ono K, Shima K, et al. Epidemiology of familial amyloid polyneuropathy in Japan: Identification of a novel endemic focus. *J Neurol Sci*. 2008;270(1-2):133-140. doi:10.1016/j.jns.2008.02.019
66. Dardiotis E, Koutsou P, Papanicolaou EZ, et al. Epidemiological, clinical and genetic study of familial amyloidotic polyneuropathy in Cyprus. *Amyloid*. 2009;16(1):32-37. doi:10.1080/13506120802676948
67. Reinés JB, Vera TR, Martín MU, et al. Epidemiology of transthyretin-associated familial amyloid polyneuropathy in the Majorcan area: Son Llätzer Hospital descriptive study. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:29. doi:10.1186/1750-1172-9-29
68. Parman Y, Adams D, Obici L, et al. Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Curr Opin Neurol*. 2016;29 Suppl 1:S3-S13. doi:10.1097/WCO.0000000000000288
69. Zhen DB, Swiecicki PL, Zeldenrust SR, Dispenzieri A, Mauermann ML, Gertz MA. Frequencies and geographic distributions of genetic mutations in transthyretin- and non-transthyretin-related familial amyloidosis. *Clin Genet*. 2015;88(4):396-400. doi:10.1111/cge.12500

70. Liu G, Ni W, Wang H, et al. Clinical features of familial amyloid polyneuropathy carrying transthyretin mutations in four Chinese kindreds. *J Peripher Nerv Syst.* 2017;22(1):19-26. doi:10.1111/jns.12196
71. Schmidt HH, Waddington-Cruz M, Botteman MF, et al. Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve.* 2018;57(5):829-837. doi:10.1002/mus.26034
72. Koike H, Misu K ichiro, Ikeda S ichi, et al. Type I (transthyretin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form. *Arch Neurol.* 2002;59(11):1771-1776. doi:10.1001/archneur.59.11.1771
73. Chandrashekar P, Alhuneafat L, Mannello M, et al. Prevalence and Outcomes of p.Val142Ile TTR Amyloidosis Cardiomyopathy: A Systematic Review. *Circ Genom Precis Med.* 2021;14(5):e003356. doi:10.1161/CIRCGEN.121.003356
74. Waddington-Cruz M, Schmidt H, Botteman MF, et al. Epidemiological and clinical characteristics of symptomatic hereditary transthyretin amyloid polyneuropathy: a global case series. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2019;14(1):34. doi:10.1186/s13023-019-1000-1
75. Semigran MJ. Transthyretin Amyloidosis: A “Zebra” of Many Stripes. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(2):173-175. doi:10.1016/j.jacc.2016.05.020
76. Zaros C, Genin E, Hellman U, et al. On the origin of the transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Ann Hum Genet.* 2008;72(Pt 4):478-484. doi:10.1111/j.1469-1809.2008.00439.x
77. Conceição I, De Carvalho M. Clinical variability in type I familial amyloid polyneuropathy (Val30Met): comparison between late- and early-onset cases in Portugal. *Muscle Nerve.* 2007;35(1):116-118. doi:10.1002/mus.20644
78. Iorio A, De Angelis F, Di Girolamo M, et al. Most recent common ancestor of TTR Val30Met mutation in Italian population and its potential role in genotype-phenotype correlation. *Amyloid.* 2015;22(2):73-78. doi:10.3109/13506129.2014.994597
79. Ohmori H, Ando Y, Makita Y, et al. Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Med Genet.* 2004;41(4):e51. doi:10.1136/jmg.2003.014803
80. Soares ML, Coelho T, Sousa A, et al. Haplotypes and DNA sequence variation within and surrounding the transthyretin gene: genotype-phenotype correlations in familial amyloid polyneuropathy (V30M) in Portugal and Sweden. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(3):225-237. doi:10.1038/sj.ejhg.5201095
81. Kirov A, Sarafov S, Pavlova Z, et al. Founder effect of the Glu89Gln TTR mutation in the Bulgarian population. *Amyloid.* 2019;26(4):181-185. doi:10.1080/13506129.2019.1634539
82. Sarafov S, Gospodinova M, Velina VG, et al. Epidemiology of Familial Amyloid Polyneuropathy in Bulgaria. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2015;10(1):O2. doi:10.1186/1750-1172-10-S1-O2
83. Chamova T, Gospodinova M, Asenov O, et al. Seven Years of Selective Genetic Screening Program and Follow-Up of Asymptomatic Carriers With Hereditary

- Transthyretin Amyloidosis in Bulgaria. *Front Neurol.* 2022;13:844595. doi:10.3389/fneur.2022.844595
84. Sarafov S. *Clinico-Genetic and Epidemiologic Research in Hereditary Amyotrophic Lateral Sclerosis and Transthyretin Amyloidosis in Bulgaria.* MU Sofia; 2020.
 85. Gospodinova M, Kinova E, Simova I, et al. Diagnostic algorithm in transthyretin amyloidosis with cardiomyopathy. *Bulgarian Cardiology.* 2020;26:5-20. doi:10.3897/bgcardio.26.e53407
 86. Gentile L, Tournev I, Amass L, Chapman D, Mazzeo A, THAOS investigators. Phenotypic Differences of Glu89Gln Genotype in ATTR Amyloidosis From Endemic Loci: Update From THAOS. *Cardiol Ther.* 2021;10(2):481-490. doi:10.1007/s40119-021-00226-6
 87. Gospodinova M, Sarafov S, Guergueltcheva V, et al. Cardiac involvement and clinical follow up of patients with hereditary transthyretin related amyloidosis associated with Glu89Gln mutation. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2015;10(1):P54. doi:10.1186/1750-1172-10-S1-P54
 88. Cisneros-Barroso E, González-Moreno J, Rodríguez A, et al. Anticipation on age at onset in kindreds with hereditary ATTRV30M amyloidosis from the Majorcan cluster. *Amyloid.* 2020;27(4):254-258. doi:10.1080/13506129.2020.1789580
 89. Polimanti R, Di Girolamo M, Manfellotto D, Fuciarelli M. Functional variation of the transthyretin gene among human populations and its correlation with amyloidosis phenotypes. *Amyloid.* 2013;20(4):256-262. doi:10.3109/13506129.2013.844689
 90. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online.* 2007;1:47-50.
 91. F.R.S KP. X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science.* 1900;50(302):157-175. doi:10.1080/14786440009463897
 92. Reeve JP, Rannala B. DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping. *Bioinformatics.* 2002;18(6):894-895. doi:10.1093/bioinformatics/18.6.894
 93. Benson MD, Kincaid JC. The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle Nerve.* 2007;36(4):411-423. doi:10.1002/mus.20821
 94. Hellman U, Lång K, Ihse E, et al. Transthyretin Glu54Leu - an unknown mutation within the Swedish population associated with amyloid cardiomyopathy and a unique fibril type. *Scand J Clin Lab Invest.* 2019;79(6):372-376. doi:10.1080/00365513.2019.1624977
 95. Miyata M, Sato T, Mizuguchi M, et al. Role of the glutamic acid 54 residue in transthyretin stability and thyroxine binding. *Biochemistry.* 2010;49(1):114-123. doi:10.1021/bi901677z
 96. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021;596(7873):583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
 97. Rowczenio D, Quarta CC, Fontana M, et al. Analysis of the TTR gene in the investigation of amyloidosis: A 25-year single UK center experience. *Hum Mutat.* 2019;40(1):90-96. doi:10.1002/humu.23669

98. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
99. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581(7809):434-443. doi:10.1038/s41586-020-2308-7
100. Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 2010;20(1):110-121. doi:10.1101/gr.097857.109
101. Haagsma EB, Hawkins PN, Benson MD, Lachmann HJ, Bybee A, Hazenberg BPC. Familial Amyloidotic Polyneuropathy with Severe Renal Involvement in Association with Transthyretin Gly47Glu in Dutch, British and American Families. In: *Amyloid and Amyloidosis*. CRC Press; 2004.
102. Pelo E, Da Prato L, Ciaccheri M, et al. Familial amyloid polyneuropathy with genetic anticipation associated to a gly47glu transthyretin variant in an Italian kindred. *Amyloid.* 2002;9(1):35-41. doi:10.3109/13506120209072443
103. Durmuş-Tekçe H, Matur Z, Mert Atmaca M, et al. Genotypic and phenotypic presentation of transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Turkey. *Neuromuscul Disord.* 2016;26(7):441-446. doi:10.1016/j.nmd.2016.04.013
104. Lemos C, Coelho T, Alves-Ferreira M, et al. Overcoming artefact: anticipation in 284 Portuguese kindreds with familial amyloid polyneuropathy (FAP) ATTRV30M. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014;85(3):326-330. doi:10.1136/jnnp-2013-305383
105. Functional variation of the transthyretin gene among human populations and its correlation with amyloidosis phenotypes - PubMed. Accessed June 4, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111657/>
106. Sikora JL, Logue MW, Chan GG, et al. Genetic variation of the transthyretin gene in wild-type transthyretin amyloidosis (ATTRwt). *Hum Genet.* 2015;134(1):111-121. doi:10.1007/s00439-014-1499-0
107. Wang F, Wang H, Wu H, et al. TEAD1 controls C2C12 cell proliferation and differentiation and regulates three novel target genes. *Cell Signal.* 2013;25(3):674-681. doi:10.1016/j.cellsig.2012.11.027
108. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 2012;22(9):1790-1797. doi:10.1101/gr.137323.112
109. Gui B, Slone J, Huang T. Perspective: Is Random Monoallelic Expression a Contributor to Phenotypic Variability of Autosomal Dominant Disorders? *Front Genet.* 2017;8:191. doi:10.3389/fgene.2017.00191
110. Salameh Y, Bejaoui Y, El Hajj N. DNA Methylation Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Frontiers in Genetics.* 2020;11. Accessed December 27, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.00171>
111. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet.* 2018;19(6):371-384. doi:10.1038/s41576-018-0004-3

112. Castillo-Fernandez JE, Spector TD, Bell JT. Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease. *Genome Medicine*. 2014;6(7):60. doi:10.1186/s13073-014-0060-z
113. Edwards AWF. G. H. Hardy (1908) and Hardy-Weinberg equilibrium. *Genetics*. 2008;179(3):1143-1150. doi:10.1534/genetics.104.92940
114. Marques AM, Ananina G, Costa VP, Vasconcellos JPC de, Melo MB de. Estimating the age of the p.Cys433Arg variant in the MYOC gene in patients with primary open-angle glaucoma. *PLOS ONE*. 2018;13(11):e0207409. doi:10.1371/journal.pone.0207409
115. Slatkin M. A Population-Genetic Test of Founder Effects and Implications for Ashkenazi Jewish Diseases. *Am J Hum Genet*. 2004;75(2):282-293.
116. Coelho T, Sousa A, Lourenço E, Ramalheira J. A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. *J Med Genet*. 1994;31(4):293-299.
117. Koike H, Misu K ichiro, Ikeda S ichi, et al. Type I (transthyretin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form. *Arch Neurol*. 2002;59(11):1771-1776. doi:10.1001/archneur.59.11.1771
118. Sousa A, Andersson R, Drugge U, Holmgren G, Sandgren O. Familial Amyloidotic Polyneuropathy in Sweden: Geographical Distribution, Age of Onset, and Prevalence. *HHE*. 1993;43(5):288-294. doi:10.1159/000154146
119. Planté-Bordeneuve V, Lalu T, Misrahi M, et al. Genotypic-phenotypic variations in a series of 65 patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*. 1998;51(3):708-714. doi:10.1212/wnl.51.3.708
120. Wallace MR, Dwulet FE, Williams EC, Conneally PM, Benson MD. Identification of a new hereditary amyloidosis prealbumin variant, Tyr-77, and detection of the gene by DNA analysis. *J Clin Invest*. 1988;81(1):189-193. doi:10.1172/JCI113293