

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
КЛИНИКА ПО ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЯ
УМБАЛ „СВ. ИВАН РИЛСКИ”

**ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ХРОНИЧНИ МЕТАБОЛИТНИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ЧЕРНИЯ ДРОБ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

Дисертационен труд
за присъждане на научно-образователна степен „Доктор” на
д-р Соня Стефкова Драгнева

Научна специалност - Гастроентерология

Научен ръководител
проф. д-р Людмила Матева Владимирова, дмн

София, 2015

Дисертационният труд е написан на 137 печатни страници, онагледен с 45 фигури и 29 таблици. Библиографията съдържа 209 заглавия, от които 9 на кирилица и 200 на латиница.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 4 публикации и 9 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра по вътрешни болести – Медицински университет- София на 04.03.2015г. и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

1. Проф. д-р Людмила Матева Владимирова, дмн – вътрешен член за МУ – София, Катедра по вътрешни болести на Медицински факултет при МУ- София, научен ръководител на докторанта
2. Проф. д-р Красимир Антонов Антонов, дмн - вътрешен член за МУ – София, Катедра по вътрешни болести на Медицински факултет при МУ-София
3. Проф. д-р Крум Сотиров Кацаров, дмн – външен член за МУ – София, Военномедицинка Академия-София
4. Проф. д-р Захарий Александров Кръстев, дмн - външен член за МУ – София, пенсиониран преподавател повече от пет години от академичния съвет на Медицински факултет при МУ-София
5. Доц. д-р Иванка Пенчева Маринова, дм - външен член за МУ – София, Медицински университет – Плевен

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по вътрешни болести.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 08.06.2015 г. от 13.00 часа в Аулата на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” ЕАД- гр. София, бул. Акад. Иван Гешов 15.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	4 стр.
Въведение.....	5 стр.
Цел и задачи.....	6 стр.
Материал и методи.....	7 стр.
Резултати	11 стр.
Част 1. Порфирии.....	11 стр.
Част 2. Хемохроматоза.....	18 стр.
Част 3. Хронични черnodорбни заболявания със съпътстващ синдром на претоварване с желязо.....	21 стр.
Част 4. Болест на Уилсън.....	26 стр.
Обсъждане.....	29 стр.
Изводи.....	36 стр.
Приноси	37 стр.
Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд.....	38 стр.

I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

АК – аминокиселина

ЗД – захарен диабет

НАСБ – неалкохолна стеатозна болест

СН – сърдечна недостатъчност

ТЖСК – тотален желязосвързващ капацитет

ЧЦ – чернодробна цироза

ХХВ – хроничен хепатит В

ХХС – хроничен хепатит С

Ж - женски пол

М – мъжки пол

На латиница:

PBGD – порфобилиногендеаминаза, ген и ензим

PPOX – протопорфириноген оксидаза, ген и ензим

CPOX – копропорфириноген оксидаза, ген и ензим

UROD – уропорфириноген декарбоксилаза, ген и ензим

FECH – ферохелатаза ген и ензим

HFE – hereditary hemochromatosis protein (няма превод на български език)

HFE2 – ген за хемоювелин

HAMP – ген за хепсидин

TfR – ген за трансферин рецептор

SLC40A1 – ген за феропортин

ATP7b – аденозинтрифосфатаза тип 7b

SNP – единичен нуклетодиден полиморфизъм

HBV-DNA – хепатит В вирусна ДНК

HCV-RNA – хепатит С вирусна РНК

II. ВЪВЕДЕНИЕ

Порфириите, хемохроматозата и болестта на Уилсън са редки значими заболявания, свързани със сериозни остри и хронични животозастрашаващи усложнения, нарушаване на качеството на живот и повишен риск за смърт.

Ранното разкриване на генетични дефекти при съмнение за тези заболявания сред родствениците на пациентите е важно за ранната диагноза, лечение, предпазване от сериозни усложнения и удължаване на преживяемостта.

Въпреки множеството генетични изследвания, все още остават нерешени редица клинично значими въпроси, както при българските пациенти, така и по целия свят. Липсват молекулярно-генетични изследвания при порфирии, хемохроматоза и други синдроми на претоварване с желязо у нас.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Да оценим молекулярно-генетичните дефекти и клиничното им значение при български пациенти с метаболитни заболявания на черния дроб: порфирии, хемохроматоза и други чернодробни заболявания със съпътстващ синдром на пренатоварване с желязо, и болест на Уилсън

2. Задачи:

Задача 1. Да се характеризират молекулярно-генетичните дефекти при български пациенти с остри порфирии и техните родственици като изследваме следните гени:

- PBGD при пациенти с остра интермитентна порфирия
- PPOX при пациенти с порфирия вариетата
- CPOX при пациенти с вродена копропорфирия

Задача 2. Да се характеризират молекулярно-генетичните дефекти при български пациенти с порфирия кутанеа тарда и еритропоетична протопорфирия и техните родственици като изследваме следните гени:

- UROD при пациенти с порфирия кутанеа тарда
- FECH при пациенти с еритропоетична протопорфирия
- Да оценим диагностични различия между фамилната и спорадична порфирия кутанеа тарда

Задача 3. Да се характеризират молекулярно-генетичните дефекти при български пациенти с хемохроматоза и техните родственици, както и други чернодробни заболявания със съпътстващ синдром на претоварване с желязо като изследваме

- HFE, HFE2, HAMP, TfR2 и SLC40A1 гените .

Задача 4.

Да очертаем генотипно-фенотипната характеристика на българските пациенти с болест на Уилсън и връзката ѝ с изявата, протичането и лечението на заболяването.

V. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Изследвани лица

Анализираха се данните на общо 280 лица, изследвани и лекувани в клиниката по гастроентерология към УМБАЛ "Свети Иван Рилски" МУ-София за периода 2010-2015г, разделени в следните основни групи:

I група – семейства с остри порфирии: 33 лица: 14 пробанда и 19 кръвни родственика. Пробандите бяха с остра интермитентна порфирия – 7 (жени на средна възраст $43.1 \pm 9,5$ г.); порфирия вариегата – 6 (на средна възраст 50.2 ± 23.1 г. , жени -4, мъже – 2) ; вродена копропорфирия – 1 жена на 21 г. Десет от пробандите бяха от българския етнос, един – от ромски произход, а други два бяха българо-мохамедани от един ограничен регион.

II група – семейства с порфирия кутанеа тарда и еритропоетична протопорфирия: 27 лица; 15 пробанда и 12 кръвни родственика. Пробандите бяха с порфирия кутанеа тарда - 13 (мъже на средна възраст 53.8 ± 12.5 г.), а еритропоетична протопорфирия – 2 (мъж на 5г. и жена на 23г.).

III група – семейства с хемохроматоза: 9 лица; 5 пробанда (на средна възраст 48.6 ± 6.4 г. жени- 4, мъж -1) и 4 кръвни родственика.

IV група – пациенти с хронични чернодробни болести със съпътстващ синдром на претоварване с желязо: 41 болни (мъже – 27, жени – 14, на средна възраст 54.4 ± 14.1 г.). ЧЦ беше налице при 21 от тях. Етиологията на чернодробното заболяване е представена на таблица 1. Четиридесет от изследваните лица бяха от българския етнос, а един - от турския. При 13 пациента заболяването бе потвърдено хистологично (F0–1; F1-4; F2-4; F3-2; F4–2). В таблицата са посочени броя пациенти със съответните степените на фиброзата.

Таблица 1 . Етиология на чернодробното заболяване

Брой пациенти	Етиология					
	НСV	HBV	НСV+HBV	НСV+Порфирия кутанеа тарда	НАСБ	ПБЦ
N	18	4	2	2	14	1

V група – болест на Уилсън: 74 пациента (средна възраст 33.7 ± 11.7 (от 19 до 76г.) години, мъже – 35 и жени – 39). От българския етнос бяха 61 пациента, от турския – 10, а от ромски – 3 пациента. Шестдесетсет и девет болни бяха проследени за период от 1 до 41 г. (средно за 11.3 ± 9.2 г.). Молекулярно-генетичното изследване бе проведено при 69 пациента. Установи се носителство на патогенни мутации на двата алела при 59 пациента. При други 7 болни, въпреки че покриват диагностичните критерии за болест на Уилсън, ДНК анализът не установи носителство на най-честите патогенни мутации. Три лица бяха хетерозиготни носители на мутация. При 5 пациента не беше проведено генетично изследване на ATR7b гена.

VI група – контроли: 96 проби ДНК от здрави лица с европейски произход

2. Използвани методи

Извършихме следните стандартни и специфични за чернодробните заболявания изследвания:

- Анамнеза и физикален статус;
- Абдоминална ехография - конвенционално изследване и Доплерова ехография и други изборозителни изследвания при нужда (КТ, МРТ)
- лабораторни изследвания - пълна кръвна картина, АСТ, АЛТ, ГГТ, АФ; общ и директен билирубин, общ белтък, албумин, протромбиново време/INR, aPTT, фибриноген и други, кръвна захар, липиди, креатинин, серумно желязо, ТЖСК и феритин и други
- ПБГ, ДАЛК в урина, порфирина в урина и изпражнения; протопорфирин в еритроцити; уропорфирин в кръвна плазма; флуоресцентно скениране на нативна кръвна плазма при порфирии
- базална и стимулирана с Купренил екскреция на мед в 24ч. урина; церулоплазмин и серумна мед при болестта на Уилсън;
- серологични маркери за HBV и HCV инфекция, а при доказана такава- Real Time PCR за определяне нивота на вирусен товар (HBV DNA, HCV RNA и генотипизиране за HCV).

Специализирани изследвания

Директно ДНК секвениране бе извършено за изследване на съответните гени при пациентите с остри и кожни порфирии, хемохроматоза и пациентите с хронични

чернодробни болести със съпътстващ синдром на претоварване с желязо, а след анализ – и за пациентите с болест на Уилсън.

Молекулярно-генетичният анализ на всички пациенти с порфирии, хемохроматоза, както и 9 пациенти с хронични чернодробни болести със съпътстващ синдром на претоварване с желязо бяха осъществени в Катедрата по медицинска генетика към Университетът Тохоку в град Сендай, Япония. Молекулярно-генетичното изследване на екзоните 2 и 3 на HFE гена беше осъществено в Центъра по молекулярна медицина към МУ-София. Генетичният анализ на ATR7b гена бе проведен от екипа на проф. Ференци в Университета във Виена при 17 индивида, а при другите 52 болни от екипа на доц. А. Савов в Националната генетична лаборатория към МУ-София.

Използвана бе стандартна методика, включваща следните основни стъпки: 1. Изолране на високомолекулярна ДНК; 2. Проверка на качеството и количеството изолирана ДНК; 3. PCR амплификация със съответните праймери на избраните фрагменти от ДНК 4. Оценка на качеството на PCR реакцията чрез агарозна гел-електрофореза на продуктите и 5. Пречистване на PCR продуктите; 6. Секвенционна реакция с BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit 7. Преутаяване на продуктите от нея и 8. Електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционните реакции на автоматичен флуоресцентен капиляр секвенатор 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems Foster City, USA). Анализът на данните включваше оглед и подравняване на получената секвенция с референтната такава, служеща при подбора на праймерите за PCR реакциите с помощта на ATGC software. За да се докаже рядкостта на новоустановените мутации, съответните екзони на гените PBGD, PPOX и CPOX бяха секвенирани при 96 контролни проби ДНК от здрави лица. In silico предсказването на патогенността на новите единични нуклеотидни замени се определи с HumVar и HumDiv скората с помощта на интернет-базираното приложение PolyPhen-2.

Двойките праймери за PCR реакциите бяха подбрани чрез интернет-базирани приложения (Primer3 software).

Диагнозата на чернодробните заболявания бе поставена по съответните стандартни критерии, изградена на базата на анамнестични, физикални, изобразителни, инструментални, хистологични, лабораторни, имунологични, серологични, молекулярно-биологични и други специализирани изследвания за съответната съответната диагноза.

Диагнозата на порфириите се основаваше на комбинация от съответни клинични белези и следните критерии 1. Остра интермитентна порфирия: многократни повишени

нива на ПБГ и ДАЛК в урината при остър порфиричен пристъп. 2. Порфирия вариетата при случаите с остър порфиричен пристъп - на горните критерии; при случаите само с кожна симптоматика - завишените порфирини в изпражнение с преобладаване на прото- над копропорфирина както и строго специфичния емисионен пик на 626 нм при флуоресцентно скениране на нативна кръвна плазма. 3. Вродена копропорфирия с остър порфиричен пристъп на вече споменатите критерии; в случаите с предимно кожна симптоматика завишените порфирини в изпражнение с преобладаване на копро- над прото-порфирина и евентуално емисионен пик на 618 нм при флуоресцентно скениране на нативна кръвна плазма. 4. Порфирия кутанеа тарда - многократно увеличени ОП в урината с преобладаване на уропорфирина над копропорфирина, силно увеличение на уропорфирина в кръвната плазма, наличие на емисионен пик на 618 нм при флуоресцентно скениране на нативна кръвна плазма и нормални порфирини в еритроцитите. 5. Еритропоетична протопорфирия - многократно увеличен протопорфирин в еритроцитите и характерен емисионен пик на 632 нм при флуоресцентно скениране на нативна кръвна плазма.

Синдромът на претоварване с желязо бе приет при ТН над 40% - 45% или повишени стойности на феритина (n=7) (пациенти с НАСБ). При 10 случая ТН бе под посочената стойност поради предхождащи към датата на генетичното изследване многократни кръвопускания.

Тежестта на чернодробната цироза оценихме по Child-Pugh класификацията.

Използвахме следните статистически методи за оценка на достоверността на получените резултати: дескриптивна статистика; тест на Kolmogorov-Smirnov за проверка на вида на разпределение на данните в групите (Гаусово/не-Гаусово); тест на Shapiro-Wilk за проверка на вида на разпределение на данните при групи с по-малко от 50 лица; непараметричен тест на Mann-Whitney и Kruskal-Wallis за сравнение на две независими групи и откриване на статически значима разлика; χ^2 Fisher's exact test; корелационен анализ- Spearman (при не-Гаусово). Получените резултати бяха оценени като статистически достоверни при прагово ниво на значимост $p < 0.05$.

VI. РЕЗУЛТАТИ

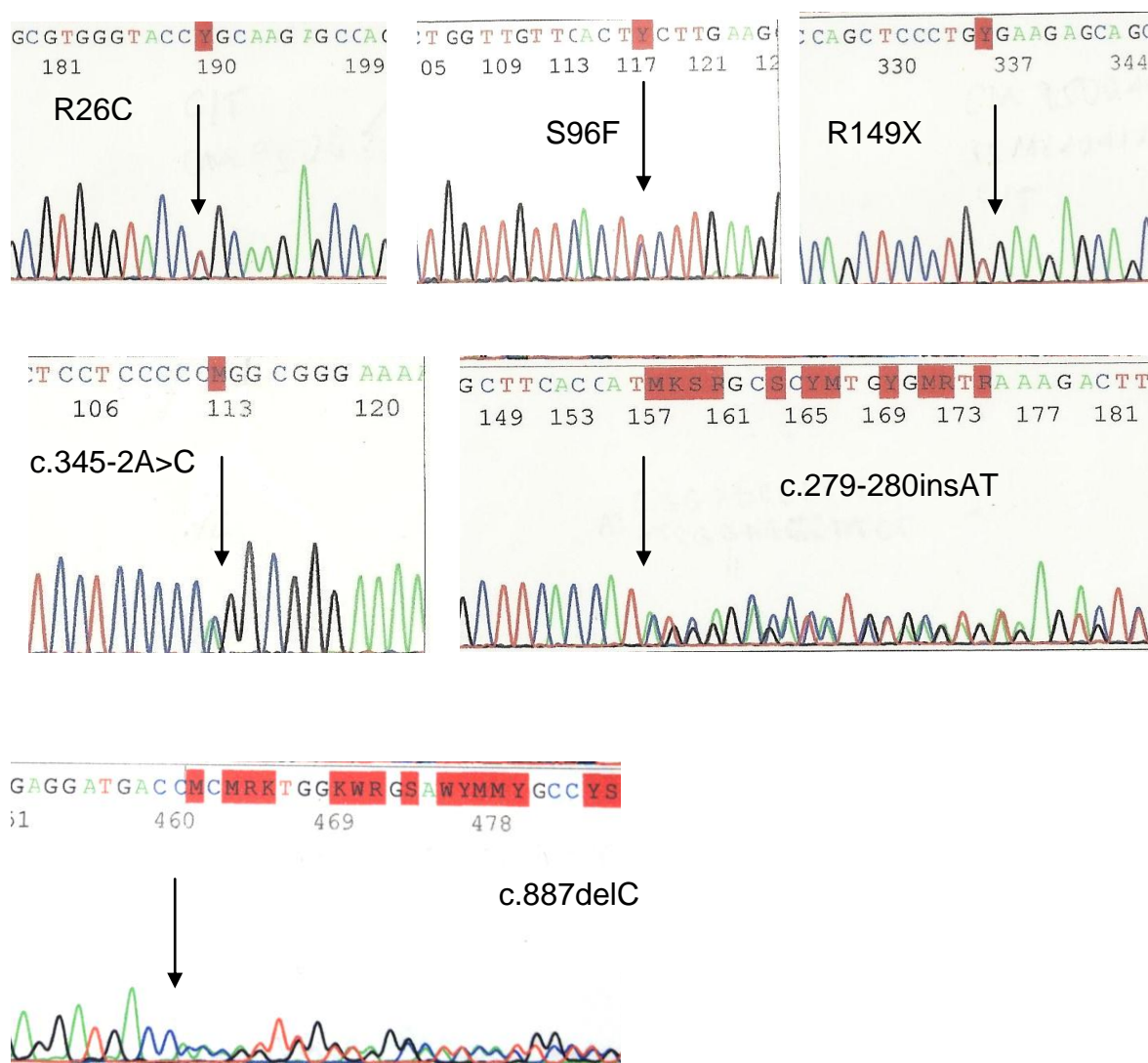
1. Порфирии

1.1 Обобщение на резултатите от молекулярно-генетичното изследване при семействата с остра интермитентна порфирия

Установихме общо 6 различни мутации на PBGD при всичките 7 семейства с остра интермитентна порфирия, 3 от които бяха вече известни единични нуклеотидни замествания: с.76С>Т [р.Р26С] в екзон 3, с.287С>Т [стр. S96F] в екзон 7, и с.445С>Т [р.Р149Х] в екзон 9. Другите три мутации бяха новоустановени. Те представляваха единична нуклеотидна замяна, малка инсерция и една малка делеция, а именно с.345-2А>С в интрон 7-8, с.279-280insАТ в екзон 7 и с.887delС в екзон 15. Като цяло, включваха 2 миссенс, 1 нонсенс, 1 сплайсинг мутация и 2 алтерации, водещи до промяна в рамката на четене. Фамилното изследване установи общо 7 пациента (n=4 симптомни и n=3 асимптомни) носители на характерната за семейството мутация. Данните са подробно представени на табл.2.

Таблица 2. Генетични характеристики на семействата с остра интермитентна порфирия

Сем	Пациент	Нуклеотидна замяна	АК замяна	Тип изменение
I	П1	с.76С>Т	р.Р26С	Миссенс
	Баща	с.76С>Т	р.Р26С	Миссенс
II	П2	с.279-280insАТ ^a	-	Изместване рамката на четене
	Братовчед 1	с.279-280insАТ ^a	-	Изместване рамката на четене
	Братовчед 2	с.279-280insАТ ^a	-	Изместване рамката на четене
	Майка	с.279-280insАТ ^a	-	Изместване рамката на четене
III	П3	с.887delС ^a	-	Изместване рамката на четене
	Син	Отр.		-
IV	П4	с.445С>Т	р.Р149Х	Нонсенс
	Майка	с.445С>Т	р.Р149Х	Нонсенс
	Сестра	Отр.		-
V	П5	с.345-2А>С ^a	-	Сплайсинг мутация
VI	П6	с.287С>Т	р.С96F	Миссенс
	Дъщеря	с.287С>Т	р.С96F	Миссенс
VII	П7	с.287С>Т	р.С96F	Миссенс
	Дъщеря	с.287С>Т	р.С96F	Миссенс



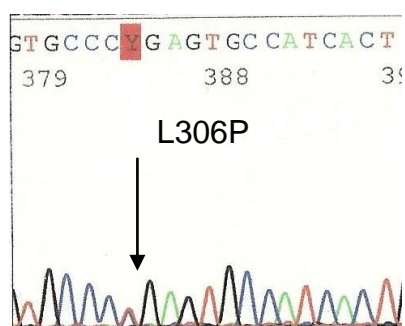
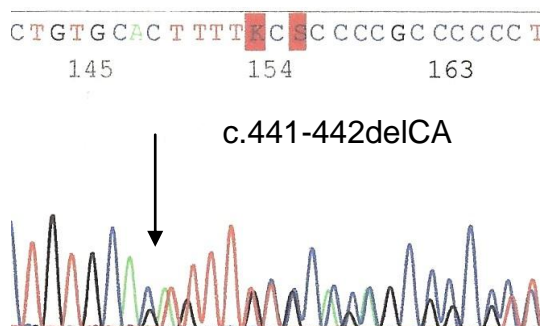
Фиг. 1. Мутации установени при пациентите с остра интермитентна порфирия.

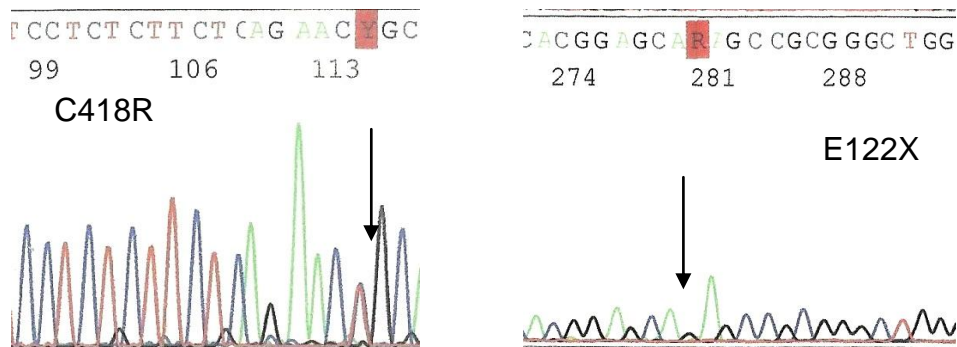
1.2 Обобщение на молекулярно генетичните находки при семействата с порфирия вариегата и вродена копропорфирия

Установихме общо 3 различни неописани до момента единични нуклеотидни промени в PPOX гена при всичките 6 семейства с порфирия вариегата: c.441-442delCA в екзон 5, c.917T> C [p.L306P] в екзон 9, и c.1252T> C [p.C418R] в екзон 12. Те представляваха 2 мисенс мутации и 1 малка делеция. Една неописвана нонсенс мутация (c.364G > T [p.E122X]) беше установена при пациентката с вродена копропорфирия. Фамилното изследване при семействата с порфирия вариегата установи 7 носители на характерните за семейството мутации 3 симптомни и 4 асимптомни. Данните са подробно представени на табл.3.

Таблица 3. ДНК анализ при семействата на порфирия вариетата и вродена копропорфирия

Сем	Пациент	Ген	Нуклеотидна замяна	АК замяна	Тип изменение
I-PV	П1	PPOX	с.441-442delCA	-	Изместване рамката на четене
	Дъщеря	PPOX	с.441-442delCA	-	Изместване рамката на четене
II-PV	П2	PPOX	с.917T>C	p.L306P	Миссенс
	Син	PPOX	с.917T>C	p.L306P	Миссенс
III-PV	П3	PPOX	с.917T>C	p.L306P	Миссенс
	Син	PPOX	с.917T>C	p.L306P	Миссенс
	Внук	PPOX	Отр.	-	
IV-PV	П4	PPOX	с.917T>C	p.L306P	Миссенс
	Дъщеря	PPOX	с.917T>C	p.L306P	Миссенс
	Син	PPOX	с.917T>C	p.L306P	Миссенс
V-PV	П5	PPOX	с.1252T>C	p.C418R	Миссенс
	Сестра	PPOX	с.1252T>C	p.C418R	Миссенс
	Син	PPOX	Отр.	-	
	Племен- ница	PPOX	с.1252T>C	p.C418R	Миссенс
	Племен- ник	PPOX	Отр.	-	
VI-PV	П6	PPOX	с.1252T>C	p.C418R	Миссенс
I- HCP	П	CPOX	с.364G>T	p.E122X	Нонсенс





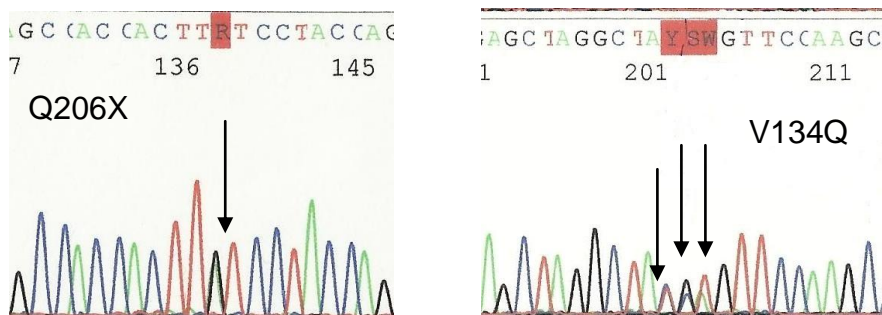
Фиг. 2. Мутации установени при пациентите с порфирия вариегата и вродена копропорфирия.

1.3 Обобщение на молекулярно-генетичните находки при порфирия кутанеа тарда

Установиха се общо 2 мутации в гена за UROD при 5 от болните, като 4 от тях бяха носители на една и съща мутация. Първата мутация представляваше известна патогенна нонсенс мутация p.Q206X в екзон 6. Втората беше също известна миссенс мутация в екзон 5, p.V314Q. Фамилното изследване установи 3 латентни носителя на характерните за семейството мутации в гена за UROD; подробности в табл.4.

Таблица 4. Генетични характеристики при 5-те семейства с фамилна порфирия кутанеа тарда.

Семейство	Пробанд	Нуклеотидна замяна	Генотип	АК замяна	Тип изменение
I	П 1	c.616C>T	СТ	p.Q206X	Нонсенс
	Син	-	СС	-	
II	П 2	c.616C>T	СТ	p.Q206X	Нонсенс
	Син	-	СС	-	
	Дъщеря	-	СС	-	
III	П 3	c.616C>T	СТ	p.Q206X	Нонсенс
	Дъщеря 1	-	-	-	
	Дъщеря 2	c.616C>T	СТ	p.Q206X	Нонсенс
IV	П 4	c.616C>T	СТ	p.Q206X	Нонсенс
	Син	c.616C>T	СТ	p.Q206X	Нонсенс
	Дъщеря	c.616C>T	СТ	p.Q206X	Нонсенс
V	П 5	c.400G>C c.401T>A	GC TA	p.V134Q	Миссенс
	Син	-	GG/TT	-	
	Дъщеря	-	GG/TT	-	



Фиг. 3. Мутации установени при пациентите с фамилна порфирия кутанеа тарда.

1.4 Диагностични различия между фамилната и спорадична порфирия кутанеа тарда

Факторите, отключващи порфирия кутанеа тарда, клиничните и биохимичните данни на болните са представени на табл.5. Измежду петимата носители на UROD мутации, които с категоричност отнасяме към фамилната форма на порфирия кутанеа тарда, имаше двама на 26г. и един на 33г. Седем от 8-те болни със спорадична порфирия кутанеа тарда бяха по-възрастни от 35г.

Един от болните с фамилна форма употребяваше системно алкохол, а при останалите 4 консумацията беше по-малка и нередовна. При нито един пациент с фамилна порфирия кутанеа тарда не се доказва HCV инфекция. Абдоминалната ехография установи дифузен паренхимне процес на черния дроб от стетозен тип при 3 лица с порфирия кутанеа тарда. Само при 1 пациент чернодробните ензими бяха нормални, но с изключение на един по-висок резултат повишенията не надхвърляха трикратни стойности.

При 6 от 8-те болни със спорадична порфирия кутанеа тарда консумацията на алкохол беше дългогодишна, системна и значителна. Пет пациента бяха HCV положителни с данни за вирусна репликация. Трима имаха ЧЦ клас А по Чайлд, а при останалите 5 абдоминалната ехография установи изразен дифузен паренхимне процес. При двама болни (6 и 10) чернодробните ензими бяха нормални, а при останалите повишени до 3-4 пъти.

Увеличенията на порфирините в урината варираха между 25 и 43- кратни стойности при фамилната порфирия кутанеа тарда и между 6 и 50 пъти при спорадичната. Уропорфиринът в плазмата надхвърляше повече от стотици пъти нормата и при двете форми на порфирия кутанеа тарда. ТН беше горно-гранично или

повишено при 4 от 5 болни с фамилна порфирия кутанеа тарда и при 7 от 8 със спорадична порфирия кутанеа тарда. Налице беше съвпадение между измерените стойности на активността на UROD в еритроцитите и данните от молекулярно-генетичния анализ, т.е. болните носители на мутации имаха и понижена UROD активност.

За да се подобри оценката на всяка от двете форми на PCT приложихме подробна точкова система, която включваше следните показатели: възраст под 35г – 0 т., а над 35 г. – 2 точки; несистемна употреба на алкохол – 1т, а системна такава – 4т.; хронична HCV инфекция – 4т.; ехографски промени (дифузен паренхимен процес на черния дроб без циротично преустройство – 1т.; чернодробна цироза – 3т.; Увеличение на АЛТ до два пъти горна референтна стойност – 1т, а над два пъти – 2т.; увеличение на ГГТ до два пъти горна референтна стойност – 1т, а над два пъти - 2т. Прилагайки скоровете при фамилната форма получихме максимален резултат 10 (у системно употребяващия алкохол пациент 2). С изключение на пациенти 6 и 13, останалите пациенти със спорадична форма на заболяването бяха със значително по-високи резултати.

Таблица 5. Отключващи фактори, клинични и биохимични при 13 мъже с порфирия кутанеа тарда

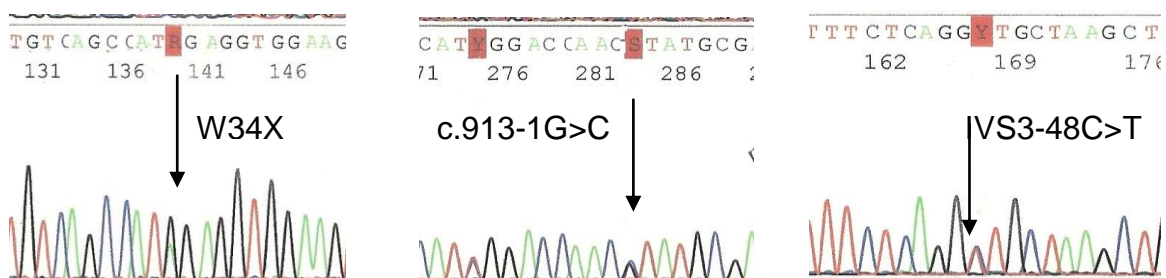
Пациент	Възраст	Форма	Алкохол	Н С V	ЧЦ	ОП nmol/ 24h	УроП nmol/l	UROD pkat/g Hb	ТН %	АЛАТ U/l	ГГТ U/l	Скор
П 1	33	Фам	Несистемно	-	-	8541	НД	НД	20	62	151	6
П 2	26	Фам	Системно	-	-	2830	184	15.1	41	53	178	8
П 3	52	Фам	Несистемно	-	-	5261	133	-	41	64	76	6
П 4	45	Фам	Несистемно	-	-	6750	74	-	52	16	53	3
П 5	26	Фам	Несистемно	-	-	5836	671	20	87	41	261	4
П 6	60	Спор	Несистемно	-	-	10096	-	-	27	38	44	5
П 7	37	Спор	Системно	-	-	1147	106	363	72	65	100	8
П 8	59	Спор	Системно	+	+	5000			65	188	221	17
П 9	33	Спор	Системно	+	-	3731	49	409	44	33	121	12
П 10	35	Спор	Системно	+	-	2338	37	418	44	31	35	10
П 11	41	Спор	Несистемно	+	+	2722	324	-	69	79	97	11
П 12	53	Спор	Системно	+	+	1533	-	-	40	152	240	15
П 13	48	Спор	Несистемно	-	-	1486	9	291	59	49	59	4
Референтни стойности						<200	<1.4	<300	< 45	< 35	<35ж; <55м	

1.5 Обобщение на молекулярно-генетичните находки при семействата с еритропоетична протопорфирия

При П1 и П2 открихме следните две неописани досега мутации: една нонсенс W34X в екзон 2 и една сплайсинг мутация с.913-1G>C в интрон 8-9 в хетерозиготно състояние, които бяха унаследени заедно с хипоморфния алел IVS3-48C>T в хетерозиготно състояние. При изследваните 4 кръвни родственика на пробандите се установи носителство само на IVS-48C>T при двама и носителство само на съответната за семейството мутация при другите двама; подробностите са представени в табл.6.

Таблица 6. ДНК анализ при семействата с еритропоетична протопорфирия

Семейство	Пробанд	Нуклеотидна замяна	Тип на изменение	Генотип
1	П1	с.101G>A IVS3-48C>T	Нонсенс -	GA CT
	Брат	IVS3-48C>T	-	CT
2	П2	с.913-1G>C IVS3-48C>T	Сплайсинг -	GC CT
	Майка	с.913-1G>C	Сплайсинг	GC
	Баща	IVS3-48C>T	-	CT
	Брат	IVS3-48C>T	-	CT



Фиг. 4. Мутации и функционален полиморфизъм при пациентите с еритропоетична протопорфирия.

ЧАСТ 2. Хемохроматоза

2.1 Клинични и биохимични характеристики на пробандите (табл.7)

Таблица 7. Клинични и биохимични характеристики на пациентите с хемохроматоза

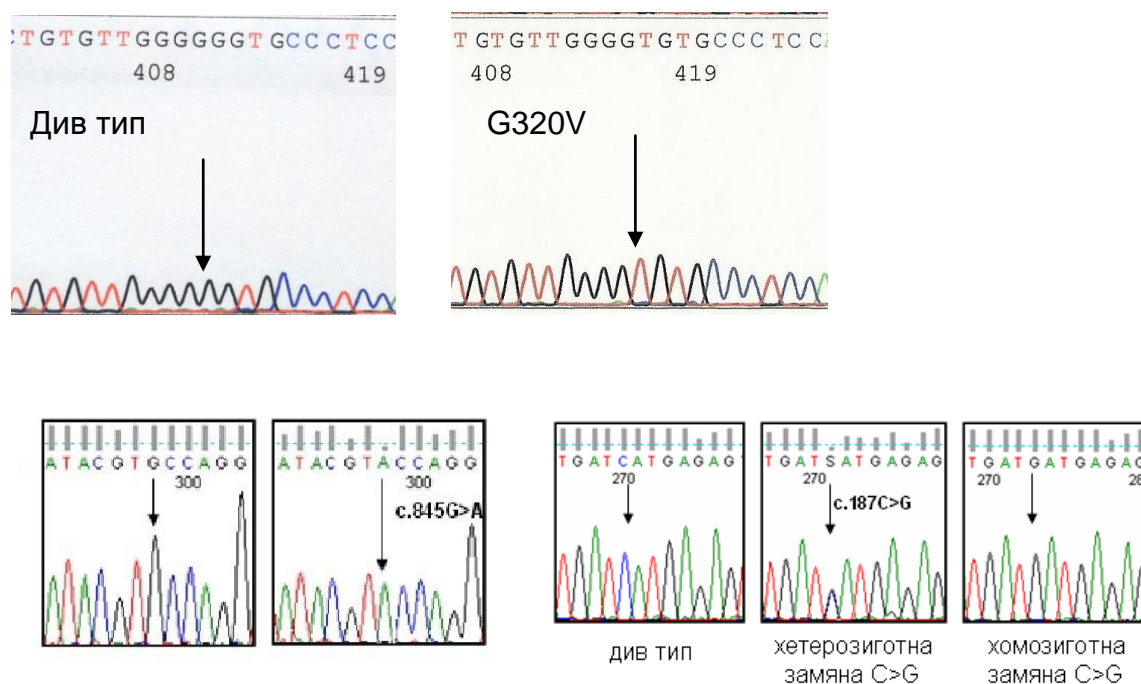
Сем	Пробанд	Възраст	Пол	Симптоми					Диагноза		
				СН	ЧЦ	ЗД	Артропатия	Аменорея	ТН %	Феритин ng/ml	
1	П1	35	ж	+	+	+	+	+	89	1000	МРТ на сърце
2	П2	39	ж	+	+	-	-	+	100	1390	Чернодробна биопсия
	П3	37	ж	-	-	-	-	+	100	1484	ДНК анализ
3	П4	20	ж	+	+	+	+	+	100	900	Чернодробна биопсия
4	П5	46	м	-	-	-	-		100	616	Биопсия от стомашна лигавица

2.2 Обобщение на молекулярно-генетичните находки при пациентите с хемохроматоза

Данните от ДНК анализа са представени на табл.8. Установихе общо 2 известни мутации; 1 миссенс мутация G320V в HFE2 гена при 4 от изследваните пробанди, което означава, че тези пациенти са с ювенилен тип хемохроматоза (тип 2). Петият пациент бе хомозигот по класическата C282Y мутация в HFE гена, обуславяща хемохроматоза 1 тип.

Таблица 8. Обобщение на молекулярно генетичните находки при пациентите с хемохроматоза

Пробанд	П1	П2	П3	П4	П5
HFE					
Екзон 2	c.187C>G	c.187C>G	c.187C>G	-	
Генотип	CG	GG	GG	CC	
АК замяна	H63D	H63D	H63D		
Екзон 4	-	-	-	-	c.845G>A
Генотип	GG	GG	GG	GG	AA
АК замяна					C282Y
HFE2					
Екзон 4	c.959G>T	c.959G>T	c.959G>T	c.959G>T	
Генотип	TT	TT	TT	TT	
АК замяна	G320V	G320V	G320V	G320V	



Фиг. 5. Мутации установени при пациентите с хемохроматоза.

2.3 Резултати от мутационния анализ на HFE и HFE2 гените при потомството на болните с хемохроматоза

Дъщерята на П1 беше хомозигот, а дъщерите на П3 бяха хетерозиготи по H63D мутацията в екзон 2 на гена за HFE. Дъщерите на П1 и П3 и синът на П4 бяха хетерозиготи по мутацията G320V в гена за HFE2. Данните са описани в табл.9.

Таблица 9. Носителство на патогенни мутации у потомците на пациенти с хемохроматоза

Семейство	Пробанд	Генотип по H63D мутация в екзон 2 на HFE гена	Генотип по G320V мутация в екзон 4 на HFE2 гена
1	П1	CG	ТТ
	Дъщеря	GG	GT
2	П2	GG	ТТ
	П3	GG	ТТ
	Дъщеря 1	GC	GT
	Дъщеря 2	GC	GT
3	П4	CC	ТТ
	Син	CC	GT

ЧАСТ 3. Хронични чернодробни болести със съпътстващ синдром на претоварване с желязо

3.1 Обобщение на находките от ДНК анализа при пациентите с хронични чернодробни болести със съпътстващ синдром на претоварване с желязо

Екзони 2 и 3 на HFE гена бяха секвенирани при всички 41 пациента. Хетерозиготи за някои от мутациите в HFE гена за хемохроматоза бяха 11 пациенти; n=9 H63D +/- , n=2 S65C +/- . Установиха се 2 сложни хетерозиготи C282Y/H63D и 2 хомозигота H63D+/+. Обобщените резултати са представени на табл.10.

Таблица 10. Носителство на мутации в HFE и етиология на чернодробната болест

Генотип	Брой пациенти	Етиология
H63D+/-	9	HCV(n=5) HACX (n=4)
H63D+/+	2	HCV (n=1) HACX (n=1)
C282Y/H63D	2	ПБЦ (n=1) HACX (n=1)
S65C+/-	2	HCV(n=2)

3.2 Връзка между хетеро- или хомозиготното носителство на мутации в HFE гена от една страна и наличието на ЧЦ и ЗД от друга

Не установихме връзка между хетерозиготното състояние за някоя от мутациите на HFE гена и наличието на ЧЦ или напреднала фиброза при изследваната група лица $p=0.83$, $p=1$. Не намерихме връзка между наличието на мутации в HFE гена и нарушенията на глюкозния метаболизъм (нарушен въглехидратен толеранс и ЗД), $p=0.6$.

3.3 Честота на мутациите на HFE гена при изследваната група в сравнение със здрави контроли

Сравнихме честотата на установените от нас мутации в HFE гена при пациенти със синдром на претоварване с желязо и здрави доброволци и пациенти с порфирия кутанеа тарда (изследвани от Ivanova и съавт. 1998 и von Ahsen и съавт 2001). C282Y и S65C мутациите не са открити при контролната група лица, но присъстват в групата на порфирия кутанеа тарда и синдрома на претоварване с желязо съответно в 2.08% и 4.9%. Честотата на разпространение на H63D мутацията е приблизително еднаква при здравите доброволци и пациентите с порфирия кутанеа тарда, съответно 22% и 20.8%, но е леко завишена при пациентите със синдром на претоварване с желязо – 31.7%. Обобщените резултати са представени на табл.11.

Таблица 11. Честота на мутациите на HFE гена сравнени с контролна група

Изследвани лица	C282Y	H63D	S65C
Пациенти със синдром на претоварване с желязо n=41	2 (4.9%)	13 (31.7%)	2 (4.9%)
Порфирия кутанеа тарда n=41 * Ivanova 1999	1 (2.08%)	10 (20.8%)	1 (2.08%)
Контролни лица n=100* Ivanova 1999	0	22 (22%)	0

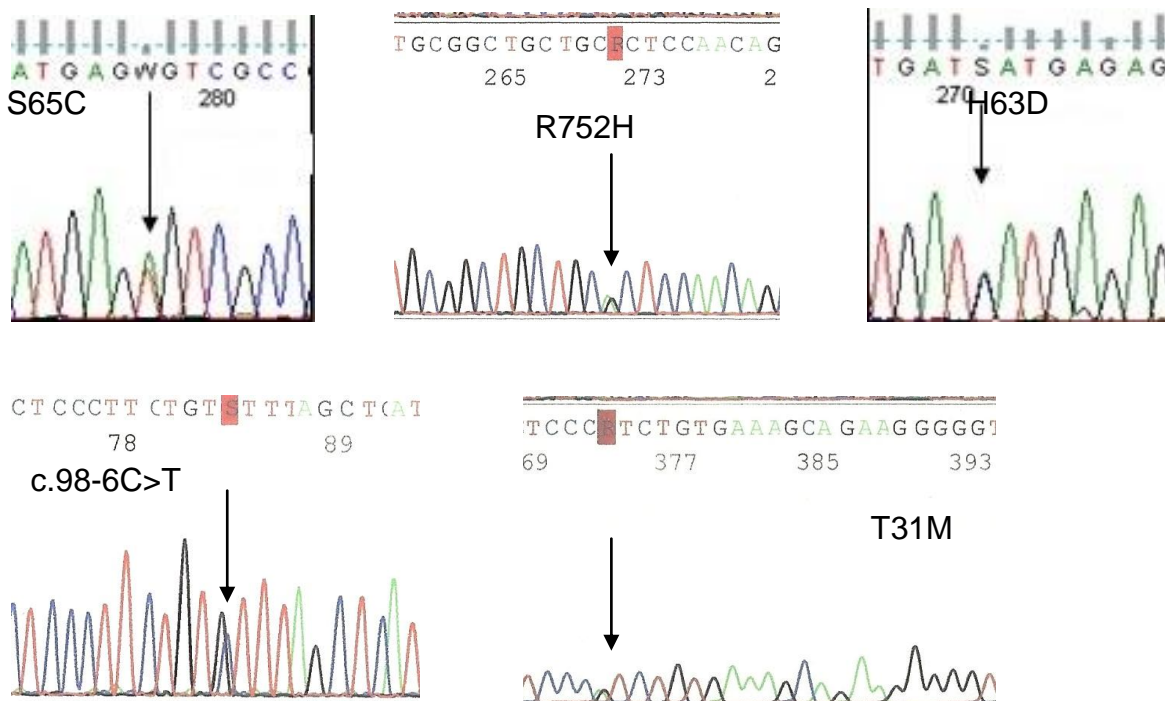
Девет пациента, при които имаше клинично съмнение за хемохроматоза бяха изследвани за 5-те гена отговорни за ХХ. Те бяха подбрани въз основа характеристиките, посочени в табл.12.

Таблица 12. Характеристики на пациенти със съмнение за хемохроматоза

Пациенти	Възраст	ТН%	Феритин ng/ml	ЧЦ	Етиология	Други фактори
АК	54	85.45		+	НСV	Бронзова кожа
ВА	48	91.30		-	НСV	Бронзова кожа
ВГ	56	92.00		+	НСV	ЗД тип 2
ДЧ	64	61.97		-	НСV	Кръвопускания
ММ	39	69.05	671	-	НАСХ	Кръвопускания
СБ	61	32.00	530	-	НАСХ	Кръвопускания
СК	44	37.41	612	-	НАСХ	Кръвопускания
ЕК	51	86.00	146	+	ПБЦ	Кръвопускания
НБ	61	63.80	533	-	НАСХ	Кръвопускания

3.4 Резултати от мутационния анализ на гените, отговорни за хемохроматозата при 9 пациента със синдром на претоварване с желязо черnodробно увреждане

При тези 9 болни изследвахме всички екзони за HFE гена и останалите 4 гени, отговорни за хемохроматоза. Установихме общо 2 двойни хетерозигота, а именно 1 двоен хетерозигот S65C^{+/-} в HFE гена заедно с R752H^{+/-} в TfR2 гена; 1 двоен хетерозигот с.98-6C>T^{+/-} в HFE2 гена заедно с H63D^{+/-} в HFE гена. Намерихме 2 хетерозиготи по мутации в гени различни от HFE, а именно 1 T31M^{+/-} в HAMP гена и 1 с.98-6C>T^{+/-} в HFE2 гена. Четири от пациентите, при които изследвахме HFE, HFE2, HAMP, TfR2 и SLC40A1 гените бяха гореспоменатите 2 хомозиготи и 2 сложни хетерозиготи по честите мутации в HFE гена. При тези 4 болни не се установиха значими полиморфизми в 5-те гена. При 1 пациент, който беше и с най-ниски стойности на ТН – 32%, не бяха открити значими полиморфизми в 5-те гена. Резултатите от мутационния анализ са описани подробно в табл.13.



Фиг. 6. Мутации установени при пациентите с хронични чернодробни заболявания със съпътстващ синдром на свръхнасищане с желязо.

Таблица 13. Обобщение на молекулярно-генетичните находки при 9 пациента

Пациент	АК	ВА	ВГ	ММ	СБ	СК	ЕК	ДЧ	НБ
НFE									
Екзон 2	S65C		H63D			H63D	H63D	H63D	H63D
Генотип	AT		GG			GG	CG	CG	CG
Екзон 4							C282Y		C282Y
Генотип	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GA
НFE2									
IVS 2-3				c.98-6C>G				c.98-6C>G	
Генотип	CC	CC	CC	CG	CC	CC	CC	CG	CC
НАМР									
Екзон 3		T31M							
Генотип	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
TfR2									
Екзон 19	R752H								
Генотип	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG

ЧАСТ 4. Болест на Уилсън

4.1 Генетична характеристика на пациентите с болест на Уилсън

Изследваните пробанди бяха носители на общо 20 различни мутации в АТР7б гена. От тях 11 бяха единични нуклеотидни замени, 8 - алтерации, предизвикващи промяна в рамката на четене и 1 бе сплайсинг мутация. Н1069Q беше най-честата мутация при българските пациенти с БУ. Тридесет и девет пациента от 59 (66%) носят Н1069Q на поне 1 алел, а 26 пациента са хомозиготи по тази мутация (44%). Обобщените данни са представени на табл.14.

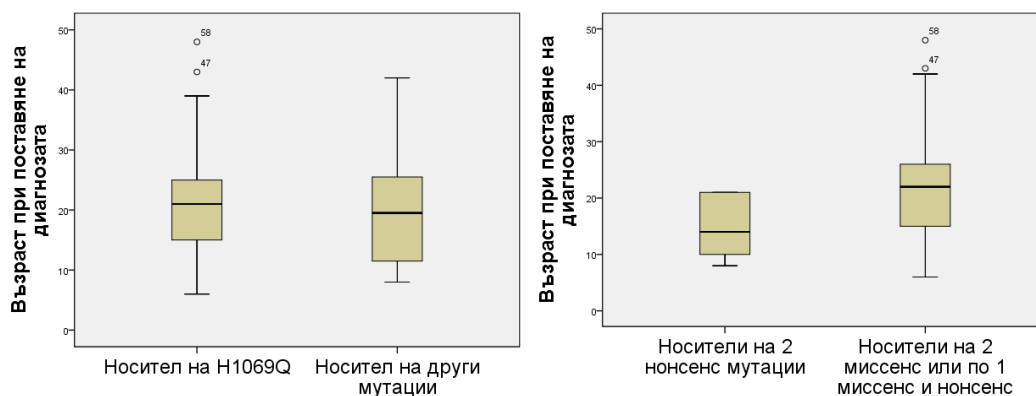
Таблица 14. Разпределение на мутациите при БУ

	Н1069Q хомо- зиготи	Н1069Q хетеро- зиготи	Носители на мутации, различни от Н1069Q	Носители на 2 миссенс мутации	Носители на миссенс+ нонсенс мутации	Носители на 2 нонсенс мутации
Брой пациенти	26	13	20	43	8	8

4.2 Генотипно – фенотипни корелации – възраст на изява на заболяването

Не установихме статистически значима връзка относно възрастта на изява на болестта между пациенти носители на Н1069Q и такива, при които тази мутация не се установява (средна възраст 21.6 ± 1.5 при носителите на Н1069Q срещу 20.1 ± 2.1 при носителите на други мутации, $p=0.5$).

Носителите на 2 нонсенс мутации бяха със статистически значимо по-ранна възраст при поставяне на диагнозата в сравнение с носителите на други мутации (14.9 ± 1.9 години срещу 22.1 ± 1.3 години, $p=0.02$).



Фиг. 7. Средна възраст на изява при носителите на различни типове мутации.

4.3 Генотипно-фенотипни корелации – тежест на чернодробното увреждане при изявата и проследяването на заболяването

Не установихме статистически значима връзка относно тежестта на чернодробното засягане, а именно хроничен хепатит (XX), компенсирани и декомпенсирани ЧЦ при изявата и при проследяването на болестта между H1069Q хомозиготите и останалите пациенти, $p=0.5$, $p=0.4$. Също така, не установихме връзка между изявата с и наличието при проследяване на XX, компенсирани и декомпенсирани ЧЦ при носителите на H1069Q в сравнение с останалите болни, $p=0.6$, $p=0.2$.

Нямаше статистически значима връзка между носителите на 2 миссенс мутации и останалите болни по отношение проявата на чернодробната болест - XX, компенсирани и декомпенсирани ЧЦ, $p=0.9$.

4.4 Генотип-фенотип корелации – наличие на неврологично засягане и пръстен на Кайзер-Флайшер при изявата на болестта

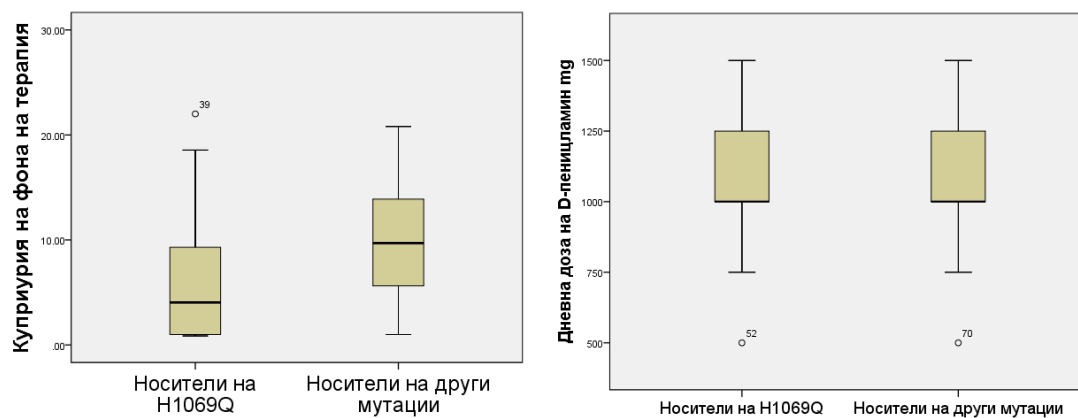
Носителите на H1069Q ($n=39$) имаха статистически значимо по-често изява на болестта на Уилсън с неврологична симптоматика в сравнение с носителите на други мутации ($n=8$), $p=0.01$. Такава връзка по отношение пръстена на Кайзер-Флайшер не се наблюдаваше, $p=0.09$. Не намерихме и статистически значима връзка между наличието

на невроголична форма на болестта на Уилсън и пръстена на Кайзер-Флайшер при пациентите хомозиготи по Н1069Q и останалите болни (съответно $p=0.1$ и $p=0.18$).

При носителите на 2 нонсенс мутации не установихме значимо по-честа изява с неврологични симптоми и пръстен на Кайзер-Флайшер в сравнение с носителите на 2 миссенс и по 1 миссенс и нонсенс мутации (съответно $p=0.4$, $p=0.1$).

4.5 Генотип-фенотип корелации – стойности на куприурията на фона на терапия

Установихме статистически значимо по-ниски стойности на куприурията на фона на терапия с еднакви дози D-пенициламин ($p=1.0$) при носителите на Н1069Q мутацията и в сравнение с останалите, $p=0.02$, съответно 7.9 ± 2.3 срещу 9.7 ± 1.3 $\mu\text{mol}/24\text{h}$, като и двете стойности отговарят на критериите за добър метаболитен контрол.



Фиг. 8. Стойности на куприурията на фона на еднакви дози D-пенициламин при носителите на Н1069Q.

VI. ОБСЪЖДАНЕ

Молекулярно-генетичните находки при българските пациенти с остра интермитентна порфирия бяха разнородни, каквито са и данните от много други страни [Whatley et al 2009, Puu et al 1997]. При семейства II, III и V бяха открити неописани досега единични нуклеотидни замествания в PBGD гена, които обуславяха фреймшифт и сплайсингова мутации. Малка инсерция (с.279-280insAT) и малка делеция (с.887delC) бяха идентифицирани при пробанди II-П2 и III-П3. Нуклеотидната промяна разкрита при семейството V-П5 (с.345-2A>C) засяга невариабилна сплайсинг акцепторна последователност AG и най-вероятно възпрепятства обработката на иРНК. На същата позиция, но различна нуклеотидна замяна (с.345-2 A> G) беше съобщена при шведски пациенти [Floderus et al 2002]. Тези три промени не са докладвани в референтните бази данни. Не установихме наличието на тези новоустановени мутации в PBGD гена при изследваните 96 контролни проби ДНК, което говори в полза на патогенността на тези промени. Въпреки че не сме извършили РНК анализ, смятаме, че с много голяма вероятност с.345-2A> C мутацията е патогенна.

Общо 3 различни неописани до момента единични нуклеотидни промени в PPOX гена отговорен за порфирия вариетата бяха налични при всичките 6 семейства. Те представляваха 2 мисенс мутации (р.L306P и р.C418R) 1 малка делеция (с.441-442delCA). Остатъците L306 и C418 са разположени в силно консервативния FAD-свързващ домен [Qin et al 2011], и тези АК промени най-вероятно нарушават това взаимодействие. Скорът по HumVar със стойност 1.00 за р.L306P и 0.921 за р.C418R предсказва, че тези мутации са патогенни. В кодон 306 е описана малка делеция (с.916_917delCT) от Wilman et al 2003, а в кодон 418 досега не са докладвани мутации.

По-голямата част от пациентите с порфирия вариетата произхождат от 2 ендемични области [Атанасова и съавт. 2005]. Един от тези региони е населен с етнически българи, които са мюсюлмани. Тези хора живеят в отдалечени села около град Велинград в Родопите. Само 2 семейства, V и VI от този регион се съгласиха да вземат участие в това проучване, въпреки че повече пациенти бяха поканени. Най-вероятно мнозинството от пациентите с порфирия вариетата там споделят р.C418R мутацията поради кръвно родство. Предшествениците на семействата II, III и IV произлизат от село Буйновци, което се намира в централната част на Стара планина. Следователно, може да се подозира ефект на основателя за промяната на р.L306P. Ендемичното

представяне на семейства с порфирия вариегата и разпределението на съответните нови мутации също подчертават патогенния им ефект.

Нонсенс мутацията р.Е122Х, установена при пациентката с вродена копропорфирия, се намира в екзон 1 и води до нестабилен и неактивен СРОХ протеин, който вероятно се отстранява чрез протеолитично разграждане. Измервания на активността на СРОХ които да докажат съвпадането на мутацията с ниска ензимна активност не бяха осъществени.

Това е първото съобщение, което описва мутациите при българските пациенти с остра интермитентна порфирия, порфирия вариегата и вродена копропорфирия. Ние установихме общо 7 нови мутации в тези семейства. Открити бяха и седем латентни генни носители. По този начин може да се предотврати развитието на острия пристъп чрез избягване на добре познатите екзогенни отключващи фактори.

При настоящото проучване за първи път беше осъщесвен молекулярно-генетичен анализ при български пациенти с порфирия кутанеа тарда. Общо 2 мутации в гена за UROD бяха установени при 5 лица, които вече разглеждаме като доказани пробанди с фамилна порфирия кутанеа тарда. При 4 неродствено свързани пробанда се доказва описвана вече нонсенс мутация р. Q206Х в екзон 6 [Capellini et al 2002]. На ниво белтък тази атерация води до промяна на кодона САА в стоп кодон (ТАА), вследствие на което се белтъчната синтеза се прекратява след включването на 205 аминокиселинни остатъка.

Другата миссенс мутация V134Q, установена при 1 пациент, също е вече описвана. Meguro et al 2004 я съобщават при пациент с хепатоеритропоеична порфирия (рядка форма на порфирия кутанеа тарда, дължаща се на хомозиготно носителство на мутации в UROD гена). Тя представлява три последователни единични нуклеотидни замени; като Т399G400T401 се заменят с ССА. Първият единичен нуклеотиден полиморфизъм с.399Т>С не води до промяна в кодиращия аминокиселинен остатък (ТАТ> ТАС). Следващите две единични нуклеотидни замени с.400G>С и с. 401Т>А обуславят включването в белтъка на АК валин вместо глутамин на позиция 134 (GTG>CAG). Полученият функционален ефект засега остава неясен тъй като този аминокиселинен остатък се намира далеч от активния център на ензима. Ензимната активност на рекомбинантния ензим е много близка до нормалната при експресията му в прокариоти. Субституцията на глутамин с валин на позиция 134 води до включването на полярен остатък в хидрофобен джоб далеч от активния център [Phillips et al 2001].

Две неописани мутации бяха установени при българските пациенти с еритропоеична протопорфирия. П1 е хетерозиготен носител на W34X мутацията в FECH гена, както и хетерозиготен носител IVS3-48C>T хипоморфен алел в интрон 3 в позиция транс. Нонсенс мутацията с.101G>A е новооткрита, но на съседната позиция в литературата е съобщена патогенна мутация с.102G>A, като и двете нуклеотидни замени водят до еднакъв резултат – инкорпориране само на 33 аминокиселинни остатъка (CM040219 [HGMD]). От друга страна хипоморфния алел в транс позиция е свързан с ниска експресия на незасегнатото копие, което води до клинично изявена еритропоеична протопорфирия.

Мутацията, открита при П2 с.913-1G>C, представлява новоустановена нуклеотидна замяна, но на съседната позиция в инвариабилния сплайс-акцепторен локус с.913-2 е описана базична замяна на А също при пациент с еритропоеична протопорфирия (CS982196 [HGMD]). Това говори в полза на функционалното значение на новоустановената сплайсинг мутация. Тя възпрепятства снаждането на иРНК молекулата и предизвиква загуба на екзон 9, т.е. формира се нефункционален протеин. Братът на П1, който е безсимптомен, е хетерозиготен носител само на IVS3-48C>T.

Чрез секвенирането на 5-те гена, свързани с хемохроматозата установихме, че 4 от изследваните от нас пациенти са с ювенилна хемохроматоза тип 2а. Беше открита мутация p.G320V в гена за хемоювелин HFE2 в хомозиготно състояние. Тази мутация е описана за пръв път от Rapanikoulau et al 2004 при семейства от гръцки произход, едно канадско и едно френско семейство с ювенилен тип хемохроматоза с неоткриваеми нива на хепсидина при всички в урината. G320V мутацията е най-честата мутация в европейската популация при пациенти с ювенилна хемохроматоза тип 2а. Патогенният ефект на G320V мутацията беше доказан от Silvestri et al 2007. Поради нарушеното зреене на пептида, той се задържа в ендоплазматичния ретикулум и апарата на Голджи и не се насочва към клетъчната мембрана. Това обуславя липсата на мембранно-свързания хемоювелин и като краен ефект нарушеното стимулиране на синтезата на хепсидина в резултат на излишък от желязо в клетката.

Един от изследваните от нас пациенти беше хомозигот по класическата мутация C282Y на HFE гена. Тя е установена за пръв път при пациенти с хемохроматоза в късна възраст от Feder et al 1996. Тази мутация е най-честата, причиняваща хемохроматоза в северно европейските народи, понеже е с „келтски произход”. Пациентите с класическа хемохроматоза представляват 1/3 , а тези с ювенилен тип – 2/3 от лекуваните и диагностицирани хемохроматози в клиниката по гастроентерология. Този факт е в

разрез с пропорциите в повечето западно европейски страни, където над 80% от пациентите са с класическа тип 1 хемохроматоза. Следователно може да твърдим, че честотата на HFE-хемохроматозата в нашата популация е изключително ниска. Все пак, това не трябва да пренебрегва насоченото търсене на мутации в HFE гена като надежден метод за потвърждение на клиничната диагноза. От друга страна, поради сравнително късната възраст на изявата на болестта (5-6-та декада) и по-леката клинична картина може би класическата хемохроматоза остава неразпозната у нас.

Това е първото изследване, което цели да характеризира честотите на HFE мутациите при българските пациенти с хронична чернодробна болест и синдром на претоварване с желязо. При изследваните от нас лица с чернодробна патология и синдром на претоварване с желязо се установи леко завишена честота на мутациите на HFE гена - C282Y (4.9% в сравнение с 0%), H63D (31.7% в сравнение с 22%) и S65C (4.9% в сравнение с 0%). Като цяло липсват епидемиологични проучвания относно честотата на мутациите на HFE в българското население. Съществуват данни от генотипизирането за трите най-чести полиморфизми на HFE гена при една контролна група от 100 здрави българи, откъдето личи, че честотата на C282Y и S65C е много ниска, а тази на H63D е сравнително висока [Ivanova 1999, von Ahsen et al 2001].

В нашето проучване не се установиха носители на мутация при пациентите с HBV инфекция. Носители на поне 1 мутация в HFE гена бяха 8 пациента с HCV инфекция и синдром на претоварване с желязо. Установихме 1 сложен хетерозигот, 1 хомозигот и 4 хетерозигота по H63D мутацията измежду пациентите с HАСХ. Все пак, установихме 2 сложни хетерозигота C282Y/H63D с известна етиология (ПБЦ и HАСБ) на чернодробната болест, което се обсъжда като една от възможните причини за хемохроматоза или за синдром на претоварване с желязо. По литературни данни около 5% от пациентите с клинично изявена хемохроматоза носят този генотип [EASL CPG HFE Hemochromatosis 2010].

Изследвахме екзони 1,3 и 5 на HFE гена и другите 4 гена, участващи в обмяната на желязото, а именно HFE2, HAMP, TfR2 и SLC40A1 при общо 9 пациента с известна етиология на чернодробната болест, но и с клинично съмнение за хемохроматоза. При 4 от тях, а именно вече описаните 2 сложни хетерозигота C282Y/H63D и 2 хомозигота по H63D мутацията, не се установиха други значими полиморфизми в екзоните на гените, свързани с желязната метаболитизъм.

Една пациентка с HCV цирроза беше хетерозиготен носител на две мутации в различни гени, т.е. двоен хетерозигот S65C+/- в HFE гена и R752H+/- в TfR2 гена. Този

полиморфизъм е описан за пръв път от Lee et al 2001. Установен е при 2 от 23 пациента с хемохроматоза, но също така и при 9 от 65 здрави контроли [Mattman et al 2002, Lee et al 2001, Lee et al 2001, Merregalli et al 2000]. PolyPhen-2 софтуерът предсказва патогенен ефект за миссенс мутация.

Друг пациент с хроничен хепатит С беше двоен хетерозигот H63D+/- в HFE гена и с.98-6C>T+/- в HFE2 гена, а при 1 пациент с НАСБ открихме хетерозиготно носителство на същия полиморфизъм в интрон 2 на HFE2 гена. Това представлява рядък интронен полиморфизъм преди началото на екзон 3 на HFE2 гена. Този полиморфизъм е установен от Lee et al 2001 при пациенти с фенотип на синдром на претоварване с желязо, като алелната му честота е била 2.03%. Ролята му върху обмяната на желязото е спорна.

Открихме 1 хетерозиготен носители на T31M мутация в HAMP гена. Тази рядка миссенс замяна е установена в хомозиготно състояние от Lee et al 2001 при изследване, целящо да открие полиморфизми, които модулират пенетрантността при хемохроматозата. Носителят на тази миссенс мутация обаче е бил с нормални параметри на желязната обмяна. Засега патогенният и ефект остава неясен. T31M мутацията е разположена в про-домена на човешкия хепсидин (полипептидът се синтезира като прохепсидина, след което се разцепва до хепсидин). Тъй като тя е разположена на втора позиция от началото на екзон 3, може да се подозира възпрепятстване на правилното снаждане. PolyPhen-2 софтуерът показва различни скорове за HumDiv и HumVar, според първия нуклеотидната замяна е вероятно патогенна, а според втория скор – по-скоро бенигна.

H1069Q беше най-честата мутация при изследваната от нас група пациенти, като дялът на хомозиготите беше около два пъти по-голям от дялът на хетерозиготите, съответно 26 срещу 13 пациента. Тези находки съответства на описанията в другите страни от Източна и Централна Европа, където също преобладава H1069Q мутацията [Panagiotaki et al 2004].

Възрастта на изява на болестта беше статистически значимо по-ниска при пациенти, носители на 2 нон-сенс мутации в сравнение с останалите болни. Този факт съответства на находките от други съобщения [Gromadzka et al 2005, Merle et al 2007]. Обяснението се крие във функционалния ефект на нонсенс мутациите. Те предизвикват образуването на преждевременни стоп кодони и водят до синтезата на частичен протеин и по-тежка фенотипна изява - в по-ранна възраст и с по-ниски стойности на церулоплазмина.

Установихме връзка между проявата на неврологична симптоматика и носителството на H1069Q мутацията в изследваната от нас група пациенти с чернодробна форма на болестта на Уилсън. За разлика от резултатите при проучвания, които показват същата връзка [Stapelbroek et al 2004, Panagiotaki et al 2004, Vrabelova et al 2005], ние не свързахме носителството на H1069Q с по-късна възраст при изявата на болестта. Такава взаимовръзка не установихме при пациентите хомозиготи по H1069Q в сравнение с останалите. Mihaylova et al 2012 не установяват асоциация между наличието на H1069Q от една страна и по-късната възраст на изява и проявата с неврологична симптоматика от друга страна при изследваната от тях група от 123 лица, но най-вероятно съществува дублиране на известен брой пациенти и в двете изследвани групи. За разлика от нашите резултати, авторите показват, че чернодробната, а не неврологичната изява е по-честа при изследваните от тях хомозиготи по H1069Q.

Нашето изследване обхваща само пациенти, които са диагностицирани поради установени симптоми на чернодробна болест и лекувани в клиниката по гастроентерология. Поначало представляват пациенти с чернодробна форма на болестта. В този смисъл не е оправдано да търсим реални генотипно-фенотипни корелации с изявата с чернодробно ангажиране в нашата изследвана група, точно поради съществуващия предразсъдък относно подбора на пациентите. В изследваната от Mihaylova et al 2012 група, болните са подбрани от няколко университетски клиники, между които неврологична, детска и няколко клиника по гастроентерология и представят по-пълната картина на изявата на болестта. Най-вероятно установената от тези автори по-висока честота на чернодробно засягане при българските пациенти хомозиготи по H1069Q е по-представителната находка. Ние от друга страна, се опитахме да намерим връзка между формата на изява на чернодробната болест – ХХ, компенсирана и декомпенсирана ЧЦ, и носителството на различен тип мутации, но не се постигна съществен резултат. Нямаше разлика във формата на проява на чернодробната болест, както между хомозиготите, така и между носителите на H1069Q в сравнение с останалите пациенти. Не се установи таква връзка и при носителите на 2 или 1 нон-сенс мутации в сравнение с останалите болни.

Стойностите на куприурията на фона на терапия с еднакви дози пенициламин бяха статистически значимо по-ниски при носителите на H1069Q в сравнение с останалите пациенти. Доколко този факт има терапевтично значение е спорно, защото стойностите на куприурията при лечение зависят от периода на прилагане на

медикамента. По-високи са стойностите в началото (около 16 $\mu\text{mol}/24\text{h}$) с тенденция към намаляване в рамките на 3 до 8 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ при дълготрайно приложение [Brewer et al 1989]. Може би тази връзка отразява самоволното краткотрайно прекъсване на лечението и породените от това колебания в стойностите на медната екскреция или корекциите на дозата поради бъбречно ангажиране при носителите на H1069Q и останалите болни. От друга страна ако приемем, че H1069Q мутацията е свързана с късна възраст на изява на болестта (не и в нашата група), т.е. с по-бавно натрупване на мед в тъканите може би то обуславя тези значимо по-ниските стойности на куприурията на фона на терапия.

В заключение при генотипно-фенотипните корелациите при пациентите с чернодробна форма на болестта на Уилсън установихме връзка между типа на мутациите свързатта на изява на болестта, проявата с неврологична симптоматика и стойностите на куприурията на фона на терапия.

VIII. ИЗВОДИ

- 1) Доказани са известни и новооткрити мутации в различните гени, регулиращи биосинтезата на хема при болни с порфирии в България
- 2) Известните и новоустановени мутациите при острата интермитентна порфирия са специфични за отделните семейства
- 3) Новоустановените мутации при семействата с порфирия вариетата показват гнездови географски различия
- 4) Преобладава Q206X мутацията при фамилната форма на порфирия кутанеа тарда в България
- 5) По-ранната изява на заболяването, липсата на рискови фактори (алкохолна консумация, HCV инфекция, чернодробна цироза към момента на диагнозата и по-ниската степен на повишение на АЛТ и ГГТ) говорят в полза на фамилната форма
- 6) Доказаните мутации в гена за хемоювелин при изследваните от нас български пациенти потвърждава редкия ювенилен тип хемохроматоза
- 7) HFE мутациите се установяват и сред българските пациенти с хронични чернодробни заболявания със синдром на свръхнасищане с желязо (в 37%) предимно при болните с хронична HCV инфекция и НАСБ. Доказват се и двойни, и сложни хетерозиготи. Нито един от изследваните 4 болни със самостоятелна хронична HBV инфекция не е носител.
- 8) Доказахме следните генотипно-фенотипни корелации при болестта на Уилсън: по-ранна изява на болестта при носителите 2 нонсенс мутации, по-честа изява с неврологична симптоматика и по-ниски стойности на куприурията на фона на терапия при носителите на H1069Q

IX. ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

- 1) Доказани са за първи път молекулярно-генетичните дефекти при българските пациенти с порфирии и нарушения в обмяната на желязото
- 2) За първи път в света са открити и съобщени 9 нови мутации при семейства с порфирии
- 3) Доказването на специфичните за всяко семейство мутации при острите порфирии позволява избягване на рисковите фактори за отключване на остър пристъп, ранна диагноза при появата му и своевременно лечение, редуциращо риска от сериозни усложнения и смърт
- 4) Изграден е алгоритъм за разграничаване на фамилната от спорадична порфирия кутанеа тарда
- 5) За първи път са доказани български пациенти с ювенилна хемохроматоза с хетерозиготни родственици
- 6) Доказани са генотип-фенотипни корелации при български пациенти с чернодорбна форма на болестта на Уилсън с изявата, протичането и ефекта от лечението

Х. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Списък на научните публикации във връзка с дисертацията

1. Dragneva S., Szyszka-Niagolov M., Ivanov A., Mateva L., Izumi R., Aoki Y., Matsubara Y. Seven novel mutations in Bulgaria patients with Acute Hepatic Porphyrrias. Journal of Inherited Metabolic Disease (Reports) July 2014 doi 10.1007/8904_2014_320. Impact factor 4.138 (2013)

2. С. Драгнева, Ц. Маринова, В. Матеева, М Шишка- Няголов, Г. Матеев, А. Иванова, З. Спасова, Л. Матева. Жена с еритропоеична протопорфирия (ЕПП) с черnodорбно увреждане – клинична характеристика. Българска хепатогастроентерология. Г.2014. КН -1. стр.46

3. М. Пенкова, С. Драгнева, Цв. Маринова, Р. Иванова, М. Гълъбова, Юл. Ананиев, Л. Матева. Оценка на флеботомията в лечението на синдрома на претоварване с жлязо при неалкохолна и алкохолна стеатозна болест. Българска хепатогастроентерология. Г 2011. КН -2 стр. 66

4. С. Драгнева, М. Шишка- Няголов, А. Иванова, Л. Матева. Диагностични различия между фамилната и спорадичната порфирия кутанеа тарда. Българска хепатогастроентерология. Г2014 КН-2 (под печат)

Списък на научни участия в български и международни форуми, и абстракти, публикувани в чуждестранни списания във връзка с дисертацията

1. С. Драгнева, Ц. Маринова, М. Шишка-Няголов, А. Иванова, З. Спасова, Л. Матева. Две новооткрити мутации при български пациенти с еритропоеична протопорфирия. Пета национална конференция за редки болести и лекарства сираци 26-27 септември 2014 Пловдив. Сборник с резюмета стр.46

2. С. Драгнева, М. Шишка-Няголов, А. Иванова, Л. Матева. Фамилна порфирия кутанеа тарда в България: молекулярно-генетичен анализ при 14 семейства. Пета национална

конференция за редки болести и лекарства сираци 26-27 септември 2014 Пловдив.
Сборник с резюмета стр.45

3. S. Dragneva, T. Petkova, L. Mateva. Effect of Cuprenil on liver disease in Bulgarian patients with Wilson's disease (WD). 7th Central European Gastroenterology Meeting CEURGEM 2012 Cluj-Napoca, Romania 2012. Abstract book p.17

4. Kosseva O, Kaneti E, Krastev Z, Petkova T, Dimitrova N, Dragneva S. Predictions of liver cirrhosis with biochemical markers in patients with Wilson disease. Fibrotest and SOS FS. Falk Symposium 195 Challenges and management of Liver cirrhosis October 10-11 2014 Freiburg Germany. Abstracts p.31

5. С. Драгнева, М. Няголов, А. Иванова, Л. Матева. Мутации на гена за порфобилиногендеаминаза при български пациенти с остра интермитентна порфирия. Трета национална конференция за редки болести и лекарства сираци 14-15 септември 2012. Конферентен сборник стр.30

6. С. Драгнева, Д. Дачева, Р. Кънева, Р. Иванова, Л. Матева. Мутации на HFE гена при пациенти с хронични чернодробни заболявания със синдром на претоварване с желязо. Трета национална конференция за редки болести и лекарства сираци 14-15 септември 2012. Конферентен сборник стр.38

7. С. Драгнева, Т. Петкова, З. Спасова, Н. Димитрова, А. Алексиев, Д. Попов, Б. Томов, Л. Матева. Повлияване на чернодробното увреждане от лечение с Купренил при български пациенти с болест на Уилсън (БУ). Втора национална конференция за редки болести Пловдив 9-11 септември 2011. Сборник с постери и доклади постер 18.

8. O. Kosseva, N. Dimitrova, T. Petkova, S. Dragneva, Z. Spassova, L. Mateva. Characteristics of liver diseases in Bulgarian patients with Wilson's disease. 4th Eastern European Conference for rare Diseases and Orphan Drugs "Rare Diseases in the Focus of Personalized medicine" 2-4 July Saint-Petersburgh, Russia. Abstracts p.38

9. Т. Петкова, О. Косева, Н. Димитрова, З. Спасова, С. Драгнева, Л. Матева. Характеристика на чернодробното увреждане при български пациенти с болест на

Уилсън. Първа национална конференция за редки болести 28-30 май 2010. Сборник доклади и постери стр.139

Благодаря Ви!

На майка ми и баща ми 😊

На проф. Аджаров за идеите, съветите и критиките му... на Доротея за ентусиазма и помощта...

На Японското правителство и екипа на проф. Матсубара за шанса да усетя истинската наука...