

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

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

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

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	3 стр.
Въведение.....	5 стр.
Литературен обзор.....	6 стр.
Цел и задачи.....	33 стр.
Материал и методи.....	35 стр.
Резултати	45 стр.
Част 1. Порфирии.....	45 стр.
Част 2. Хемохроматоза.....	61 стр.
Част 3. Хронични чернодробни заболявания със съпътстващ синдром на претоварване с желязо.....	68 стр.
Част 4. Болест на Уилсън.....	84 стр.
Обсъждане.....	93 стр.
Изводи.....	115 стр.
Литература.....	117 стр.

I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

АК – аминокиселина

ЗД – захарен диабет

ПП – порфиричен простъп

ОП – общи порфирини

ПБГ - порфобилиноген

ДАЛК-С – δ -аминолевулинова киселина

ОПу – общи порфирини в урина

ОПи – общи порфирини в изпражнения

Уро - уропорфирин

Коп - копропорфирин

Прото - протопорфирин

НАСБ – неалкохолна стеатозна болест

СН – сърдечна недостатъчност

ТЖСК – тотален желязосвързващ капацитет

ЧЦ – чернодробна цироза

ХХ – хроничен хепатит

ОХ – остър хепатит

ХХВ – хроничен хепатит В

ХХС – хроничен хепатит С

Ж - женски пол

М – мъжки пол

ЕВ – езофагеални варици

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 трансферинов 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

Порфирите, хемохроматозата и болестта на Уилсън са редки социално 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 е 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. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Остри порфирии

Порфириите са разнородна група от 7 метаболитни заболявания. В основата на всяка от тях стои дефект на точно определен ензим от биосинтезата на хема. Ензимните дефекти водят до метаболитни блокове, които обуславят свръхобразуването и натрупването на междинни продукти на обмяната. Те оказват токсични ефекти, проявяващи се с много широк спектър от оплаквания и специфични за всяка от порфириите клинични и лабораторна находки.

Порфириите се разделят на чернодробни и еритропоеични в зависимост от това дали метаболитният блок, т.е. абнормното натрупване на междинни вещества се извършва в черния дроб или еритропоеичната тъкан. Чернодробни порфирии са следните: 1. Остра интермитентна порфирия; 2. Порфирия вариегата; 3. Вродена копропорфирия; 4. Плумбопорфирия и 5. Порфирия кутанеа тарда. Еритропоеичните порфирии включват вродена еритропоеична порфирия и еритропоеична протопорфирия.

От голямо значение за диагностиката и терапията са порфириите, които протичат с остър пристъп. Поради разнообразните клиничните изяви на тези заболявания, много често се допускат диагностични грешки, които водят до неправилна и рядко влошаваща състоянието на болния и терапията. С пристъпи протичат остра интермитентна порфирия, порфирия вариегата, вродена копропорфирия и плумбопорфирията (1,2,5).

Патогонеза на острия пристъп

Порфиричният пристъп е драматично състояние, което при късно разпознаване и несъответно лечение може да завърши със смърт или трайна инвалидност. Дължи се на свръхобразуването и натрупването в черния дроб на междинни метаболити от хемсинтазата (или техни производни) в резултат на ензимния дефект при съответната порфирия. За разнообразието от клинични прояви вероятно допринася и намаленото образуване на хем в черния дроб. Въпреки че метаболитният блок се експресира в хепатоцитите, клинично острия пристъп протича с генерализирана невропатия. Ензимният дефект обаче не е достатъчно условие за възникване на пристъпа.

Необходимо е въздействието на допълнителни екзогенни или ендогенни фактори, за да премине заболяването от латентно в клинично проявено.

Факторите отключващи острия пристъп са многобройни. Най-важната група от тях са някои лекарства - всички медикаменти, които индуцират биосинтезата на цитохром Р-450 са потенциално порфириногенни. Друг фактор е намаляването на въглехидратните запаси в организма и по-точно ниското ниво на кръвната захар. Подобно на хема, глюкозата е естествен инхибитор на синтазата на δ -аминолевулиновата киселина (ДАЛК-С) и намалената и концентрация води до индуцирането на този ензим. Такъв ефект се получава при остро и хронично гладуване, диети, физическа преумора, водеща до изчерпване на гликогенните запаси в мускулатурата. Порфириногенно действие имат и оралните контрацептивни средства, терапиите с полови хормони, алкохолът и всички инфекции. Подобен ефект се приписва и на стреса. Нормалните хормонални флуктуации при менструация и бременност също могат да отключат развитието на пристъпа (1,2,5).

Клинични и лабораторни находки при остра интермитентна порфирия, порфирия вариетата и вродена копропорфирия

Клинично порфиричният пристъп се характеризира с три главни синдрома: гастроинтестинален, периферно-неврологичен и психиатричен. Водещите оплаквания са много силни коремни болки – локализирани или дифузни, които са вегетативно обусловени. Придружават се от гадене, повръщане и чревна атония. Често болките се излъчват към кръста и имитират нефролитиазна криза. Периферно-неврологичният синдром се извява в слабост и силни болки в напречно-набраздената мускулатура, дизестезии, парестезии, хипо- до арефлексия и развитие на вяли парези и парализи. Възможно е увреждане на централната нервна система с гърчове и епилептиформени припадъци, засягане на черепно-мозъчни нерви. Болните са с тежка депресия. Не са изключени и психотични явления като делир и аменция. Налице е силно повишен симпатикотонус с изразена тахикардия и хипертензия. Най-честите причини за смъртност при острия пристъп са асфиксията, дължаща се на парализа на диафрагмата и междуребрената мускулатура и внезапният сърдечен арест, обусловен от симпатикотонията(1,2).

Биохимично острата интермитентна порфирия се диагностицира чрез екстремни повишения на порфобилиногена (ПБГ) и δ -аминолевулинова киселина (ДАЛК) в

урината, което се дължи на дефицитната порфобилиноген деаминаза (PBGD). Увеличени са и уропорфиринът и копропорфиринът в урината. Те се образуват спонтанно от големите количества ПБГ. Въпреки че ензимните блокове при порфирия вариегата и вродена копропорфирия и вродена копропорфирия са разположени в по-късни етапи на хемсинтазата, при пристъпите също се установяват екстремни повишения на ПБГ и ДАЛК (113).

Освен пристъпи при порфирия вариегата и вродената копропорфирия установява и ерозивно-булозна фотодерматоза (123). Поради ензимния блок се натрупват големи количества порфирини в черния дроб. Част от тях чрез кръвта достигат до кожата, където под влияние на светлината предизвикват фотодинамичен ефект, водещ до ерозивно-булозната фотодерматоза. Друга част от отложените в черния дроб порфирини попадат в червата чрез жлъчката. При порфирия вариегата в изпражненията се установява много изразено покачване на протопорфирина и по-слабо на копропорфирина. Повишават се и уропорфиринът и копропорфиринът в урината. Патогномоничен за порфирия вариегата е т. нар. порфирин-белтъчен комплекс в кръвната плазма. Той се открива като изразен емисионен пик при флуоресцентно скениране на разрежена кръвна плазма в областта на 626-627 нм при възбуждане на 398 нм. (85). При вродената копропорфирия увеличението на копропорфирина силно преобладават над тези на уропорфирина.

Ерозивно-булозната фотодерматоза при порфирия вариегата и вродената копропорфирия е хронична и се влияе силно от интензивността на слънчевото облъчване. Тя не е свързана като изява с наличието на притъп, тъй като не е пряко индуцируема. При редица пробанди не се развиват пристъпи, а само кожни прояви.

Значение на своевременното откриване на латентно генно носителство за предотвратяване на порфиричен пристъп

Специализираните биохимични изследвания осигуряват точната диагноза и надеждното проследяване на лечението при пробандите. Изявени промени при съответните биохимични показатели обаче рядко се наблюдават измежду тези кръвни роднини, които са латентни носители. Техният брой превишава многократно този на пробандите (11). Всеки латентен носител е застрашен от клинична изява на порфирията, ако попадне под въздействието на споменатите по-горе отключващи фактори. Именно поради това своевременното откриване на латентно носителство

измежду роднините на болния е от изключителна важност, тъй като то ще насочи болния към избягване на тези фактори. При развитие на клинични симптоми у генния носител ранното лечение би довело до бърза ремисия. Оптималният подход при диагностициране на новооткрит болен с остра интермитентна порфирия, порфирия вариегата и вродена копропорфирия изисква изследване за генно носителство. (1,2).

Подходи за установяване на латентно генно носителство при остра интермитентна порфирия, порфирия вариегата и вродена копропорфирия

Откриването на генно носителство цели установяване на дефицита на специфичния ензим, който стои в основата на съответното заболяване. При по-стария биохимичен подход се определяше активността на PBGD в еритроцитите за откриване на остра интермитентна порфирия. За търсене на носителство при порфирия вариегата и вродена копропорфирия се изследваха съответно протопорфириноген оксидазата (PPOX) и копропорфириноген оксидазата (CPOX) в лимфоцити от венозна кръв или кожни фибробласти (112). Сnižената ензимна активност насочваше към латентно носителство. В някои случаи обаче резултатите от ензимните изследвания попадат в т. нар. сива зона, т.е. близо до референтните граници. В тези случаи категорично причисляване на този индивид към напълно здравите или сигурните латентните носители не е възможно. Молекулярно-биологичните изследвания предлагат откриване на мутация в гена, кодиращ съответния дефицитен ензим, което би способствало за изясняване на характера на мутациите при сигурните болните, след което и при членовете на техните семейства.

Основни данни за PBGD и PPOX и наблюдаваните мутации при тях

Генът на PBGD е разположен в хромозомна област 11q24, съдържа 15 екзона и обхваща около 10 kb от ДНК. Съществуват два различни промотора на PBGD и съответно две различни иРНК. По-проксимално разположения промотор е общ, т.е. той е активен във всички тъкани на организма, включително хепатоцитите. Другият промотор е разположен около 3 kb дистално и е активен само при развитието на еритроидната тъкан. Двата промотора и двете РНК обуславят наличието на два тъканно-специфични изоензима – общ и еритроиден. Те се различават по техните N-терминална аминокиселинна последователност. При еритроидната иРНК липсва

първият от 15-те екзона, поради което самата молекула съдържа 17 аминокиселинни остатъка по-малко (74).

От диагностичен интерес са някои семейства с остра интермитентна порфирия, при които активността на еритроцитите не е понижена. Установено е, че при тях мутацията засяга само общия изоензим, тъй като се намира в екзон 1 или на границата с интрон 1. Понеже в иРНК на еритроидния изоензим екзон 1 липсва, неговата синтеза и каталитичната му активност в еритроидната тъкан е нормална. В този случай молекулярно-генетичното изследване избягва недостатъците на биохимичния анализ. Мутациите, установявани в гена на PBGD са разнообразни и надвишават 300 към момента (84 достъп 2015). Най-честите обхващат единични нуклеотидни замени (най-често), малки инсерции и делеции, абнормен спайсинг. Описани са също и големи генни делеции (198). В някои страни се наблюдава т. нар. „founder” - основополагащ ефект, т.е. една и съща мутация се открива при много семейства. При половината от болните с остра интермитентна порфирия в Швеция, обитаващи северните части на страната е налице с.953G>A в екзон 10 (21). Подобни „основополагащи” мутации са доказани в Холандия и Финландия.

Генът на PPOX е локализиран върху хромозома 1q22-23, състои се от 13 екзона и обхваща 11.6 kb. (149). Понастоящем са известни над 150 разнообразни по типа си мутации в този ген (84). Бяха описани наскоро и големи генни делеции (Barbaro et al 2013). Досега са описани и няколко основополагащи мутации, измежду които особено значима е южноафриканската R59W мутация (113). Тя е най-разпространената измежду бялото население на Южна Африка (честота 1:300). Генът за CPOX е локализиран върху хромозомна област 3q12 и се състои от 8 екзона като обхваща около 72.6 kb от ДНК. Общо над 150 разнообразни мутации са описани в този ген.

От звеното за диагностика, лечение и дълготрайно наблюдение на порфириите в България през последните 50 години активно се проследяват над 35 семейства с остра интермитентна порфирия, 20 – с порфирия вариегата и 3 - с вродена копропорфирия. при семействата с остра интермитентна порфирия се прилага биохимичният подход за откриване на латентно носителство. При семействата с порфирия вариегата вродена копропорфирия, засега не се изследват активностите на PPOX и CPOX в лимфоцити нито при пробандите, нито при техните роднини. Определянето на порфирините в урината и изпражненията рядко показва съществени отклонения при роднините носители. Относително по-полезно е търсенето на споменатия порфирин-белтъчен комплекс чрез флуориметрично изследване на кръвна плазма при семействата с

порфирия вариегата. Той обаче се установява само при около половината от възрастните латентни носители и не се открива при децата със същия ензимен дефект (113).

Горните обстоятелства подсказват нуждата от въвеждане на молекулярно-генетичното изследване при пробандите с остри порфирии и множеството им роднини в България. С голяма вероятност може да се очаква откриването на две мутации, водещи до основополагащи ефекти при семействата с порфирия вариегата (4). Значителна част от пробандите с порфирия вариегата имат сред предшествениците си лица, произхождащи от с. Буйновци, община Елена. Друга също не малка част от пациентите с порфирия вариегата произхождат от българо-мохамеданските села около Велинград. Някои от тях знаят, че са далечни или по-близки роднини, а други - не. Може да се очаква сред тези села да се открият десетки, а може би и повече латентни носители на една и съща мутация в PPOX.

Порфирия кутанеа тарда

Порфирия кутанеа тарда (OMIM 176100) е най-разпространената човешка порфирия в повечето страни на света. Честотата и варира между 5 и 10 на 100 000 (90). В основата на нейната патогенеза стои снижената активност на ензима уропорфириноген декарбоксилаза (UROD) (EC 4.1.1.37) в черния дроб. Това води до натрупване в този орган на големи количества уропорфирин, по-умерени на хептакарбоксипорфирин и в невисока степен на хекса - и пентакарбоксипорфирин.

Клинично протичане

Обикновено заболяването се развива след 30-годишна възраст, като най-често се проявява в петото или шестото десетилетие. Много по-често боледуват мъжете. При твърде рядкото проявяване на заболяването преди 30-годишна възраст обикновено е на лице фамилна порфирия кутанеа тарда. Макар и рядко тази форма обаче може да се прояви и в по-късна възраст или да остане за цял живот субклинична (т. е. само с промени в показателите на порфириновата обмяна) или латентна (единствено с данни за понижена активност на UROD в еритроцитите) (28)

Кожни промени

Фотодерматозата при порфирия кутанеа тарда има ерозивно-булозен характер. Кожата по откритите части на тялото - гърба на дланите, китките и пръстите, по лицето, ушите и врата, а при някои жени — и по подбедриците и гърба на ходилата - е много лесно ранима. След минимални травми се получават ерозии, които бавно се покриват с кафеникави крусти. Появяват се мехури, които не са обкръжени от възпалителна зона. Откритите части на тялото са дифузно хиперпигментирани. Въпреки че невинаги е на лице, хипертрихозата може да бъде най-ранният признак на фотодерматоза. Тя е най-изразена в зигоматичните области, около очните орбити и по челото, но може да се наблюдава по всички открити части на тялото.

Чернодробни промени

Клиничните белези на хроничното чернодробно увреждане обикновено се явяват след дерматологичните симптоми. При различните болни с порфирия кутанеа тарда се установяват разнообразни находки- от леко изразена стеатоза, през стadiите на хроничен хепатит до напреднала цироза. Хистологично се установява повишено отлагане на желязо в хепатоцитите и Купферовите клетки. Сидерозата е от по-лека степен в сравнение с идиопатичната хемохроматоза (90), но е по-изразена, отколкото при другите хронични чернодробни заболявания (37). Болните от порфирия кутанеа тарда нерядко умират от усложненията на развила се чернодробна цироза и са със съществено повишен риск за развитието на първичен чернодробен рак (156).

Форми при порфирия кутанеа тарда

Различават се две основни форми на порфирия кутанеа тарда - спорадична (или придобита, I тип), фамилна (II тип) (48). Активността на UROD в черния дроб е понижена и при двете форми.

При спорадичната порфирия кутанеа тарда UROD е намалена само в черния дроб и нормална в останалите тъкани, вкл. еритроцитите (49,50) . Болният няма родственици, засегнати от заболяването. Съществена роля за изява на болестта при тази форма играят отключващите фактори, които действат поединично или по-често в комбинация. Най-честите измежду тях са системната употреба на алкохол, хроничната HCV инфекция, приемането на естрогени, повишеният внос на желязо под формата на

медикаменти или кръвопреливания и мутации в HFE гена при пациенти от северно европейски произход.

При фамилната порфирия кутанеа тарда UROD е понижена и като ензимна активност, и като ензимен белтък със средно 50% (51) във всички тъкани, вкл. еритроцитите, като данни за проявена или латентна порфирия кутанеа тарда има и при роднини на болния. Тип II порфирия кутанеа тарда се унаследява автозомно-доминантно. Заболяването не се извява клинически и остава латентно у мнозинството от генните носители. В зависимост от честотата на отключващите фактори в дадената популация и наличието на основополагащ ефект, относителният дял на фамилната порфирия кутанеа тарда варира между 15 и 30% от общия брой случаи с порфирия кутанеа тарда (188). Средно около 25% са случаите с фамилна порфирия кутанеа тарда при европейската популация, вкл. и у нас.

Подходи при определяне активността на UROD в еритроцитите

Определянето активността на UROD в еритроцитите има важно значение при порфирия кутанеа тарда за установяване формата на заболяването. Докато активността е нормална при спорадичната порфирия кутанеа тарда, при фамилната тя е понижена, поради разпространението на ензимния дефект във всички тъкани. Това биохимично определяне е особено съществено за откриване на латентните носители измежду родствениците на болните с фамилна порфирия кутанеа тарда. При тях активността на UROD в еритроцитите също е намалена(3). И тук обаче тълкуването на резултатите е проблематично. При голяма част от латентните носители няма и установими промени в порфириновата обмяна.

Генетични дефекти при UROD

В основата на снижената в черния дроб и еритроцитите UROD при фамилната порфирия кутанеа тарда стоят хетерозиготни мутации в кодовата област на ДНК на ензима (48, 109, 120). Той е кодиран като единичен ген с единствен промотор върху късото рамо на I хромозома 1p.34, съдържа 10 екзона и обхваща 3,5 kb. До момента са описани над 120 различни мутации в UROD. Мнозинството са единични точкови мутации, но са установени и малки делеции и инсерции (84). Намерени са също и големи генни делеции (185). Мутациите водят до подмяна на някои аминокиселини в

белтъчната молекула на ензима нарушават нормалния сплайсинг на РНК молекулата или променят рамката на четене на ДНК като водят до формирането на извънредни стоп кодони. Така се достига до производство на по-къс и лесно разграждащ се ензимен белтък (186, 187, 188). Не е установена връзка между типа на мутацията и тежестта на клиничните явления.

При семействата с фамилна порфирия кутанеа тарда се откриват различни мутации. Изключение представляват болните от Норвегия, където при 74% от изследваните 251 болни с порфирия кутанеа тарда се установява присъствието на само две мутации с.578G>C и с.636+1G>C (10). При пациенти, произхождащи от южната част на Норвегия, е доказан основополагащ ефект за с.578G>C мутацията.

Броят на болните от РСТ, лекувани към звеното по порфирии през годините (около 215 лица), надхвърля този на останалите порфирици, взети заедно. Оптималният подход за откриване на латентно носителство при фамилните случаи с порфирия кутанеа тарда изисква изследване за носителство на мутациите в UROD гена.

Еритропоеична протопорфирия

Разпространението на еритропоеичната протопорфирия (ОМIM 177000) е около 1:100 000. Ензимният дефект засяга ферохелатазата (FECH) (EC 4.99.1.1) във всички тъкани, но метаболитният блок с натрупване на протопорфирин е изразен главно в ретикулоцитите и по-младите еритроцити. Протопорфиринът, който е в свободна форма лесна преминава през еритроцитната мембрана и попада в кръвната плазма, която го отнася до кожата. Характеризира се с еритемно-едематозна фотосенсибилизация (. След краткотрайно излагане на слънце болният получава парене, зачервяване, сърбеж и болезнен оток по откритите части на тялото. С течение на времето кожата лихенифицира, придобива въскоподобен цвят и наподобява портокалова кора. При част от болните може да има лека, безсимптомно протичаща хипохромна анемия.

При мнозинството болни заболяването има доброкачествен ход особено, ако се избягва слънчевото облъчване. При прогнозата на еритропоеичната протопорфирия обаче трябва да се подхожда предпазливо, поради възможността за поява на чернодробни увреждания (131). При част от болните се установяват хроничен хепатит и лека фиброза. Холелитиазата е честа, като конкрементите съдържат и протопорфирин (флуоресцират червено на UV-светлина). При около 5-10% от болните възниква тежко дифузно чернодробно увреждане с интрахепатална холестаза, което в повечето случаи се разви-

ва бързо и завършва фатално. Отлагат се изключително големи количества протопорфирин в черния дроб и жлъчните пътища.

Гени и унаследяване при еритропоетична протопорфирия

В мнозинството от случаите еритропоетична протопорфирия се обуславя от дефицит на FECH (ЕС 4.9.9.1.1). При около 2% от случаите обаче, тя се дължи на прекомерно високата активност на еритроид-специфичната форма на (ДАЛК-С) (ЕС 2.3.1.27), първия ензим от биосинтезата на хема. Този факт дава основание да се отдели нов подтип протопорфирия- X-свързана доминантна протопорфирия (ОМИМ 300752) (200) . При случаите обаче на мутации водещи до прекомерно висока активност на ДАЛК-С, FECH става скоростоопределяща, което обяснява нивото на метаболитния блок. При пациенти с еритропоетична протопорфирия с X-свързано унаследяване, се установяват нормални стойности на ензима FECH. Най-честата находка са мутации, които водят до промяна в рамката на четене и формиране на извънреден стоп кодон около 20 аминокиселинни остатъка преди С-края на пептида. С-краят на белтъка инхибира функцията на ензима и неговото отстраняване води до прекомерно висока активност на ДАЛК-С. ДАЛК-С се кодира се от два различни гена – ДАЛК -1, разположен върху 3 хромозома и ДАЛК - 2, разположен върху X-хромозомата, който се експресира само в еритроидната тъкан. Генът за ДАЛК-С2 съдържа 11 екзона и обхваща 20 kb. До момента са описани около 6 различни мутации в ДАЛК-С2, причиняващи еритропоетична протопорфирия: 3 малки делеции, 1 малка инсерция и една миссенс мутация (84).

Обикновено унаследяването при еритропоетична протопорфирия е автозомно-доминантно като мутация в гена за FECH се установяват само в единия алел (24). Клиничната изява на болестта обаче се определя от наличието на хипоморфен алел IVS3-48C разположен в позицията транс спрямо наличната мутация в FECH (73).

В около 4% от случаите е налице и автозомно-рецесивно предаване. При тях се установяват мутации в двата алела на гена за FECH, като пробандите са сложни хетерозиготи (201). Родителите им са здрави, което може да се обясни с факта, че при тях липсва хипоморфният алел разположен транс спрямо установената при всеки един от двамата родители мутация. Генът за FECH е разположен върху 18 хромозома, съдържа 11 екзона и обхваща 41.9 kb. До момента са описани около 190 различни

мутации, повечето единични нуклеотидни промени, водещи до миссенс и нонсенс мутации, малки делеции и инсерции, както и големи делеции (84).

Подобно на доказването на всички останали порфирии, оптималният подход за диагностика на пробандите и латентни носители при семействата с еритропоеична протопорфирия изисква молекулярно-генетично изследване на FESN или ДАЛК-С.

Механизми на желязната резорбция и метаболизъм

Желязото е важен елемент за пролиферацията и диференцията на всички живи клетки. Дневните нужди от желязо, необходими за еритропоезата и за компенсация на загубите от клетъчната десквамация в червото и кожата са около 20-30 мг при възрастните. Само 10% от тези нужди се покриват чрез резорбция на желязо от дуоденоцитите и клетките в проксималния йеюлум. По голямата част от желязото произхождащо от загиващите еритроцити се рециклира (81). Резорбцията и транспортът на желязо е сложен, не докрай изяснен процес. Той поредставлява каскада, чрез която в организма попадат само необходимите количества. Степента на желязната резорбция се определя от съдържанието на желязо в ентероцитите, разположени в криптите на дуоденалната лигавица. Там на нивото на базалната мембрана функционира триада, състояща се от белтъка HFE, бета2 микроглобулина и TfR1/2. При здрави лица действието на този мембранен комплекс осигурява необходимия железен трансфер от кръвната плазма към криптичните ентероцити и достатъчно съдържание на желязо в тях. При здрави хора те съдържат в себе си достатъчно количество желязо, поради което резорбират само необходимите за организма количества железни йони (145). Така не се създават условия за железни натрупвания. При самата резорбция мембранно разположената фероредуктаза (CYBRD1) превръща ферийоните в дуоденалното съдържимо във феройони. Те се прехвърлят през апикалната мембрана на дуоденоцитите от двувалентния металотранспортер (NRAMP2), а феропортинът (SLC40A1) ги пренася през базалната мембрана в порталното кръвообръщение. При този етап желязото отново се окислява до ферийони от ферооксидаза, наречена хефестин (HEPH), който е аналог на церулоплазмина. В порталното кръвообръщение ферийоните се свързват с апотрансферин (81, 62). Желязото попада в клетките на черния дроб, костния мозък и други органи чрез трансферинови рецептори 1 и 2 (TfR1; TfR2).

Съществен регулатор на желязната обмяна представлява острофазовия пептид хепсидин (HAMP), който се синтезира само в хепатоцитите и функционира спрямо желязото като негативен регулатор. Продукцията на хепсидин се повишава при увеличени плазмена концентрация и отлагания в органните депа на желязо. Тогава хепсидинът забавя тънкочревната резорбция на желязо и го задържа в дуоденалните ентероцити, блокира рециклираното желязо в макрофагите на слезката и Купферовите клетки, както и намиращото се в хепатоцитите желязо. Така постъпването му в плазмата се ограничава и там железните нива се снижават. Негативният регулаторен ефект на хепсидина се осъществява чрез свързването му с феропортина, който е единственият фактор, екпортиращ желязото от клетките. Свързаният с хепсидин феропортин се интернализира в клетката и се разпада (127).

Освен от плазмената концентрация на желязо, хепсидиновата биосинтеза се влияе и от възпалителни процеси. Главният ѝ индуктор е интерлевкин 6. Анемиите, развиващи се при хронични възпалителни процеси се дължат на силно повишените хепсидинови нива (139, 146, 129).

Нарушения в обмяната на желязо

Хемохроматозата е заболяване характеризиращо се с претоварване с желязо и е най-честата генетична болест при лица от северозападен европейски произход. Най-честата форма на болестта е тип 1, която се обуславя от мутации в HFE гена (Feder 1996). Другите типове, 2, 3 и 4 са доста редки и се обуславят от протеини, изпълняващи също ключови роли в метаболизма на желязото (132,145,14,15). Формите на хемохроматоза се различават в зависимост от възрастта на изява на болестта, тежестта на натрупването на желязо и клиничната картина, но въпреки това патофизиологичният профил на синдрома на претоварване с желязо е общ. Повечето пациенти с хемохроматоза, абсорбират прекомерно количество желязо, поради загубата на „усет“ към наситеността на наличните железни депа. То се натрупва в клетките на таргетните органи: черен дроб, сърце, панкреас и ендокринни жлези. Основният механизъм на чернодробното увреждане при хемохроматоза е повишеният оксидативен стрес. Като елемент с променлива валентност желязото има мощен прооксидантен ефект, който се осъществява от силно токсичния хидроксилен радикал (OH^{*}). Той се образува от водородния прекис при реакцията на Fenton и предизвиква вторични реакции, водещи до липидна пероксидация на клетъчните и субклетъчните мембрани. Чрез активиране

на Купферовите клетки се стимулират стелатните клетки, което води до активиране на фиброобразуването. От оксидативния стрес се уврежда и ДНК, което е предпоставка за мута- и онкогенеза (145, 15). Продължителността и степента на отлагнето на желязо в черния дроб също са важни фактори за развитието и задълбочаването на чернодробното увреждане (133)

Мутации на гени свързани с регулацията на хепсидина

Най-честа в Европа е HFE- свързаната хемохроматоза (тип 1). В Европа тя най-често се изявява при хомозиготи за C282Y мутацията на HFE гена (80.6% от случаите) (54). Патогенният ефект на тази мутация е добре изяснен от Feder и съавт. (57) и Waheed и съавт (192) през 1997г. Човешкият HFE протеин съдържа 343 аминокиселинни остатъка. Той е хомоложен на HLA-H клас 1 пептидите и се състои от екстрацелуларен пептид- свързващ регион (алфа1 и алфа2 бримки); имуноглобулин- подобен домейн (алфа3 бримка); трансмембранна част и къса цитоплазмена „опашка”. По аналогия с други HLA-H мелекули се предполага, че HFE пептида съдържа вътремолекулни дисулфидни мостове в алфа2 и алфа3 бримките, които стабилизират третичната му структура. Дисулфидният мост в алфа3 домейна е необходим за свързването на HFE протеина с бета2 микроглобулина и ефективния транспорт до клетъчната мембрана. Замяната на позиция 282 на аминокиселината цистеин с тирозин възпрепятства образуването на дисулфидния мост в алфа3 домена на HFE протеина. По този начин мутантният HFE протеин се натрупва като високомолекулен агрегат, не се подлага на обработка и се задържа в апарата на Голджи и не достига клетъчната мембрана.

HFE протеинът се експресира най-вече в хепатоцитите и мутациите в него предизвикват намалено образуване на хепсидин (191). Смята се, че нормално HFE се конкурира с трансферина за свързване с TfR1 и/или специфичния за черния дроб TfR2, като комплексът HFE-TfR2 индуцира транскрипцията на хепсидина (65). Начин на действие на HFE и TfR2 върху образуването на хепсидина обаче не са напълно изяснени.

Класическата хемохроматоза се характеризира с изява около 4-5 десетилетие, натрупване на желязо в черния дроб, но в по-лека степен от това при ювенилна хемохроматоза. Възможна е прогресия на чернодробното увреждане в ЧЦ и първичен чернодробен рак (6).

Честота и разпространение на HFE мутациите

Общата честота на хомозиготната C282Y мутация в населението е 0.6%. Алелната честота на C282Y мутацията се оценява на около 6.2% при кохорта от 127, 613 пациента включени в мета-анализ. Съществуват значителни географски различия в честотата на C282Y алела между различните географски райони в Европа, като много по често се среща при хора от северозападната част на континента - 10-12.8% от населението в Ирландия, докато в южна Европа се среща значително по рядко – 0-1.3% в Гърция (54).

Освен главната C282Y мутация на HFE гена, „малка” мутация H63D се открива по-често при пациенти с наследствена хемохроматоза. Честотата на H63D полиморфизма показва по-малки географски различия и има средна честота на алела 14%. Друг допълнителен HFE полиморфизъм - S65C също може да се асоциира с натрупване на желязо когато се унаследи с C282Y в позиция транс. Честотата на този полиморфизъм е около 0.5% и е по висока в Франция (Бретания). Сложен хетерозигот за C282Y и H63D мутациите се среща в 5.3% от случаите с наследствена хемохроматоза, при установена контролна честота в популацията 1.3%. Въпреки че сложни хетерозиготи H63D/C282Y се свързват с изявата на хемохроматоза, при пациенти със синдром на желязно претоварване, като причина за появата му трябва да се имат предвид и допълнителните кофактори.

Изследвания на von Ahsen и съавт.(189) и Ivanova и съавт. (88) при български пациенти с порфирия кутанеа тарда и здрави лица не установяват по-често полиморфизмите C282Y, H63D и S65C на HFE гена в сравнение с контролна популация от 100 пациента. При 24% от тях се установява хетерозиготно носителство на H63D мутацията, а 2% са хомозиготи. S65C полиморфизмът не се установява при контролната група.

Пациентите с ювенилна хемохроматоза (тип 2) са носители на мутация в HFE2 гена, която кодира мембранно свързания протеин хемоювелин (136). Той принадлежи към семейството на т. нар. repulsive guidance molecules (RGMs). Те биват основно 3 класа като клас С при мишките, който е ортолог на човешкия хемоювелин, се намира в същите тъкани (скелетна и сърдечна мускулатура и черен дроб)(138). Подобно на RGMs, генът на хемоювелина кодира пептид с характерните домейни: N- край сигнален пептид; RGD-интегрин-свързващ мотив; домейн тип Д с частичен von Willebrand

фактор; C- край с гликозилфосфатидилинозитол (GPI) котва. Всички RGM притежават Глицин – Аспартат – Пролин – Хистидин (GDPH) последователност (121, 162), която лежи в домейна тип Д с частичен фактор на von Willebrand. Тази последователност подлежи на автокаталитично разцепване на връзката аспартат-пролин при кисело рН. По принцип след разцепването една част от пептида (около 33 kDa) се закрепва като хетеродимер за клетъчната мембрана, където действа като корецептор на bone morphogenic protein (BMP) рецептора и задейства експресията на хепсидин в отговор на излишък от желязо в клетката посредством SMAD каскадата (25). Ювенилната хемохроматоза може да се развие и вследствие на мутации в самия HAMP ген, кодиращ хепсидина (153). И двете подформи на хемохроматоза са много редки. При тях е налице ранна клинична изява около 20-тата декада. Характеризира се с тежка хепатоцелуларна сидероза, водеща често до цироза, ендокринни нарушения (предимни хипогонадотропен хипогонадизъм) и кардиомиопатия. Натрупванията на желязо в таргетните органи са значително по-големи отколкото при класическата хемохроматоза. Изразено по-тежка е и клиничната картина. Смъртността от декомпенсирана СН в резултат на кардиомиопатията преди 30 годишната възраст е често явление (145).

Хемохроматоза тип 3 се дължи на мутации в гена за TfR2. Последният участва в залавянето от хепатоцитите на пренасяното от трансферина желязо. През 2000г. Camashella и съавт. (36) описаха нонсенс мутация Y250X в екзон 6 в този ген при две несвързани сицилиански семейства с хемохроматоза. Скоро след това Girelli и съавт. (70) описаха при друго италианско семейство малка делеция в екзон 16. така към момента са известно над 70 патогенни мутации и други модифициращи полиморфизми в този ген. Клинично тип 3 хемохроматоза, наподобява класическата HFE-хемохроматоза, като време на изява на болестта, тежест на натрупване на желязо в таргетните органи и лечение.

Мутации в гена за феропортин

Над 100 мутации са известни в SLC40A1 гена (84). Те са характерни за хемохроматоза тип 4 и предизвикват загуба на функция и прекомерно повишена функция на феропортина и обуславят два различни фенотипа. Мутациите водещи до повишена функция на феропортина (хемохроматоза тип 4в) обуславят повишената резорбция на желязото от дуоденалните ентероцити, повишената мобилизация от

макрофагите , което води до интрапаренхимно натрупване на желязо в черния дроб и клинична изява, наподобяваща тази при хемохроматоза типове 1-3 (145). Молекулярната обосновка на този тип мутации се изразява в нарушено свързване между хепсидина и феропортина, инхибиране на интернализирането в клетката, или и двете (47). За разлика от тях мутациите в SLC40A1 гена, водещи до загуба на функция (като Glu248His и Ala77Asp) обуславят задържането на желязо в макрофагите и Купферовите клетки, развитието на лека анемия и общо взето клинична картина, която доста е различава от тази при хемохроматоза типове 1 до 3. Поради това бе въведено понятието феропортинова болест (или хемохроматоза тип 4a). Органното увреждане е сравнително леко, настъпва по-бавно и се изявява в 4-5 десетилетие. Установяват се значително повишени стойности на серумния феритин, докато серумното желязо и трансфериновото насищане са леко понижени или нормални. Те може да се повишат едва в по-напреднал стадий на заболяването (122, 128).

В Клиниката по гастроентерология се лекуват и проследяват общо 5 пациента с хемохроматоза, при които молекулярно-генетичните механизми на заболяването още не са проучени.

Информация за гените, отговорни за хемохроматозата

HFE генът е разположен върху хромозомна област 6p21.3, съдържа 6 екзона и обхваща 11 kb. HFE2 генът е разположен върху хромозомна област 1q21, съдържа 4 екзона и обхваща 4.5 kb от ДНК. HAMP генът е локализиран върху 19q13.1 хромозомна област, съдържа 4 екзона и обхваща 4.4 kb. Генът за TfR2 е локализиран върху 7q22 хромозомна област, съдържа 19 екзона и обхваща 22,4 kb от ДНК. SLC40A1 генът е локализиран върху 2q32 хромозомна област, съдържа 9 екзона и обхваща 23,2 kb.

Синдром на претоварване с желязо при хронични чернодробни заболявания

Синдромът на претоварване с желязо може да се оцени непряко чрез серумни маркери. Серумният феритин е добър сурогатен маркер, но се отличава с ниска специфичност. Повишава се при възпалителен процес. Трансфериновото насищане (ТН = $\text{Fe}/\text{TЖСК} \cdot 100$) е много подходящ маркер за оценка на функциониращия железен пул, т.е. отношението абсорбция/мобилизация. ТН над 45% говори в полза на синдром на претоварване с желязо.

По данни на Петкова и съавт. 2012 (8,9) при значима част от българските пациенти - около 50% от пациентите НАСБ и АСБ се открива синдром на претоварване с желязо, оценен чрез хиперферитинемия и повишаване на ТН в сравнение с контроли. Най-изразени са промените в случаите на стеатозен хепатит. При около 30% от пациентите с хроничен хепатит С (ХХС) също се установяват повишени маркери на желязна обмяна. При ХХС и съпътстваща стеатоза честотата нараства до 50%, а при липса на стеатоза тя е около 20%. Отклоненията на серумните показатели на метаболизма на желязото са по-изразени при по-голяма консумация на алкохол, затлъстяване, по-тежка степен на чернодробно увреждане., като показват връзка с чернодробните ензими, показателите, отразяващи чернодробната функция и метаболитните параметри. За разлика от промените в серумните маркери, позитивна реакция за отлагане на желязо в черния дроб се установи при около 50% от пациентите с НАСБ, при 17% с алкохолна стеатозна болест, предимно за сметка на стеатохепатита и в около 8% от случаите с ХХС. Има връзка между отлагането на желязо в чернодробната тъкан и отклоненията в серумните маркери. По-чести и по-изразени са промените при позитивна реакция за желязо в черния дроб. Отклоненията в серумните показатели на метаболизма на желязото корелират с хистологичните промени в черния дроб – стеатоза и фиброза, независимо от етиологията.

Желязо и хронични вирусни хепатити

При значителна част от лицата с хронична HCV инфекция се наблюдават повишени серумни нива на желязо, феритин и трансфериново насищане (данните варират от 10 до 40%) (42). За разлика от HCV, връзка между хроничния хепатит В и синдромът на желязно претоварване се открива много по-рядко. Липсва единно становище относно действителното наличие на хепатосидероза, тъй като въпреки повишената сидеремия и феритинемия, някои автори не откриват сидерозни отлагания (42). При значителна част от болните обаче се откриват горногранични или леко до умерено повишени количества на желязото в черния дроб. При тях хистологично се откриват по изразени възпалителни промени и по-напреднала фиброза в сравнение с тези без повишено отлагане на желязо в чернодробния паренхим (18). По тази причина повишено отлагане на желязо в черния дроб се обсъжда като кофактор за прогресията на чернодробното увреждане и увеличаване риска от развитие на цироза и първичен рак

на черния дроб. Предполага се също, че то затруднява успешния изход от специфичното противовирусно лечение.

При проучвания върху мишки, HCV намалява транскрипцията на хепсидин по пътя на оксидативния стрес. Един от предполагаемите агенти, които го предизвикват са самите вирусни белтъци. В допълнение, при хора с ХХ С са установени намалени серумна нива на хепсидина, които се възстановяват при успешна ерадикация на HCV инфекцията чрез лечение с пегилиран интерферон и рибавирин. Успоредно с това се нормализират и параметрите на желязната обмяна (64).

Като се има предвид, че при около една трета от пациентите с хронична HCV инфекция се наблюдава синдром на желязно претоварване, най-вероятно участват и други допълнителни фактори с ефект върху транскрипцията на хепсидина, като например генетичните фактори повлияващи желязния метаболизъм. Няколко проучвания оценяват ролята на мутациите в HFE гена, но с разнопосични резултати. Проучванията на Smith и съавт. (167), Tung и съавт (180), Erhardt и съавт (53) и Valenti и съавт. (181) откриват връзка между наличието на С282У мутацията и хепатосидерозата от една страна, както и с по-напредналата фиброза от друга, докато други отричат такава.

Интерпретацията на повишените параметри на желязна обмяна се усложнява и от наличието на стеатоза, съпътстваща HCV инфекцията, която сама по себе си повишава серумните нива на феритина. Установено е че синусоидалното (непаренхимно) натрупване на желязо корелира предимно с параметрите на метаболитния синдром, докато присъствието на мутации в HFE и бета-глобиновия гени се асоциират с повишени параметри на желязна обмяна, хепатоцелуларно натрупване на желязо и по тежка фиброза (181).

Желязо и НАСБ

НАСБ, засяга 34% от населението на САЩ и се смята за чернодорбната изява на метаболитния синдром. Характеризира се с чернодорбна инсулинова резистентност, дислипидемия и ранна съдова увреда и се свързва с повишена смъртност от сърдечно съдови и чернодробни заболявания, включително първичен чернодробен рак. Метаболитните отклонения и прогресията на чернодорбното увреждане са по изразени при НАСХ, за който се смята, че се провокира при оксидативен стрес и освобождаване на цитокини при вече налична чернодорбна стеатоза (105).

При над 30% от пациентите с НАСБ се наблюдава хиперферитинемия и при част от пациентите е описан синдром на леко до умерено дисметаболично натрупване на желязо и инсулинова резистентност. Нивата на серумния феритин корелират с инсулиновата резистентност и параметрите на метаболитния синдром (94). Също така, е възможно чернодробното претоварване с желязо да индуцира инсулиновата резистентност чрез повишаване на оксидативния стрес в черния дроб и метаболитно-активните тъкани (58). Установена е благоприятна роля на лечението с извеждане на желязо от организма върху инсулиновата чувствителност при пациенти с хиперферитинемия, захарен диабет и при тези с НАСБ и нарушен въглехидратен толеранс (55), дори и при пациенти без повишено отлагане на желязо. Дали хиперферитинемията отразява претоварването с желязо, дали то от своя страна води до по напреднала чернодробна увреда и дали лечението с извеждане на желязо от организма би имало успех е все още противоречиво. Възможните механизми обуславящи повишената склонност към чернодробно натрупване на желязо, вероятно подобно на тези при HCV инфекцията включват нарушения в транскрипцията на хепсидин. Няколко проучвания изследват дали мутациите на HFE гена са отговорни за повишените параметри на желязната обмяна, но са получени разнопосочни резултати. Nelson и съавт. (125) установява връзка между наличието на C282Y мутацията и степента на фиброза. Valenti и съавт. (183) установява 1.7 пъти повишен риск между паренхимното натрупване на желязо и развитието на умерена/напреднала на фиброза в сравнение с пациентите без хепатосидероза при италиански пациенти. Установява обаче C282Y мутацията на HFE гена при около една трета от пациентите с интрапаренхимно натрупване на желязо, т.е. HFE мутациите не могат директно да се свържат с развитието на чернодробна фиброза. Установява също така значително по-често (в 65%) в сравнение с контролната група наличието на известни генетични фактори, отговорни за промени в желязната обмяна – C282Y+/-, H63D +/+, наличието на мутации в гена за бета-глобина. Последната алтерация особено се свързва с паренхимно натрупване на желязо и по-тежка чернодробно увреждане при италиански пациенти (вероятно така е в целия Средиземноморски регион) (184).

Болест на Уилсън

Болестта на Уилсън е рядко автозомно рецесивно заболяване на медната обмяна, което се характеризира с чернодробно и неврологично засягане. Заболяването засяга между 1:30000 до 1:100000 лица (204). Симптомите се изясняват между 20 и 30

десетилетие при засегнатите пациенти поради натрупване на мед в черния дроб и мозъка вследствие на намалена екскреция на мед чрез жлъчката.

Чернодробна патология

В ранните фази на заболяването, дифузното натрупване на мед в цитоплазмата може да бъде доказано само чрез специфични имунохистохимични изследвания. Хистологично то се изразява с микро- и макростетоза и гликогенирани ядра. Тези находки са характерни и за други заболявания като НАСБ (20). Ултраструктурните аномалии включват разширяване и разделяне на вътрешната и външна мембрани на митохондриите, разширяване на пространствата между кристите им или появата на големи вакуоли. При липсата на холестаза тези находки се считат за патогномични за болестта на Уилсън. Началният стадий на заболяването може да прогресира до междинен, който се характеризира с перипортално възпаление, мононуклеарни клетъчни инфилтрати, лобуларна некроза и бриджинг фиброза. Такива находки са неразличими от тези при автоимунен хепатит (160, 170). Следващата по тежест находка е микронодуларна или смесен тип ЧЦ. При пациентите с фулминантна чернодробна недостатъчност могат да преобладават паренхимната апоптоза и некроза, много често на фона на ЧЦ (171). Рядко са съобщавани случаи на болест на Уилсън в напреднала възраст и неврологични оплаквания без да е налице ЧЦ.

Молекулярна патогенеза

Генът оговорен за болестта на Уилсън АТР7b кодира синтеза на специфична Р-тип мед-завсисима аденозин трифосфатаза. АТР7b трансмембрания преносител има двойни синтетична и екскреторна роли, като регулира транспорта на медния йон в апарата на Голджи, включването му в плазмения церулоплазмин и отделянето му чрез жлъчния сок при повишени медни депа (34, 172, 209). Дефектният АТР7b протеин обуславя натрупване на мед в таргетните тъкани и развитието на неврологични и чернодробни увреждания, характерни за болестта на Уилсън.

Мутациите в АТР7b гена могат да нарушат нормалната клетъчна обработка на протеина. Най-честата мутация при пациентите от европейски произход е замяна на хистидин с глутамин на 1069 позиция (H1069Q). При пациентите с болест на Уилсън хомозиготи по H1069Q АТР7b протеинът е локализиран в ендоплазмения ретикулум,

което нарушава нормалната обработка на протеина и насочването му към обичайната му локализация, а именно апаратът на Голджи (87). H1069Q мутацията не обуславя конформационни промени в протеина, а нарушава нормалното каталитично фосфорилиране на АТР7b от аденозин трифосфат. Хистидинът на позиция 1069 е разположен в консервативния аденозин трифосфат-свързващ домейн. Следователно хистидинът 1069 е необходим за правилната ориентация на аденозин трифосфата към свързващия домейн на АТР7b преди хидролизата (178).

Клинично значение на генетичните находки при болестта на Уилсън

Общо над 300 различни мутации, разположени върху целия АТР7b ген, са описани при пациентите с болест на Уилсън (84). В следствие на това разпределението на генотиповете на АТР7b гена е сложно, тъй като повечето пациенти са сложни хетерозиготи. По принцип няколко мутации преобладават в зависимост от изследваната популация. Следователно при провеждането на молекулярно-генетичното изследване първоначално се подбират екзоните от гена, носещи честите мутации при конкретната общност с цел скрининг. Vrbelova и съавт. (190) установяват, че скринингът за 5-те най-чести мутации при чешките и словашки пациенти с болест на Уилсън, потвърждава диагнозата в до 70% от случаите. Най-честата мутация при пациентите от централна и източна Европа е H1069Q мутацията, която засяга около 44% от болните. При кавказците тя се среща при 37%-63% от пациентите. Данните относно честотата и характеристиките на мутациите при пациентите с болест на Уилсън в България са дело на няколко изследователи (119, 177) Те установяват високата честота в нашата популация на H1069Q мутацията – носители са около 70%. Авторите описват и някои етнически особености в разпределението на мутациите, а именно изключително високата честота на H1069Q мутацията и характерния хаплотип сред болните с ромски произход. Други мутации преобладават при пациентите с не-европейски произход и при изолирани етнически групи. При китайските пациенти H1069Q почти липсва, но R778L се среща при 34%-38% от болните (207, 77). Нито H1069Q, нито R778L се срещат при болните от Индия (96). При пациенти от Саудитска Арабия е доказан „founder” ефект на основателя за малката делеция 4193delC при много членове на едно племе (19). Чести мутации също така са установявани при изолирани групи пациенти – в Исландия и Гран Канария.

Генотипно-фенотипни корелации при болест на Уилсън

Генотипно-фенотипните корелации са затруднени, поради рядкостта на определени мутации, характерни само за семейството, както и наличието на много сложни хетерозиготи по различни мутации. H1069Q хомизиготи са установявани често при кавказци с болестта на Уилсън и са пример за проучване на възможните генотипно-фенотипни корелации. Въпреки че не е еднозначно доказано, доста проучвания и един мета-анализ при 577 пациенти демонстрират, че пациентите хомизиготи по H1069Q са с по-късна изява на болестта и за тях е по-характерно неврологичното засягане (190, 168, 137). Българските пациенти с болест на Уилсън хомизиготи по H1069Q не са с по-късна изява на болестта, но Mihaylova и съавт. (119) установяват връзка между хомозиготността по тази мутация и чернодробната изява на заболяването. Някои доклади също така показват, че носителите на 2 нонсенс мутации са със значимо по-ранна изява на болестта и значимо по-ниски стойности на серумния церулоплазмин в сравнение с носителите на 2 миссенс мутации (137, 76). При проучване при италиански деца не се потвърждава връзката между носителството на нонсенс мутации и ранната възраст на изявата на болестта, но се потвърждава значимо по-ниските стойности на серумния церулоплазмин при носителите на 2 нонсенс мутации (130). Скорошно проучване при германски пациенти с болест на Уилсън потвърждава връзката между носителството на нонсенс мутации в двата алела и ранната изява на болестта и ниския серумен церулоплазмин (118). Българските пациенти с болест на Уилсън носители на 2 нонсенс мутации са с значимо по-ранна изява на болестта, но връзка със стойностите на серумния церулоплазмин и базалната медна екскреция не са потвърдени (119).

Болестта на Уилсън се унаследява по автозомно-рецесивен начин, което означава че е налице 25% шанс потомството на пробанда да унаследи заболяването. Изясненото хомо- или сложно хетерозиготно носителство на мутации в АТР7б гена, улеснява фамилното изследване. Наличието на същия генотип при безсимптомни членове на семейството потвърждава диагнозата и подпомага започването на терапия преди развитие на усложнения. Хетерозиготното носителство на мутации или липсата им при членове на семейството, при които биохимичните и клинични находки са съмнителни, от друга страна предотвратява ненужното лечение (35).

ДНК анализът на мутации в АТР7б гена допринася за поставянето на диагнозата, особено при случаите с нетипична клинична изява. Това се потвърждава от описан случай на 3 годишно дете с ранна изява на чернодробна форма на болестта (205).

Мутационният анализ също така потвърждава диагнозата при късна изява на заболяването в 7 десетилетие (17, 141, 161).

Молекулярно-генетичното изследване значително улеснява клиничната практика при пациентите с болест на Уилсън, но цялостното изследване е все още трудно и доста скъпо, поради множеството открити мутации, наличието на регулаторни такива в некодиращи участъци и големината на гена (около 80 kb). Въвеждането на следващо поколение секвениране би улеснило изследването на целия ген, не само на транслируемите екзони, но и на важни некодиращи участъци, които понастоящем не се изследват рутинно.

Спектър на изява на болестта

Клиничните находки при болестта на Уилсън са разнообразни. В общи линии, дебютът на заболяването може да е остър с чернодробна недостатъчност, хемолиза или и двете и хроничен - с чернодробно засягане, неврологични оплаквания или и двете. Пациентите, при които болестта се е извила първо с неврологични или психиатрични симптоми са с по-късна възраст в сравнение с тези само с чернодробно ангажиране. Счита се, че повечето пациенти с неврологична симптоматика са и с чернодробно увреждане при изявата на заболяването, дори и да нямат симптоми (7).

Чернодробно увреждане при болестта на Уилсън

По литературни данни чернодробно увреждано като дебютна изява се наблюдава в около 45% от случаите (59, 71). То включва безсимптомна хепатомегалия, изолирана спленомегалия, повишени трансаминази, стеатоза на черния дроб, остър хепатит, фулминантна чернодробна недостатъчност. При болестта на Уилсън могат да се наблюдават повишени автоантитела, които да наподобавят клиничната и лабораторна находки при автоимунен хепатит. Пациенти с неалкохолен стеатохепатит, както и такива с автоимунен хепатит, които не се влияят от конвенционалната кортикостероидна терапия, трябва да се изследват за болест на Уилсън. Около 5% от пациентите са с остра изява на болестта (134), най-често с дебют през второто десетилетие, когато пръстенът на Кайзер-Флайшер не е оформен. Почти всички пациенти са с формирана ЧЦ, при някои обаче е налице некроза с бриджинг фиброза, която ще прогресира до цироза в хода на болестта. Нивата на серумната алкална

фосфатаза често са понижени при острата форма с оглед на това отношението на алкалната фосфатаза (IU/L) към общия билирубин (mg/dL) под 2 е прието като диагностично за остър Уилсън (175, 158). ЧЦ при болестта на Уилсън протича най-често тихо. Клиничните поряви включват съдови звезди, спленомегалия и портална хипертония с асцит. При някои пациенти е в компенсирани стадий. Всички млади пациенти с неясен хепатит би трябвало да се изследват и за болест на Уилсън. Първичният чернодробен рак рядко е свързан с болестта на Уилсън, но може да се появи при налична ЧЦ и хронично възпаление (195, 203). Съобщени са малко над 10 случая с хепатоцелуларен карцином като се счита, че дългогодишно лекуваните пациенти от мъжки пол са с по-висок риск за развитие на чернодробен рак.

Поставяне на диагнозата и лабораторни находки при болестта на Уилсън

Диагностицирането на болестта на Уилсън не е трудно, ако са налице типичните чернодробни и неврологични симптоми, пръстена на Кайзер-Флайшер, нисък серумен церулоплазмин, повишена базална и стимулирана куприурия, повишено съдържание на мед в чернодробна тъкан, идентифициране на мутация, отговорна за болестта. Трябва да се отбелжи, че поставянето на диагнозата се базира на констелацията от клинични характеристики и лабораторните тестове и че няма единичен тест, който може да потвърди диагнозата. За да улесни диагностицирането Ferenci и съавт. (59) предлагат точкова система основана на клинични, биохимични и генетични находки, която обаче не е оценена проспективно.

Като рутинни лабораторни диагностични методи се използват: серумен церулоплазмин, серумна мед (тотална и свободна т.е. несвързана със серумния церулоплазмин), базална екскреция на мед с урината и провокационен тест с D-пенициламин.

Въпреки че болестта на Уилсън се дължи на натрупване на мед в таргетните органи общата серумна мед обикновено е понижена в степен съответстваща на понижения серумен церулоплазмин. При пациенти с болест на Уилсън и тежка чернодробна увреда, серумната мед може да бъде в референтни стойности, въпреки понижения серумен церулоплазмин. При случаите с фулминантна чернодробна недостатъчност дължаща се на болест на Уилсън серумната мед може да бъде нормална или повишена поради внезапно освобождаване на метала от тъканта. Следователно нормалните и/или повишени стойности на серумната мед не изключват болестта,

особено при острата форма (158). Повишена серумна мед се наблюдава при остра чернодробна недостатъчност без значение от етиологията (106, 179). Серумната мед често е увеличена и при хронични холестатични чернодробни болести (първична билиарна цироза и първичен склерозиращ холангит) (75). Установява се повишена серумна мед и при пациенти с чернодробна цироза и първичен рак на черния дроб, независимо от етиологията (100). Някои автори съобщават за значимо повишени стойности на серумната мед при пациенти с хроничните вирусни хепатити (91, 116).

В практиката стойностите на серумна мед се интерпретират заедно със стойностите на базалната медна екскреция в 24-часова урина. Количеството мед отделено в 24-часова урина служи за поставяне на диагнозата и за мониториране на ефекта от лечението с пенициламин. То отразява количеството мед, несвързано с церулоплазмин в циркулацията. За болестта на Уилсън е характерна базална куприурия над $1.6 \mu\text{mol}/24\text{h}$. при наличие и на клинични симптоми на заболяването (179, 117). Някои изследвания показват, че медната екскреция за 24ч може и да е по малко $1.6 \mu\text{mol}/24\text{h}$. при изявата на болестта при 16 до 23% от пациентите (169, 68, 159). Референтните стойности за 24-часова куприурия варират между отделните лаборатории. За някои горна граница на нормата е $0.6 \mu\text{mol}/24\text{h}$. При стойности в сивата зона т.е. от $0.6 \mu\text{mol}/24\text{h}$ до $1.6 \mu\text{mol}/24\text{h}$ са необходими допълнителни инвазивни изследвания за поставяне на диагнозата.

Провокационният тест с D-пенициламин е полезен допълнителен тест за диагностика за заболяването. Този тест е стандартизиран само при деца (160), като 500 мг пенициламин се прилага орално в началото на теста и след 12 часа като се събира 24-часова урина. При сравняване на резултатите от изследването с други чернодробни болести като автоимунен хепатит, първичен склерозиращ холангит, остра чернодробна недостатъчност се установява, че резултати над $25 \mu\text{mol}/24\text{h}$ са показателни за диагнозата болест на Уилсън. Проучване с цел оценка на диагностичната стойност на провокационния тест с D-пенициламин при пациенти с активно чернодробно увреждане установява чувствителност на метода около 76% и специфичност 93%. Чувствителността на метода е значително по-добра при симптоматични пациенти около 92%, но при безсимптомни братя и сестри около 46% 19. Други автори установяват 100% чувствителност при резултати от теста над $25 \mu\text{mol}/24\text{h}$ (45, 152) . Този тест се използва и при възрастни пациенти, но в повечето проучвания се използват различни дози и време на прилагане на D-пенициламин, което затруднява сравняването на

резултатите (169, 179, 63). Освен за поставяне на диагнозата 24ч куприурия служи и за проследяване на ефекта от провежданото лечение с D-пенициламин. При започване на лечението тя обикновени е по-висока до 16 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ При поддържащо (продължително) лечение медна екскреция в урината варира от 3 до 8 $\mu\text{mol}/24\text{h}$.

Лечение с D-пенициалмин при пациенти с болест на Уилсън

Лекарственото лечение на болестта на Уилсън се основава на хелаторни препарати (D-пенициалмин, триентин и тетратиомолибдат), които усилват отделянето на мед от тъканите, цинкови препарати, които намаляват резорбцията на медта или и двете. Чернодробната трансплантация успешно лекува болните, които не се повлияват от медикаменти.

Преди въвеждането на терапията с хелаторни агенти, пациентите с болестта на Уилсън са умирали в ранна възраст от усложнения на болестта. Ефектът на лечението с пенициалмин е потвърден от доста проучвания още през 80-те години на 20 век (7). При пациенти с клинична изява на чернодробно заболяване, възстановяването на синтетичната му функция и подобрене на клиничните признаци настъпва между 2 и 6 месеца след началото на лечението. В някои случаи за по-добро възстановяване е необходима до 1 година. Няма рандомизирани проучвания оценяващи ефективността на различните медикаменти при пациенти с чернодробната форма на болестта. Лечението с пенициалмин е свързано с появата на доста нежелани лекарствени реакции, които възпрепятстват ефективното лечение в до 10-20% от случаите според някои автори. Ранните странични реакции включват прояви на свръхчувствителност – фебрилитет, обриви, лимфаденопатия, неутропения, тромбоцитопения и протеинурия. При появата им лечението би следвало да се спре и замени с друг медикамент. Късните нежелани реакции включват нефротоксичност (лупус-подобен синдром), потискане на костния мозък (тромбоцитопения и аплазия).

В клиниката по гастроентерология към УМБАЛ “Св. Иван Рилски” са диагностицирани, лекувани и проследявани общо над 80 пациента с болест на Уилсън. Молекулярно-генетично изследване е проведено при 69 пациенти, като честите мутации, характерни за българската популация са установени. Липсват обаче данни относно връзката генотип-фенотип при пациентите с чернодробна изява на заболяването.

5. Обобщение

От звеното за диагностика, лечение и дълготрайно наблюдение на порфириите в България през последните 50 години активно се проследяват над 35 семейства с остра интермитентна порфирия, 20 – с порфирия вариегата и 3 - с вродена копропорфирия. при семействата с остра интермитентна порфирия се прилага биохимичният подход за откриване на латентно носителство. Налице е нужда от въвеждане на молекулярно-генетичното изследване при пробандите с остри порфирии и множеството им роднини в България.

Броят на болните от порфирия кутанеа тарда, лекувани към звеното по порфирии през годините (около 215 лица), надхвърля този на останалите порфирици, взети заедно. Оптималният подход за откриване на латентно носителство при фамилните случаи с порфирия кутанеа тарда изисква изследване за носителство на мутациите в UROD гена.

Подобно на доказването на всички останали порфирии, оптималният подход за диагностика на пробандите и латентни носители при семействата с еритропоетична протопорфирия изисква молекулярно-генетично изследване на FECH гена.

В Клиниката по гастроентерология се лекуват и проследяват общо 5 пациента с хемохроматоза, при които молекулярно-генетичните механизми на заболяването още не са проучени.

По данни на Петкова и съавт. (8,9) при значима част от българските пациенти - около 50% от пациентите НАСБ и алкохолна стеатозна болест се открива синдром на претоварване с желязо, оценен чрез хиперферитинемия и повишаване на ТН, но липсват данни относно наличието на молекулярно-генетични фактори доспинасящи за свръхнасищането с желязо.

В клиниката по гастроентерология към УМБАЛ “Св. Иван Рилски” са диагностицирани, лекувани и проследявани общо над 80 пациента с болест на Уилсън. Молекулярно-генетично изследване е проведено при 69 пациенти, като честите мутации, характерни за българската популация са утновени. Липсват обаче данни относно връзката генотип-фенотип при пациентите с чернодробна изява на заболяването.

IV. 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 ± 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 кожни порфирии: 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 еритропоеична 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. 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 . Етиология на чернодробното заболяване

Брой пациенти	Етиология					
	НСV	НВV	НСV+НВV	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 БУ, 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 изборразителни изследвния 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, порфирини 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.

Използване 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 капиларен 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).

Праймерите за PCR амплификацията на екзони 1 до 15 на PBGD гена, както и граничните участъци екзон-интрон бяха конструирани с помощта на референтен транскрипт [ENST00000442944](#)

Таблица 1. Секвенции на правия и обратен праймери за фрагментите на PBGD гена

Екзон	Секвенция 5'-3'	Tm °C	GC %	Дължина на ампликона (bp)
Екзон 1	CAAAGGAAGCGCCATAGAAG	60	50	412
	AGACGACTGAGGATGGCAAC	62	55	
Екзон 2	TTTCCATTACGAGCCTGCTT	58	45	423
	TGCACAGCATATCCAAGTCA	58	45	
Екзон 3-4	AGGGACCAGCCTTGGAGTAT	62	55	696
	GGCAAAGCCAGAAATGTTGT	58	45	
Екзон 5-6	TCTGGTCTTCCTGCTCGATT	60	50	443
	AAGCCCAGCAGCCTATCTG	60	58	
Екзон 7	CCT AGG CTC CAC CAC TGA AG	64	60	291
	TCC TCA GGG CAG AGG AGA TA	60	55	
Екзон 8-9	GAG TGT TGA CTG GTG GCA GA	60	55	552
	TGC ATG GAA AGA CAG ACA GG	60	50	
Екзон 10	AAG CTG AGA GCT GGA AGA TGA	62	47.6	459
	CAT CTG ACA CCA AGC CTG TTT	62	47.6	
Екзон 11-12	GGC CAG ACT CAC ACT TAG GC	64	60	589
	AAA TCT TCC CTG CCA CCT TT	58	45	
Екзон 13-15	CCC ACA GTT GCC TTT TCA GT	60	50	717
	GGG GTA ATC ACT CCC CAG AT	62	55	

Праймерите за PCR амплификацията на екзони 1 до 13 на PPOX гена, както и на граничните участъци екзон-интрон бяха конструирани с помощта на референтния транскрипт ENST00000367999.

Таблица 2. Секвенции на правия и обратен праймери за фрагментите на PPOX гена

Екзони	Секвенция 5'-3'	Tm °C	GC %	Дължина на ампликона (bp)
Екзон 1 -2	CGCCAATCCAGATGTAGGAG	60.6	55	593
	AGTCCCTCTGGCACAAGT	60	58	
Екзон 3-4	GCTCTCCCATTTCCATCAA	60	45	561
	CATATGAGGATGAGGGCACA	59	50	
Екзон 5-6	GAGCTGGGGAGGTATGTCAG	60	60	694
	CACTCCCTCACTTTGGCAGTA	60	52	
Екзон 7	GCCAGGCTGGTCTCAAACCT	60	58	454
	CTGGGGTAGCCCATGTCTAA	60	55	
Екзон 8-9	GCCTGGGAAACTGAGAGTGA	60	55	544
	CCTTGTTATCTGCCACCTC	59.5	55	
Екзон 10-11	GAAGGAGAGACAGCCTCAGC	59.3	60	472
	GTCTTCAAGGCCTTCAGTGG	59.8	55	
Екзон 12-13	CTCCCTCAGCTCTCCACTG	60	60	499
	CACACTTTGCCTCTTTGCTG	59	50	

Праимерите за PCR амплификация на екзони 1 до 7 на CPOX гена и съответните гранични участъци интрон - екзон бяха конструирани с помощта на референтния транскрипт [ENST00000264193](#)

Таблица 3. Секвенции на правия и обратен праимери за фрагментите на CPOX гена

Екзони	Секвенция 5'-3'	Tm °C	GC %	Дължина на ампликона (bp)
Екзон 1	GAAAGGTTCTTTCCGCCTGT	60.6	50	843
	GTGACCCTTTCGTGTCCATC	60.4	55	
Екзон 2	TGGCAGGAGAATGTTGAAGA	59.4	45	499
	GGCATATGAACCCGAATGG	61.1	52.4	
Екзон 3	GCCGCACGTTGACAAATAC	60.1	52.6	398
	GCCTTTACATTGCCTCCTGA	60.2	50	
Екзон 4	TTCTGCCTAGGCCTTACTGG	59.5	55	590
	AAGCCTCTCATTCTCAAGCA	57.8	45	
Екзон 5	GGACAGCAAGTAAGGACACCA	60.2	52.4	641
	TTGACATAAGGCTGGAGGGTA	59.6	47.6	
Екзон 6	GCTGTAGGCTGGTGCCTCT	59.5	60	346
	AGACCTAGGCACAACATCTGC	59.4	52.4	
Екзон 7	GGCACATCAGGCACAGTAGA	59.9	55	355
	AGGGTGCAGAGTGGAGAAGA	60	55	

Праимерите за амплификация на екзони от 1 до 10 и граничните участъци екзон-интрон на UROD гена бяха конструирани с помощта на референтния транскрипт [ENST00000246337](#).

Таблица 4. Секвенции на правия и обратен праимери за фрагментите на UROD гена

Екзони	Секвенция 5'-3'	Tm °C	GC %	Дължина на ампликона (bp)
Екзон 1	GACGCTCTTGGTTCCTACA	60.3	55	215
	GTGGGGAAAGGGGAGTAGAG	59.9	60	
Екзон 2-3-4	TGGCCTGGAGGAGGTAGATA	59.6	55	673
	TTCCCTCGATCCAGTTAGGA	59.6	50	
Екзон 5-6	TTCTCSTTTTCTCCTCCTG	59.8	47.6	690
	ACTGGAGGCCAAGGTTCTTT	60.1	50	
Екзон 7	GGGGAAAATTGAGGTGGATT	60	45	317
	TACTTCTGCTGCCCTCCAGT	60	55	
Екзон 8-9	ACTGGAGGGCAGCAGAAGTA	60	55	493
	TCCGGTCTTTCTAGGGCTTA	58.9	50	
Екзон 10	CCGGACTTTTTGTTGCTGTT	60.1	45	483
	GAACCTGAGGATATGGGCACA A	59.9	47.6	

Праимери за PCR амплификация на екзони от 1 до 11 на FECH гена, както и граничните участъци интрон-екзон бяха конструирани с помощта на референтния транскрипт [ENST00000262093](#)

Таблица 5. Секвенции на правия и обратен праимери за фрагментите на FECH гена

Екзони	Секвенция 5'-3'	Tm °C	GC %	Дължина на ампликона (bp)
Екзон 1	GAGCGGGCTTCTAGCTCA	59	61	570
	ACCGATGGGACTTGAACCT	59	53	
Екзон 2	TTCTGCCATGGGATCTCTTT	60	45	350
	TCSTTCCACACTGGCTTTTC	60	50	
Екзон 3	AGTTTGCTGGCTGAACCAAG	60	50	376
	CCCCCTGCAATTTTCTGATA	60	45	
Екзон 4 IVS3-48	GTGGAGCACAGCTGGGTATT	60	55	485
	CCACAAATTGAGTTGCCAGT	59	45	
Екзон 5	CTTTGTTCTGGGCATTGCAT	61	45	377
	TGGACTGACCTGAACTCTCG	59	55	
Екзон 6	GTGATCTTCATTTGCAGGGTAG	59	45	386
	AAGGCTCAGAAGGACATCCA	60	50	
Екзон 7	GCTCTGAGATTTTTGGGTAGG	58	45	298
	AGGACATAATGGAAGCTGGAC	58	48	
Екзон 8	ACAGAAAGGGAGGGCTTTGT	60	50	326
	ATGGAAGAGCCTGACCATGT	60	50	
Екзон 9	GGTGTAAGAGTGGCTCTTGC	59	52	408
	GAGGACACCGTACATGCAAA	60	50	
Екзон 10	GCAGTCTGCGAACAGTTGAA	60	50	374
	TGGGGCTATCTGAAGGAAAA	60	45	
Екзон 11	TCACCACTCGGATGAAAAGA	59	45	399
	CCACACAATTTGTACCCAAAGG	61	45	

Праимери за PCR амплификация на екзони от 1, 3 и 5, както и 2 и 4 на HFE гена, както и граничните участъци интрон-екзон бяха конструирани с помощта на референтния транскрипт [ENST00000357618](#)

Таблица 6. Секвенции за правия и обратен праимери за фрагментите на HFE гена

Екзони	Секвенция 5'-3'	Tm °C	GC %	Дължина на ампликона (bp)
Екзон 1	TТАCTGGGCATCTCCTGAGC	60.4	55	387
	TCTGCAGTTCAGTGGTAGGC	59	55	
Екзон 3	CCTCACSTTCTGAGGTTGT	59.1	55	587
	AATTTGGAGAGGCACACAGC	60.3	50	
Екзон 5	TGGATAACSTTGGCTGTACCC	61.1	52.4	491
	GCTGGTGTCCCCAAAGAATA	59.9	50	
Екзон 6	GGGTTATGATCACTGGGGTGT	60.9	52.4	446
	CAAGGAGTTCGTCAGGCAAT	60.3	50	

Праимер	Секвенция – 5' -3'	T _{ан}	Вр
HFE_2aF	<i>GTGGCAGAGAAAAGCACACAAG</i>	59-67.3°C	556
HFE_2aR	<i>GCTCCCACAAGACCTCAGAC</i>		
HFE_2bF	<i>TCACAACCACAGCAAGGGTA</i>	64.8-67.3°C	620
HFE_2bR	<i>AATTTGGAGAGGCACACAGC</i>		
HFE_3F	<i>GGGTATTTCTTCCTCCAACC</i>	64.8-67.3°C	676
HFE_3R	<i>GAGACTTCCCCCTTGTCCT</i>		

Праимери за PCR амплификация на екзони от 2 до 4 на HFE2 и HAMP гените с прилежащите гранични интрон-екзон участъци бяха конструирани с помощта на [ENST00000336751](#) и [ENST00000598398](#), транскриптите, съответно.

Таблица 7. Секвенции на правия и обратен праимери за фрагменти на HFE2 и HAMP гените

Екзони	Секвенция 5'-3'	T _m °C	GC %	Дължина на ампликона (bp)
HFE2 Екзон 2	CCTTTTCTTGATCTCCCCAGA	60.6	47.6	395
	GAGTGATCGGGACTCTCAGC	60	60	
HFE2 Екзон 3	CCCCTGATGAGATTTGGAAG	59.5	50	749
	AGGGAGCATTGCTGTTGAAT	59.7	45	
HFE2 Екзон 4	GGGCCATAGTAGTCCTGCAT	59	55	836
	CCTAGGCCCTGCTTCCTTTA	60.7	55	
HAMP Екзон 2	GCTTATCTCTCCCGCCTTTT	59.8	50	376
	GAGACGTCCTGAGCTCTGCT	59.9	60	
HAMP Екзон 3-4	AAAGAGGAGGAGGCGGATCT	61.6	55	594
	CGGCAGAGAGAAAGGACAAC	60	55	

Праимери за PCR амплификация на екзони от 1 до 19 на Tfr2 гена, както и граничните участъци екзон-интрон бяха конструирани с помощта на референтен транскрипт [ENST00000462107](#)

Таблица 8. Секвенции на правия и обратен паримери за фрагментите на Tfr2 гена

Екзони	Секвенция 5'-3'	Tm °C	GC %	Дължина на ампликона (bp)
Екзон 2	CTGCCTGCCAGGACTGATA	60	57.9	248
	GAAGAAGCGAGGTCAGGACA	60.5	55	
Екзон 3	CACCATGCTCATTTGACACC	60	60	483
	CGACGTAGCCCAGTAGGAAG	59.9	64	
Екзон 4	GATCTTCACTGGGGGTGAGA	60	55	500
	CAGTCCCCTGGAACCTCAG	60.7	63.2	
Екзон 5-6	GGGAGCGCTTTTTCCSTAAA	60.8	50	591
	CGTAGTGGGCGTACACCAG	60.2	63.2	
Екзон 7	TGGAGGACCCTGACGTCTAC	60.1	60	389
	GCCACATGGTTCTTTCCTGT	60	50	
Екзон 8-9	CTAGGAGCTGCTGAGGTTGG	60.1	60	677
	GCTCACTGCAGGCTTAAACA	59.2	50	
Екзон 10	CTGACTGCACTGCCCTACC	59.4	62	476
	ACCATCAGACCCAGTTCAGC	60.1	62	
Екзон 11	TGATGGGCTGAGAGACACAG	60	55	353
	AGGGCCACTCAGGTACAATG	60	55	
Екзон 12-13	GGCGAGAGAGTGAGATCCTG	60.1	60	478
	CTTGTCATCCCCTGGAAAAA	59.9	45	
Екзон 14-15	TGTACGTGAGCCTGGACAAC	59.8	55	491
	CAAAGGCCGTGAAGGAATAG	59.7	50	
Екзон 16-17	ACCACAGTGGGCAGACTCTC	60.3	60	654
	TGCCAGAGAGGACCTAGACC	59.4	60	
Екзон 18	ATTCCCTGGGGTCTAGGTCC	60	60	587
	CCGATCTATGAGCACTGCGT	60	55	
Екзон 19	GCGAGACTCCGTCTCAAAC	60	55	596
	ATATCTGTGCTGGGGTCTGG	60	55	

Праймери за PCR амплификация на екзони от 1 до 9 на SLC40A1 гена, както и граничните участъци екзон-интрон бяха конструирани с помощта на референтен транскрипт [ENST00000261024](#)

Таблица 9. Секвенции на правия и обратен паримери за фрагментите на SLC40A1 гена

Екзон	Секвенция 5'-3'	Tm °C	GC %	Ампликон (bp)
Екзон 1	TCTCCAGTTCCTTGCACTCC	60.4	55	248
	CAAAGCTATGGTTCACAGCAGA	60.4	45.5	
Екзон 2	GTACGTGGTTTGTCTGCAA	59.6	50	367
	TGGGGAAGATCTTCGATGT	59.5	45	
Екзон 3	CCATTGTGCTGGGATGAAC	59.9	52.6	480
	ATCTAAGCCCTCCTCCCTCA	60.2	55	
Екзон 4	GGTGTGATCCTCTGGGTTGT	59.8	55	489
	ACTTAATGAGTGCCTGTTGTGG	59.2	45.5	
Екзон 5	CATTATGCCATTGACTACTGG	59.4	45.5	555
	CCATTTGCCAAGTTTGTGTAGG	61.6	45.5	
Екзон 6	AGTGGGACTTGACCCAAACA	60.4	50	576
	CTTGCCTCGTCTACCAAAGC	60	55	
Екзон 7-1	TCTGGTGAGTTTTCTGCTG	59	50	678
	AGCTGTGCCAATCCTGAGAT	59.8	50	
Екзон 7-2	ACTGTCCTGGGCTTTGACTG	60.3	55	788
	CTCCAGCCTGGGTAACAGAG	59.9	60	
Екзон 8	TTCTTAAGGCAAGGCTATGG	57.2	45	555
	ACACCCAGCCATTTATTGGA	60.2	45	

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 порфирины в еритроцитите. 5. Еритропоеична 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 изследвани 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 Kolmogolov-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

ЧАСТ 1. Порфирии

1.1 Отключващи фактори и клинично протичане на болестта при пациентите с остри порфирии

При 3 от нашите пациентки с остра интермитентна порфирия пристъпите бяха свързани с менструалния цикъл. Появяваха се през последните му седмици. Инфекции и/или употреба на медикаменти играеха отключваща роля при 3 болни с остра интермитентна порфирия, при 4 – с порфирия вариегата случаи, както и при пациентката с вродена копропорфирия. При 9 болни с остра интермитентна порфирия се прояви с 1 или 2 остри атаки. На таблица 10 и 11 са показани отклоненията в порфириновата обмяна при изявата на трите остри порфирии. Някои болни (семејство I-Баща, семејството II-П2 и II-Братовчед 1, семејството IV-П4 и семејството V-П5) страдаха от хронични симптоми като умора, болки в кръста, парестезия в долните крайници и депресия. Преди поставяне на диагнозата при П2 бяха налице 2 неразпознати порфирични кризи, вследствие на които пациентката имаше остатъчни парези и хронични неврологични симптоми. Остри и кожни симптоми присъстваха при 4 от пациентите с порфирия вариегата. Само остри симптоми се наблюдаваха при 1 пациент и само кожни симптоми при - 4 пациенти. При всички пациенти порфирия вариегата се проявяви с един остър пристъп, освен при семејството III-Син. Той страдаше от хронични симптоми, подобни на тези, наблюдавани при остра интермитентна порфирия. При пациентката с вродена копропорфирия, болестта се изяви само с остри симптоми. Систематизирано описание на клиничните находки е дадено в таблици 12 и 13 за трите остри порфирии. Лечението на острите пристъпи се състои най-често в масивни вливания на 10% глюкоза, при 2 случая беше доавян циметидин, а при един ремисията се постигна след прилагане на хем-аргинат.

Таблица 10. Биохимична характеристика на пациентите с остра интермитентна порфирия

Сем	Пациент	Пол	Възраст	PBGD pkat/gHb	Урина	
					ПБГ μmol/24h	ДАЛК μmol/24h
I	П1	Ж	40	18.7	715	95
	Баща	М	65	20.1	129	122
II	П2	Ж	47	14.1	153	42.7
	Братовчед 1	Ж	45	10	189	-
	Братовчед 2	Ж	37	14.3	304	-
	Майка	Ж	69	14	-	-
III	П3	Ж	44	20.6	320	19.4
	Син	М	20	34.3	-	-
IV	П4	Ж	27	НД	955	100
	Майка	Ж	50	НД	350	78
	Сестра	Ж	28	НД	-	-
V	П5	Ж	59	18.7	341	214
VI	П6	Ж	43	25.1	421	45
	Дъщеря	Ж	21	НД	-	-
VII	П7	Ж	42	НД	384	130
	Дъщеря	Ж	15	НД	18.2	-

Таблица 12 . Клинични характеристика на пациентите с остра интермитентна порфирия

Сем	Пациент	Пол	Възраст на изява на болестта	Симптом	Брой кризи	Отключващ фактор	Лечение
I	П1	Ж	19	+	1	Менструация	Глюкоза
	Баща	М	44	+	-	Инфекция+ Медикамент	-
II	П2	Ж	20	+	2	-	Циметидин + Глюкоза.
	Бр.1	Ж	26	+	2	Бременност	Глюкоза
	Бр.2	Ж	30	+	1	Инфекция+ Медикамент	Глюкоза
	Майка	Ж		-	-	-	-
III	П3	Ж	24	+	1	Менструация	Хем- аргинат
	Син	М	20	-	-	-	-
IV	П4	Ж	22	+	2	Менструация	Глюкоза.
	Майка	Ж	58	+	-	Менструация	-
	Сестра	Ж		-	-	-	-
V	П5	Ж	39	+	1	Инфекция +Медикамент	Циметидин + Глюкоза
VI	П6	Ж	25	+	1	Менструация	Глюкоза
	Дъщеря	Ж		-	-	-	-
VII	П7	Ж	28	+	1	Менструация	Глюкоза
	Дъщеря	Ж	15	-	-	-	-

Таблица 11. Биохимична характеристика на пациентите с порфирия вариегата и вродена копропорфирия

Сем	Пациент	Пол	Възраст	Плазма скен max nm	Урина					Изпращане			
					ПБГ μmol/ 24 h	ДАЛК μmol/24 h	ОПу nmol/ 24h	Уро nmol/2 4 h	Коп nmol/2 4 h	ОПи nmol/g с.т.	Уро nmol/g с.т.	Коп nmol/g с.т.	Прото nmol/g с.т.
I-PV	П1	Ж	28	626	37	40	4675	2340	2335	-	-	-	-
	Дъщеря	Ж	11	НД	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II-PV	П2	Ж	30	626	383	-	7076	-	-	2422*	-	-	-
	Син	М	3	Отр.	2	13	0	-	-	0.6	-	-	-
III-PV	П3	М	69	626	3	19	1326	143	1183	671	84	241	346
	Син	М	43	627	75	223	930	-	-	1753	-	-	-
	Внук	М	10	Отр.	3	15	120	-	-	138	-	-	-
IV-PV	П4	Ж	80	626	2.2	16.8	1340	79	1261	3182	890	662	1630
	Дъщеря	Ж	58	626	3.7	30	199*	-	-	1202*	-	-	-
	Син	М	48	Отр.	5	32	0	-	-	142	-	-	-
V-PV	П5	Ж	31	626	505	309	14326	-	-	-	-	-	-
	Сестра	Ж	38	626	11*	33*	217*	-	-	-	-	-	-
	Син	М	19	Отр.	7	29	68	-	-	-	-	-	-
	Племенница	Ж	16	НД	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Племенник	М	17	НД	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VI- PV	П6	М	63	626	8	66	626	74	552	268	3	88	177
I-HCP	П	Ж	22	618	53	63	5100	1425	4100	4960	-	-	-
Референтни стойности					<15	<57	< 200	<35	<150	<150	<1	<20	<80

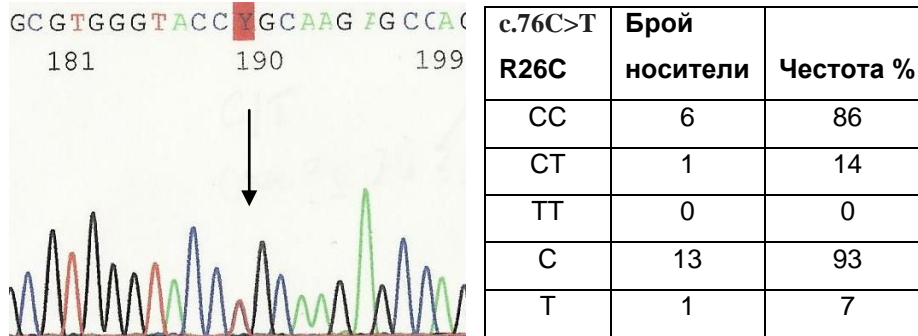
*, стойности измерени след пристъпа.

Таблица 13. Клинични характеристики на пациентите с порфирия вариегата и вродена копропорфирия.

Сем	Пациент	Пол	Възраст на изява на болестта	Симптоми		Отключващ фактор	Лечение
				Остри	Кожни		
I-PV	П1	Ж	21	+	-	Инфекция +Медикамент	Глюкоза
	Дъщеря	Ж		-	-	-	-
II-PV	П2	Ж	24	+	+	Инфекция +Медикамент	Глюкоза
	Син	М		-	-	-	-
III-PV	П3	М	39	-	+		Фотозащита
	Син	М	30	+	+	-	Глюкоза
	Внук	М	10	-	-	-	-
IV-PV	П4	Ж	45	-	+	-	Фотозащита
	Дъщеря	Ж	58	-	+	-	-
	Син	М		-	-	-	-
V-PV	П5	Ж	25	+	+	Инфекция +Медикамент	
	Сестра	Ж	25	+	+	Инфекция	
	Син	М		-	-	-	
	Племенница	Ж		-	-	-	
	Племенник	М		-	-	-	
VI- PV	П6	М	35	-	+	-	
I-НСП	П	Ж	22	+	-	Инфекция+ Медикамент	Глюкоза

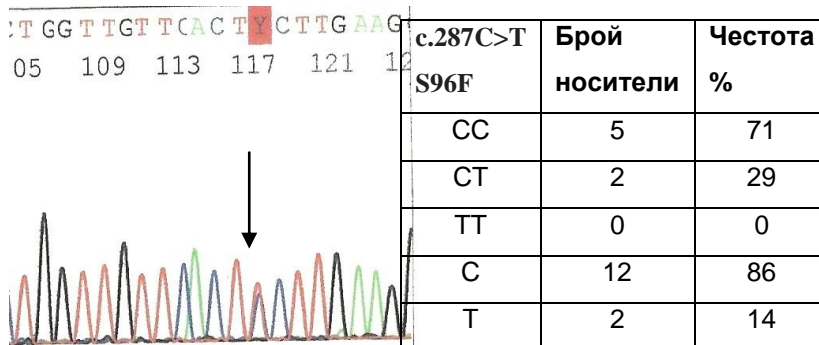
1.2 Резултати от мутационния анализ на PBGD гена

При 1 пациент се установи единична нуклеотидна замяна в екзон 3 с.76C>T в хетерозиготно състояние. Тя води до замяна на АК аргинин с цистеин на позиция 26 [p.R26C]. Представлява известна патогенна мутация с код SM950636 в HGMD.



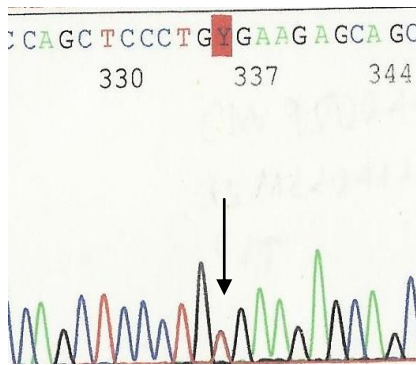
Фиг. 1. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 3, честота и разпространение в групата.

При 2 лица открихме единична нуклеотидна замяна в екзон 7 с.287C>T в хетерозиготно състояние. Тя обуславя замяната на АК серин с фенилаланин на позиция 96 p.S96F. Представлява известна патогенна мутация с код в HGMD SM023941.



Фиг. 2. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 7, честота и разпространение в групата.

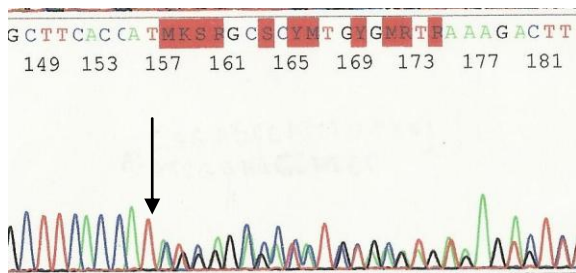
При 1 пробанд се установи единична нуклеотидна замяна в екзон 9 с.445C>T. Тя предизвиква образуването на преждевременен стоп кодон на позиция 149 -p.R149X. Представлява известна патогенна мутация с код SM950640.



c.445C>T R149X	Брой носители	Честота %
CC	6	86
CT	1	14
TT	0	0
C	13	93
T	1	7

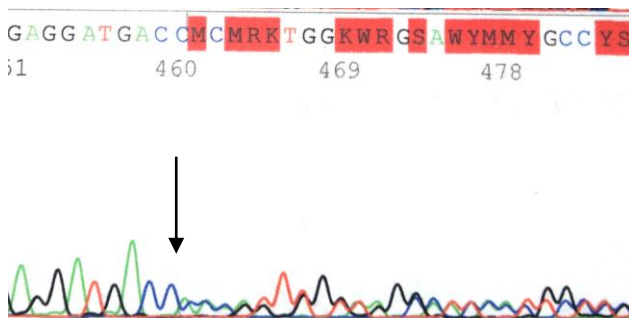
Фиг. 3. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 9, честота и разпространение в групата.

При 1 пациент се установи малката инсерция c.279-280insAT в екзон 7 в хетерозиготно състояние. Тя води до образуването на преждевременен стопкодон след включването на 24 различни аминокиселинни остатъци, в сравнение с референтния транскрипт. Не е описвана в базите данни.



Фиг. 4. Хетерозиготна малка инсерция в екзон 7.

При 1 пациент открихме малка делеция (c.887delC) в екзон 15, която предизвиква формирането на преждевременен стоп кодон след инкорпорирането на 3 различни АК, в сравнение с референтната последователност. Не е описана в базите данни.



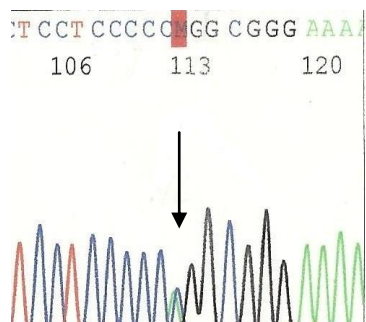
Фиг. 5. Хетерозиготна малка делеция в екзон 15.

c.345- 2A>C	Брой носители	Честота %

При 1 пробанд нуклеотидната хетерозиготно патогенна промяна състояние. сплайсинг

AA	6	86
AC	1	14
CC	0	0
A	13	93
C	1	7

установихме единична с.345-2A>C в интрон 7 в Представява известна мутация с код CS022266



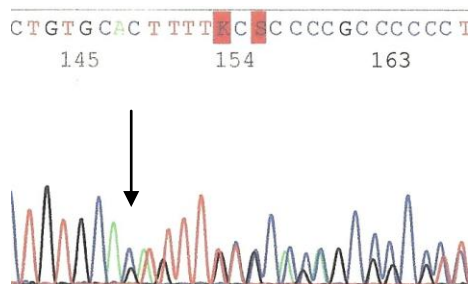
Фиг. 6. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в интрон 7, честота и разпространение в групата.

При 3 пробанда установихме единична нуклеотидна замяна в екзон 1 с.-199C>T в хомо- и хетерозиготно състояние. Този полиморфизъм rs589925 попада в участък, който не се транслира. Честотите на генотиповете за европейската популация са съответно 27% за CC, 51% за CT и 22% за TT. Алелните честоти са C- 53%, T- 47%.

При 5 пробанда установихме единична нуклеотидна замяна в екзон 10 с.555G>T в хомо- и хетерозиготно състояние. Тя обуславя синонимно кодиране p.V185V /rs1131488/. Честотите на генотиповете са съответно GG- 51% GT-40% TT-9% в европейската популация. Алелните честоти са G-71%, а T-29%

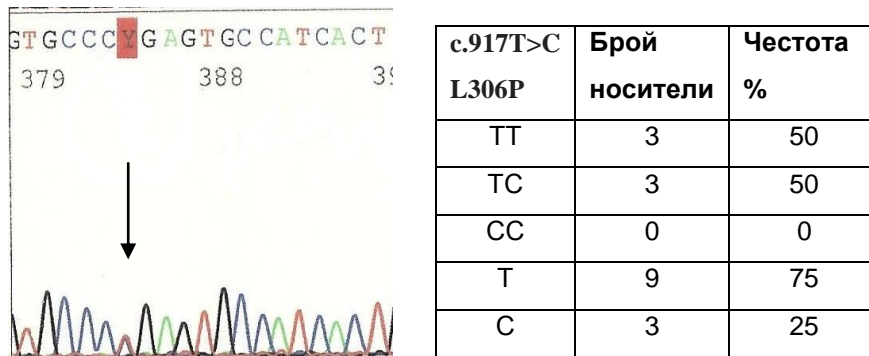
1.3 Резултати от мутационния анализ на PPOX гена

При 1 пациент установихме малка делеция с.441-442delCA в екзон 5 в хетерозиготно състояние. Тя предизвиква образуването на преждевременен стоп кодон след въвеждането на 9 различни аминокиселини. Не е описана в базите данни.



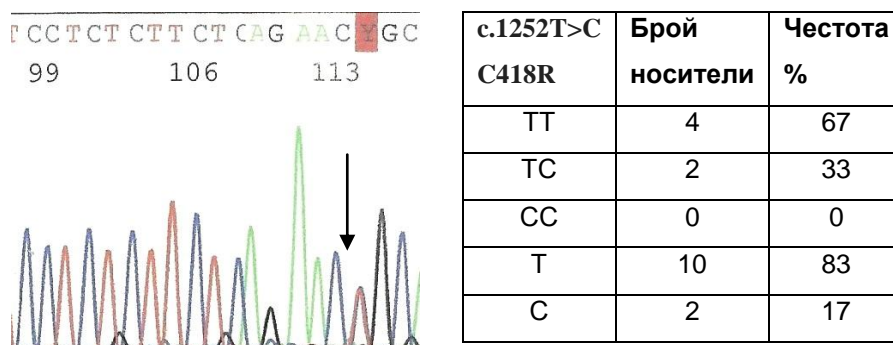
Фиг. 7. Хетерозиготна малка делеция в екзон 5.

При 3 пробанда намерихме еднаква единична нуклеотидна замяна с.917T>C в екзон 9 в хетерозиготно състояние. Тя води до замяна на АК левцин с пролин на позиция 306 (р.L306P). Не е описвана досега. Резултат от 1.0 за HumDiv и 1.0 за HumVar скорвете на приложението PolyPhen-2 предсказват, че тази мутация е вероятно патогенна.



Фиг. 8. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 9, честота и разпространение в групата.

При 2 пациента открихме еднаква единична нуклеотидна замяна с.1252T>C в екзон 12 в хетерозиготно състояние. Тя предизвиква замяна на цистеин с пролин в кодон 418 р.С418R. Не фигурира в базите данни. Резултатите 0.996 за HumDiv и 0.92 за HumVar сора на PolyPhen-2 приложението предсказват, че тази мутация е вероятно патогенна

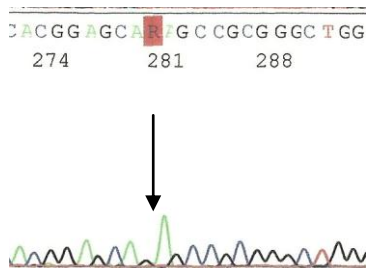


Фиг. 9. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 12, честота и разпространение в групата.

При 3 пациенти се установи единична нуклеотидна замяна в екзон 1 с.-247C>A в хомо- и хетерозиготно състояние. Тази замяна /rs2301286/ попада в нетранслируемия участък. Честотите на генотиповете в европейската популация са съответно АА - 15%, АС - 50% , СС - 35%. Алелните честоти на С - 60%, А - 40%.

1.4 Резултати от мутационния анализ на СРОХ гена

При пациентката установихме единична нуклеотидна замяна с.364G>Т в екзон 1 в хетерозиготно състояние. Тя обуславя преждевременното образуване на стоп кодон на позиция 122 р.Е122Х. Представлява нова нуклеотидна замяна.



Фиг. 10. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 1.

Открехме единична нуклеотидна замяна с.990A>G в хетерозиготно състояние. Тя обуславя синонимно кодиране р.Е330Е и е известен полиморфизъм rs1729995. Честотите на генотиповете в европейската популация са съответно 49%, 44% и 7% за AA, AG и GG. Алелните честоти за А са 29% , а за G -71%.

1.5 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. 14.

Таблица 14 . Генетични характеристики на семействата с остра интермитентна порфирия

Сем	Пациент	Нуклеотидна замяна	АК замяна	Тип изменение
I	П1	c.76C>T	p.R26C	Миссенс
	Баща	c.76C>T	p.R26C	Миссенс
II	П2	c.279-280insAT ^a	-	Изместване рамката на четене
	Братовчед 1	c.279-280insAT ^a	-	Изместване рамката на четене
	Братовчед 2	c.279-280insAT ^a	-	Изместване рамката на четене
	Майка	c.279-280insAT ^a	-	Изместване рамката на четене
III	П3	c.887delC ^a	-	Изместване рамката на четене
	Син	Отр.		-
IV	П4	c.445C>T	p.R149X	Нонсенс
	Майка	c.445C>T	p.R149X	Нонсенс
	Сестра	Отр.		-
V	П5	c.345-2A>C ^a	-	Сплайсинг мутация
VI	П6	c.287C>T	p.S96F	Миссенс
	Дъщеря	c.287C>T	p.S96F	Миссенс
VII	П7	c.287C>T	p.S96F	Миссенс
	Дъщеря	c.287C>T	p.S96F	Миссенс

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

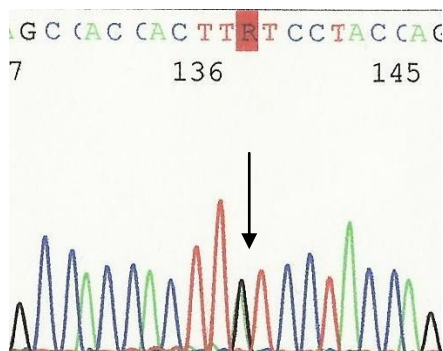
Установихме общо 3 различни неописани до момента единични нуклеотидни промени в PPOX гена при всичките 6 семейства с порфирия вариегата: c.441-442delCA в екзон 5, c.917T> C [p.L306P] в екзон 9, и c.1252T> C [p.C418R] в екзон 12. Те представляваха 2 мисенс мутации и 1 малка делеция. Една неописвана нонсенс 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. 15

Таблица 15. Генетични характеристики при семействата на порфирия вариегата и вродена копропорфирия

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

1.7 Резултати от мутационния анализ на UROD гена при порфирия кутанеа тарда

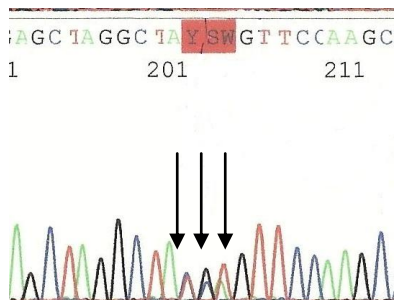
При 4 пациенти установихме единична нуклеотидна замяна c.616C>T в екзон 6 в хетерозиготно състояние. Тя води до преждевременно формиране на стоп кодон на позиция 206 p.Q206X и представлява известна патогенна мутация NM971362.



с.616C>T Q206X	Брой носител	Честота %
CC	9	69
CT	4	31
TT	0	0
C	3	38
T	5	62

Фиг. 11. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 6, честота и разпространение в групата.

При 1 пробанд намерихме три последователни единични нуклеотидни замени с.399T>C, с.400G>C и с. 401T>A в хетерозиготно състояние. Те обуславят замяна на АК валин с глутамин на позиция 314. Представява известна патогенна мутация с код HGMD.



Фиг. 12. Три последователни нуклеотидни замени в хетерозиготно състояние.

При 12 пробанди установихме единична нуклеотидна замяна с.636+30G>T в интрон 6-7 в хомо- и хетерозиготно състояние. Представява известен полиморфизъм rs11211066. Честотите на генотиповете GG GT и TT са съответно 63% 31% и 6%. Алелните честоти на G и T са съответно 79% и 21%.

1.8 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. 16.

Таблица 16. 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	-	

1.9 Диагностични различия между фамилната и спорадична порфирия кутанеа тарда

Факторите, отключващи порфирия кутанеа тарда, клиничните и биохимичните данни на болните са представени на табл. 17. 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 доказа 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 чернодобрните 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. Трина имаха ЧЦ клас А по Чайлд, а при

останалите 5 абдоминалната ехография установи изразен дифузен паренхимен 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 17. Отключващи фактори, клинични и биохимични при 13 мъже с порфирия кутанеа тарда

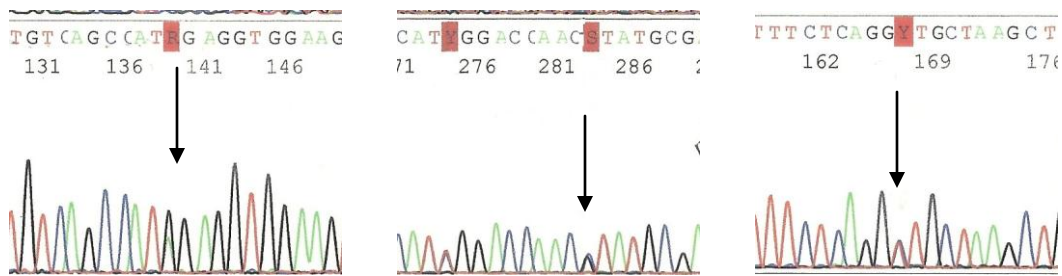
Пациент	Възраст	Форма	Алкохол	Н С V	ЧЦ	ОП nmol/ 24h	УроП nmol/l	UROD pkat/g Hb	ТН %	АЛАТ U/l	ГГТ U/l	Скор
П 1	33	Фам	Несистемно	-	-	8541	НД	НД	20	62	151	6
П 2	26	Фам	Системно	-	-	2830	184	15.1	41	53	178	8
П 3	52	Фам	Несистемно	-	-	5261	133	-	41	64	76	6
П 4	45	Фам	Несистемно	-	-	6750	74	-	52	16	53	3
П 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	

1.10 Резултати от мутационния анализ на FECH гена при еритропоеична протопорфирия

При П1 установихме единична нуклеотидна замяна с.101G>A [p.W34X] в екзон 2 в хетерозиготно състояние. Тя обуславя преждевременното образуване на стоп кодон на позиця 34. Представлява новооткрита нонсенс мутация.

При П2 установихме единична нуклеотидна замяна с.913-1G>C в интрон 8-9 в хетерозиготно състояние. Представлява новооткрита замяна.

При П1 и П2 намерихме единична нуклеотидна замяна IVS3-48C>T в хетерозиготно състояние. Тя представлява известен полиморфизъм CS020196 rs2272783. Честотата на генотиповете в европейската популация за CC, CT и TT са съответно над 89%, 10% и под 1%. Алелните честоти са 95% за C и 5% за T.



Фиг. 13. Хетерозиготни нуклеотидни промени съответно в екзон 2, интрон 8-9 и IVS-48.

При П2 установихме единична нуклеотидна замяна с.798C>G в екзон 7 в хетерозиготно състояние. Тя обуславя синонимно кодиране p. P266P. Представлява известен полиморфизъм rs536765. Честотите на генотиповете CC CG GG са съответно 46%, 38% и 15%. Алелните честоти за C и G са съответно 66% и 34%.

1.11 Обобщение на молекулярно-генетичните находки при семействата с еритропоеична 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. 18.

Таблица 18. 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

ЧАСТ 2. Хемохроматоза

2.1 Клинични изява при пациентите с хемохроматоза

На табл. 19 са показани клиничните и биохимичните данни на изследваните пациенти. Пробандите от първите 3 семейства са с поставена диагноза средно на около 35г. възраст средата на 4-то десетилетие, но вече при прояви на декомпенсация, най-често на сърдечна недостатъчност с асцит и формирана ЧЦ.

При П1 болестта се изявава през 2007 година на 40 годишна възраст с клиниката на изострена застойна сърдечна недостатъчност, захарен диабет и ранна менопауза (на 35 годишна възраст) ; от проведената тогава ЕхоКГ фракцията на изтласкване е 26%. Лявата камера е дилатирана с дифузна хипокинезия. Проведени са МРТ на корем и гръден кош с образ съответстващ на идиопатична

хемохроматоза; редуциран миокарден контрактилитет; увеличен обем на двете сърдечни камери в крайна систола и диастола; митрална регургитация, по-скоро в следствие на дилатацията на лявата камера. Намален е интензитетът на сигнала от миокарда в T2, вероятно израз на ускорената релаксация поради депониране на парамагнитни материи в сърдечната стена. От проведените лабораторни изследвания се установява ТН 100% и силно завишен феритин над 1000 ng/ml. От 2007 година провежда редовни флеботомии; като проявите на декомпенсация от страна на сърдечно-съдовата система са овладяни. Отстранени са общо около 20g желязо.

При П2 първата изява на болестта е през 2007г. също с дилатативната кардиомиопатия. Тогава са установени завишени серумно желязо и нисък ЖСК с ТН близо 100% и увеличен феритин 1300 ng/ml. През 2008 година е проведена чернодробна биопсия с данни за микронодуларна ЧЦ с отлагане на хемосидеринови пигменти и позитивна реакция на Pearls за желязо в чернодробната тъкан. Провежда кръвопускания до настоящия момент и са отстранени общо около 2g желязо. През 2012 година при П3, сестрата на П2 поради ранна аменорея (на 36 години) се установява ТН 100% и силно завишен феритин 1484 ng/ml ; започнати са регулярни флеботомии.

Клинично болестта при П4 се изявява на 36 годишна възраст с прояви на изострена застойна сърдечна недосатъчност, захарен диабет, артропатия и ранна менопауза (на 28г.). ЧЦ е потвърдена хистологично и са доказани хемосидеринови отлагания и позитивна реакция за Pearls за желязо. От 1992г. провежда редовно кръвопускания с общо отстранени до 40-50g желязо.

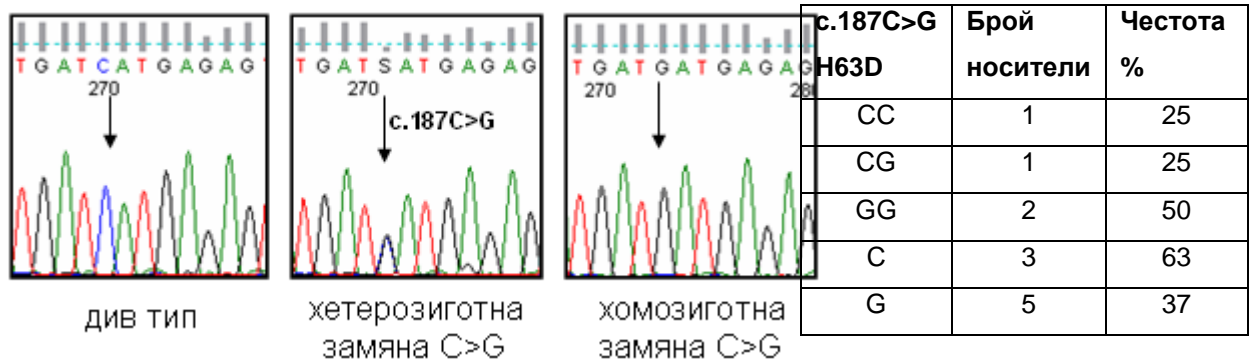
През 2012г. при П5 по повод на астено-адинамия, двукратно завишени трансаминази при негативни вирусни маркери и други причини за чернодробна болест са установени високо ТН и феритин 615 ng/ml. Проведена е фиброгастроскопия и хистологично изследване на стомашна лигавица с данни за натрупване на желязо при оцветяване по Pearls. Не са установени отклонения в сърдечната функция при проведената ехокардиография. От 2012г. провежда периодични кръвопускания в други клиники.

Таблица 19. 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 Резултати от мутационния анализ на HFE гена при пациенти с хемохроматоза

При 3 от пациентите се установи точкова мутация в кодон 63 с.187C>G в екзон 2, която води до замяна на АК хистидин на позиция 63 с аспартат [H63D]. Описана е като мутация с код SM960827 в HGMD. Един пациент бе хомозигот по дивия тип; един бе хетерозигот, а двама пациента бяха хомозиготи. В базите данни честотата на генотиповете при европейската популация е съответно 64.3% за CC и 35.7% за CG.



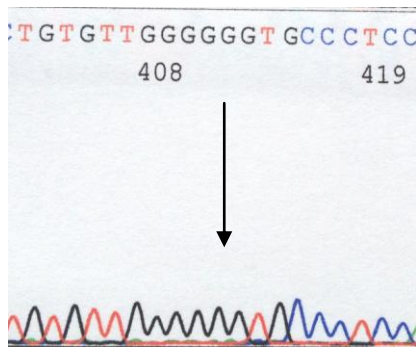
Фиг. 14 Див тип, хетеро- и хомозиготна нуклеотидна замяна в екзон 2, честота и разпространение в групата.

При 4 пациента беше установена нуклеотидна замяна в интрон 2-3: с.340+4T>C като при двама пациента бе в хетерозиготно и при 2 в хомозиготно състояние. Представлява известен полиморфизъм rs2071303. В базите данни честотата на генотиповете при европейската популация е съответно 39.8% за TT, 52.2% за TC и 8% за CC.

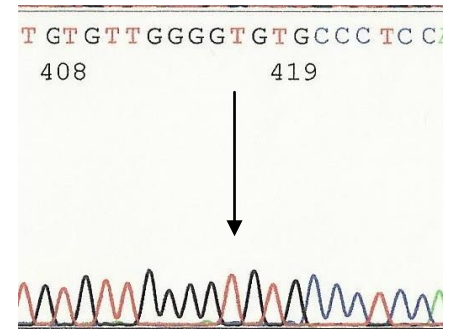
При 4 болни беше установена нуклеотидна замяна в интрон 5-6: с.1007-47 G>A; при двама пациент в хетерозиготно, а при другите двама - в хомозиготно състояние. Представлява известен полиморфизъм rs1572987. В базите данни честотата на алела G A са съответно 54% и 46% , а честотата на генотиповете AA, AG и GG са съответно 21%, 50% и 29% при европейската популация.

2.3 Резултати от мутационния анализ на HFE2 гена при пациенти с хемохроматоза

При 4 пациента беше намерена мутация в екзон 4 : с.959G>T в хомозиготно състояние. Тя води до замяна аминикиселината глицин с валин на позиция 320 [G320V]. Това е известна патогенна мутация описана в HGMD с код SM040081.



с.959G>T G320V	Брой носители	Честота %
GG	0	0
GT	0	0
TT	4	100
G	0	0
T	8	100



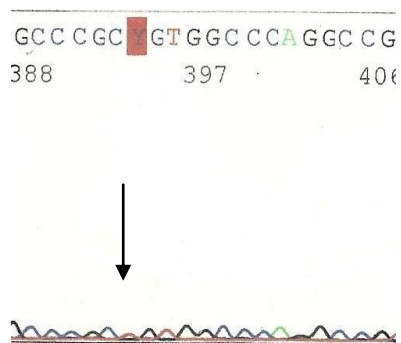
Фиг. 15. Див тип и хомозиготна нуклеотидна замяна в екзон 4, честота и разпространение в групата.

2.4 Резултати от мутационния анализ на НАМР гена при пациенти с хемохроматоза

При изследваните пациенти не се откриха полиморфизми в екзони 2, 3 и 4, както и в обхванатите интрони на този ген.

2.5 Резултати от мутационния анализ на Tfr2 гена при пациенти с хемохроматоза

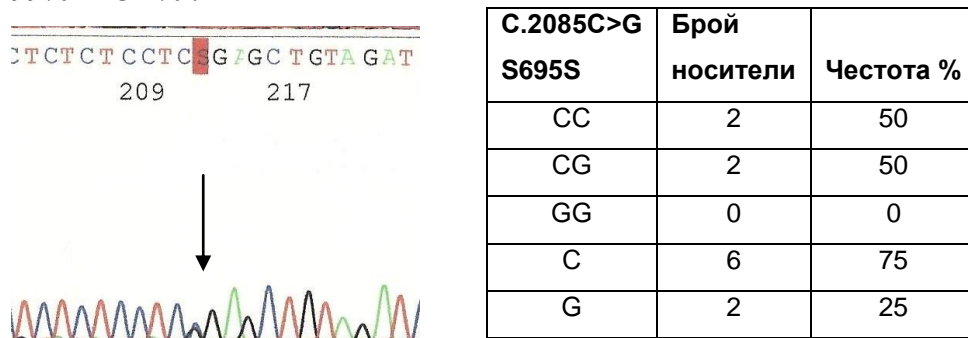
При 1 болна се установи единична нуклеотидна замяна в екзон 17 с.1851C>T в хетерозиготно състояние. Този полиморфизъм (rs2075674) не води до аминокиселинна замяна в кодон 617 р.А617А. Честотата на генотиповете СС, СТ и ТТ в базите данни са 66%, 29% и 4%, съответно в европейската популация Алелните честоти са съответно С 81% Т 19%.



С1851C>Т А617А	Брой носители	Честота %
СС	3	75
СТ	1	25
ТТ	0	0
С	7	88
Т	1	12

Фиг. 16. хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 17, честота и разпространение в групата.

При двама пациенти се намери единична нуклеотидна замяна в екзон 18 с.2085C> G в хетерозиготно състояние. Този полиморфизъм (rs150303632) не води до замяна на аминокиселинен остатък в кодон 695, р.S695S. Честотата на генотиповете GG GC европейската популация са 97% и 3% съответно. Алелните честоти са съответно G 99% и C 1% .

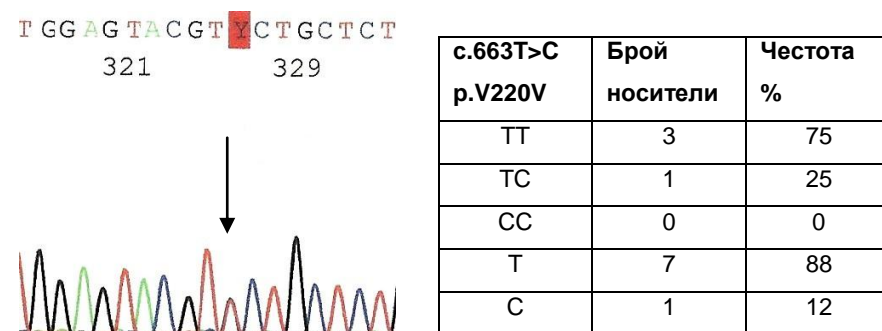


Фиг. 17. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 18, честота и разпространение в групата.

При 2 лица беше установена малка инсерция в интрон 17-18 с.1996-110insCA в хетерозиготно състояние. ДНК алтерацията се намира 110 бази преди началото на екзон 18. Този полиморфизъм не е описан в базите данни и ефектът му е неясен.

2.6 Резултати от мутационния анализ на SLC40A1 гена при пациенти с хемохроматоза

При 1 пробанд беше намерен единична нуклеотидна замяна в екзон 6 с.663T>C в хетерозиготно състояние. Този полиморфизъм (rs2304704) не води до замяна на аминокиселина в кодон 220 р.V220V. Честотата на генотиповете ТТ , ТC и СС в базите данни за европейската популация са съответно 14% 56% 46%. Алелните честоти са съответно, Т 39% С 61%.



Фиг. 18. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 6, честота и разпространение в групата.

При 2 пациента се установи единична нуклеотидна замяна в интрон 1-2 с.44-24G>C, в хомозиготно при единия и в хетерозиготно състояние при другия. Представлява известен полиморфизъм rs1439816. Честотите на генотиповете GG GC CC са съответно 77%, 27% и 1%, за европейската популация. Алелните честоти са както следва, C - 14% G - 86%.

При 1 болен беше намерена единична нуклеотидна замяна в интрон 2-3 с.112+147A>G в хетерозиготно състояние. Представлява известен полиморфизъм rs1123109. Честотите на генотиповете AA, AG и GG за европейската популация са съответно 59%, 36% и 5% . Алелните честоти са съответно A - 77%, G - 23%.

При пробанд 5 мутация C282Y в HFE гена беше насочено търсена и потвърдена, останалите гени, отговорни за хемохроматозата не бяха изследвани.

2.7 Обобщение на молекулярно-генетичните находки при пациентите с хемохроматоза

Данните от ДНК анализа са представени на табл. 20. Установиха 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 20. Обобщение на молекулярно генетичните находки при пациентите с хемохроматоза

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

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

Дъщерята на P1 беше хомозигот, а дъщерите на P3 бяха хетерозиготи по H63D мутацията в екзон 2 на гена за HFE. Дъщерите на P1 и P3 и синът на P4 бяха хетерозиготи по мутацията G320V в гена за HFE2. Данните са описани в табл. 21

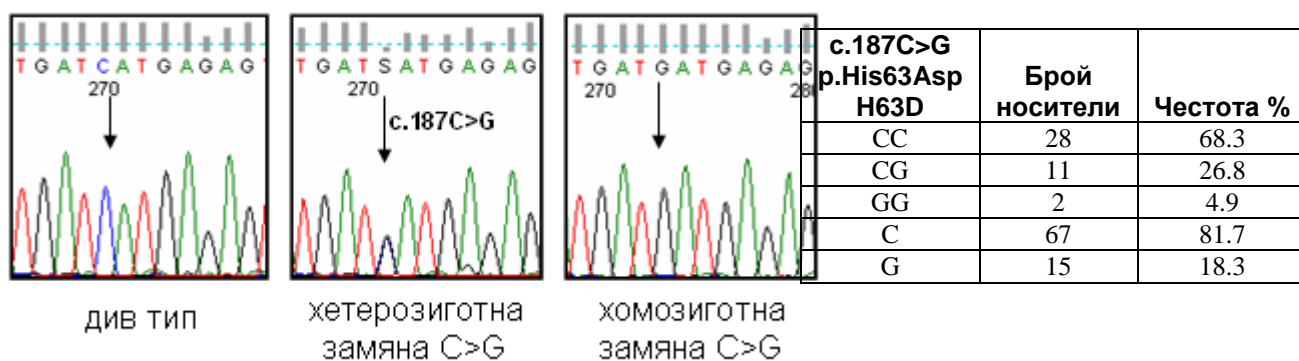
Таблица 21 Носителство на патогенни мутации у потомците на пациенти с хемохроматоза

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

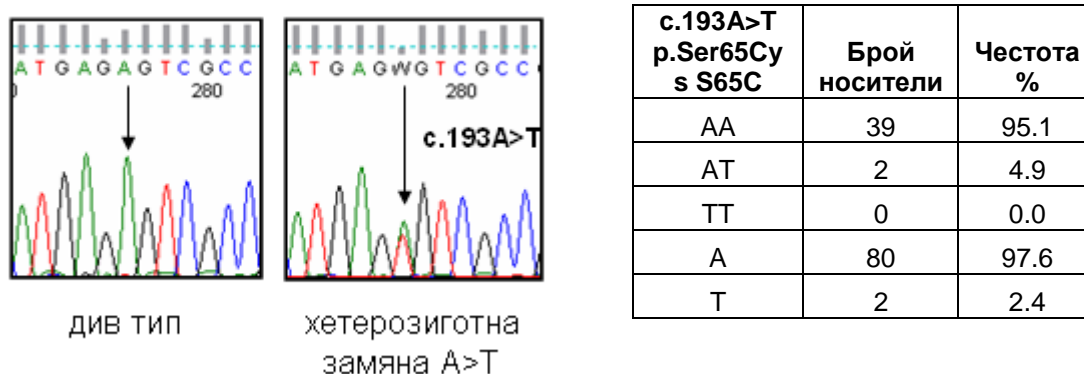
3.1 Резултати от мутационния анализ на екзони 2 и 4 на HFE гена при 41 пациенти със синдром на претоварване с желязо и съпътстващи чернодробни увреждания.

При 13 (31.7%) пациента беше установена мутация в кодон 63 - с.187C>G, която води до замяна на АК хистидин с аспаратат (p.H63D). В базите данни честотата на генотиповете при европейската популация е съответно 64.3% за CC и 35.7% за CG.



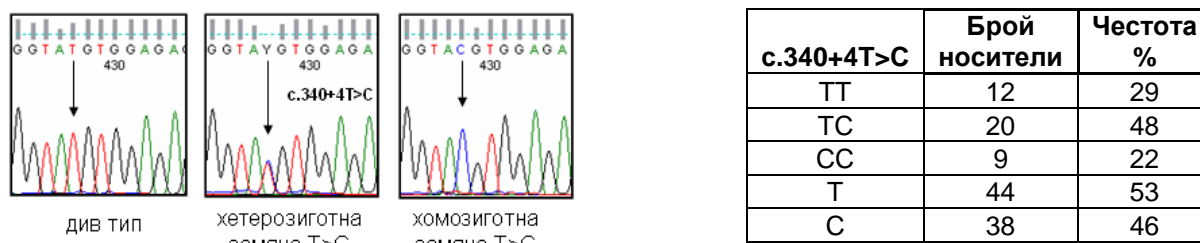
Фиг. 19. Див тип, хетеро- и хомозиготни мутации в кодон 63 на екзон 2а на HFE и честотата на разпространение в групата.

При 2 (4.9 %) пациента беше установена мутация в кодон 65 - с.193A>T, която води до замяна на АК серин с цистеин (p.S65C). В базите данни честотата на генотиповете при европейската популация е съответно 97.8% за AA и 2.2% за AT.



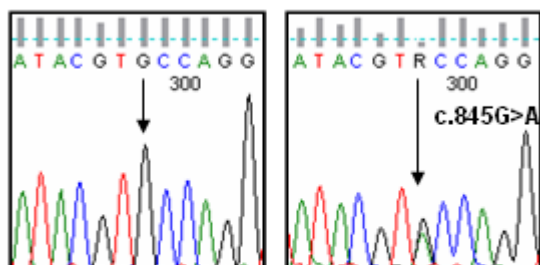
Фиг. 20: Див тип и хетерозиготна мутация в кодон 65 на екзон 2а на HFE и честотата на разпространение в групата.

При 29 (70.7 %) пациента беше установена нуклеотдна замяна в интрон - с.340+4T>C. В базите данни честотата на генотиповете при европейската популация е съответно 39.8% за TT, 52.2% за TC и 8% за CC.



Фиг. 21. Див тип, хетеро- и хомозиготни нуклеотидни замени в интрон на HFE и честотата на разпространение в групата.

При 2 (4.9 %) пациента беше установена мутация в кодон 282 - с.845G>A, която води до замяна на АК цистеин с тирозин (р.Cys282Tyr). В базите данни честотата на генотиповете при европейската популация е съответно 83.3% за GG и 16.7% за AG.



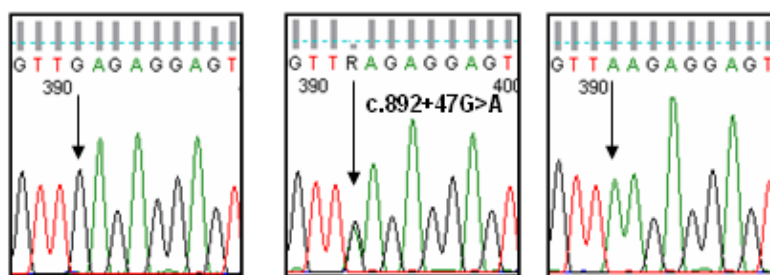
див тип

хетерозиготна
замяна G>A

с.845G>A р.Cys282Tyr C282Y	Брой носител	Честота %
GG	39	96
GA	2	4
AA	0	0
G	80	98
A	2	2

Фиг. 22: Див тип и хетерозиготна мутация в кодон 282 на екзон 3 на HFE и честотата на разпространение в групата.

При 9 (22.0 %) пациента беше установена нуклеотдна замяна в интрон - с.892+47G>A. Тази замяна не се открива в базите данни и ефектът не е ясен.



див тип

хетерозиготна
замяна G>A

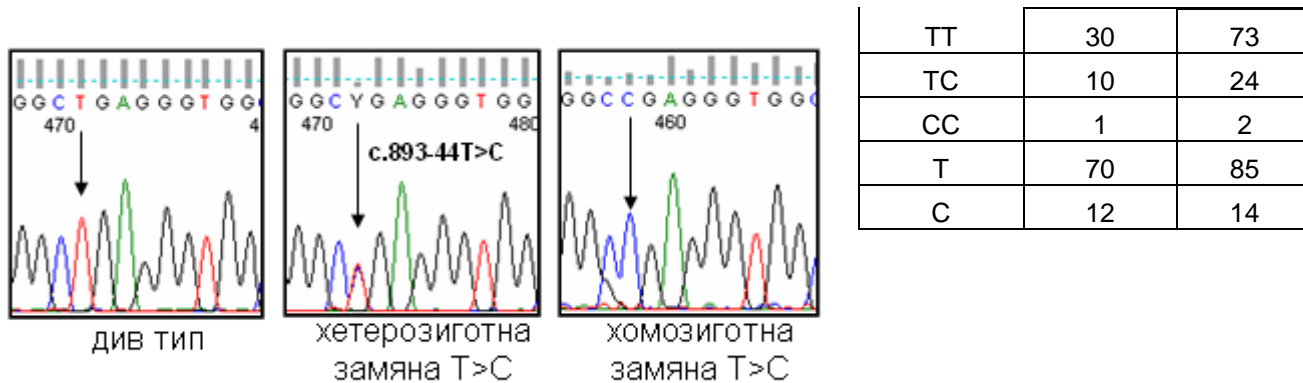
хомозиготна
замяна G>A

с.892+ 47G>A	Брой носител	Честота %
GG	32	78
GA	8	19
AA	1	2
G	72	87
A	10	12

Фиг. 23. Див тип, хетеро- и хомозиготни нуклеотидни замени в интрон на HFE и честотата на разпространение в групата.

При 11 (26.8 %) пациента беше установена нуклеотдна замяна в интрон - с.893-44T>C. В базите данни честотата на генотиповете при европейската популация е съответно 84.1% за TT и 15.9% за TC.

с.893- 44T>C	Брой носител	Честота %
-----------------	-----------------	--------------



Фиг. 24. Див тип, хетеро- и хомозиготни нуклеотидни замени в интрон на HFE и честотата на разпространение в групата.

При изследваните 41 пациента не беше открита нито една мутация или еднонуклеотиден полиморфизъм (SNP) във фрагмент 2b на HFE гена. Също така не бяха установени хомозиготи за мутацията в кодон 282, но бяха открити 2 сложни хетерозигота от типа Cys282Tyr/ His63Asp с честота, доближаваща се до литературните данни от 4.9%, които се обсъждат като една от възможните причини за появата на синдром на претоварване с желязо.

Таблица 22. Мутации и полиморфизми в екзони 2 и 4 на HFE гена

Паци- енти	HFE_ фрагмент 2а			HFE_ фрагмент 3		
	с.187C>G р.His63As р H63D	с.193A>T р.Ser65Cy s S65C	с.340+4T> C	с.845G>A р.Cys282Ty r C282Y	с.892+47G> A	с.893- 44T>C
1	CG	AA	CC	GG	GG	TC
2	CC	AA	TT	GG	GG	TT
3	CC	AT	CC	GG	GG	TC
4	CC	AA	CT	GG	GG	TC
5	GG	AA	CC	GG	GG	TT
6	CG	AA	CC	GG	GG	TC
7	CC	AA	CT	GG	GA	TT
8	CC	AA	CC	GG	GG	TT
9	CC	AA	CC	GG	GG	TT
10	CC	AA	TT	GG	GA	TT
11	CG	AA	CT	GA	GG	TT
12	CC	AA	TT	GG	GG	TT
13	CG	AA	CT	GG	GG	TT
14	CC	AA	TT	GG	GG	TT
15	CC	AA	TT	GG	GA	TT
16	CC	AA	TT	GG	GA	TT
17	CC	AA	TT	GG	GG	TT
18	CC	AT	CT	GG	GG	TC
19	CG	AA	CT	GG	GG	TT
20	CG	AA	CT	GG	GG	TT
21	CC	AA	CT	GG	GG	TC
22	CC	AA	CT	GG	GA	TT
23	CG	AA	CT	GG	GG	TT
24	CC	AA	CT	GG	GG	TT
25	CC	AA	CC	GG	GG	CC
26	CG	AA	CT	GG	GG	TT
27	CG	AA	CT	GG	GG	TT
28	CC	AA	TT	GG	GA	TT
29	CC	AA	TT	GG	GG	TT
30	CC	AA	TT	GG	AA	TT
31	CC	AA	CT	GG	GG	TC
32	CC	AA	CT	GG	GA	TT
33	CG	AA	CT	GA	GG	TT
34	GG	AA	CC	GG	GG	TT
35	CC	AA	CT	GG	GG	TC
36	CC	AA	TT	GG	GG	TT
37	CC	AA	TT	GG	GG	TT
38	CC	AA	CT	GG	GA	TC
39	CC	AA	CT	GG	GG	TC
40	CC	AA	CT	GG	GG	TT
41	CG	AA	CC	GG	GG	TT

*В червено са отбелязани мутациите и SNPs.

Девет пациента, при които имаше клинично съмнение за хемохроматоза бяха изследвани за 5-те гена отговорни за хемохроматоза. Те бяха подбрани въз основа характеристиките, посочени в табл. 23.

Таблица 23. 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

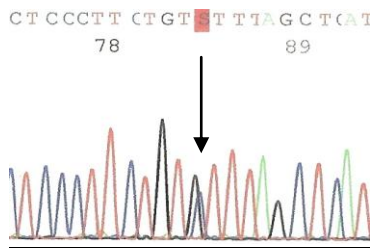
3.2 Резултати от мутационния анализ на гените, отговорни за хемохроматозата при 9 пациента със синдром на претоварване с желязо чернодробно увреждане

3.2.1. Резултати от мутационния анализ на екзони 1, 3, 5 и 6 и обхванатите интрони от HFE гена

При изследваните 9 лица не се установиха полиморфизми в екзони 1,3, 5 и 6 на HFE гена. В интрон 5-6 се намери единична нуклеотидна замяна с.1007-47 G>A в хетерозиготно състояние при 6 от лицата. Този полиморфизъм е известен rs1572982.

3.2.2 Резултати от мутационния анализ на HFE2 гена

Не се откриха полиморфизми в екзони 2, 3 и 4 на гена за хемоювелин. За сметка на това при двама пациенти се установи рядък полиморфизъм в интрон 2-3 в хетерозиготно състояние, а именно с.98-6C>G. Този SNP е известен - rs56025621. Честотите на генотиповете при европейската популация са 97% за GG и 4% на CG. Алелните честоти са съответно 98% за C и 2% за G.

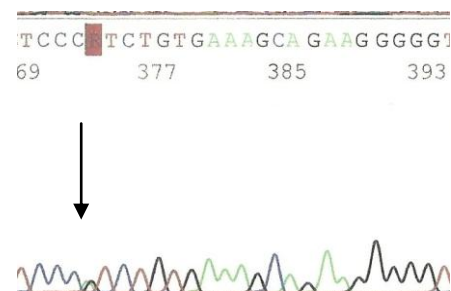


с.98-6C>G	Брой носители	Честота %
CC	7	78
CG	2	22
GG	0	0
C	16	89
G	2	11

Фиг. 25 Хетерозиготна нуклеотидна замяна в интрон 2-3, честота и разпространение в групата.

3.2.3 Резултати от мутационния анализ на NAMР гена

При един индивид се установи единична нуклеотидна замяна в екзон 3 в хетерозиготно състояние, с.92C>T. Тя води до замяна на АК треонин на 31 позиция с метионин [р.Т31М]. PolyPhen-2 резултат от 0.7 според HumDiv предсказва, че мутацията вероятно е патогенна. Алтерацията представлява известен полиморфизъм rs146776859. Честотата на генотиповете в европейската популация са съответно 99% за СС и 1% за СТ, а алелните честоти в същата популация са съответно 99% за С и 1% за Т.

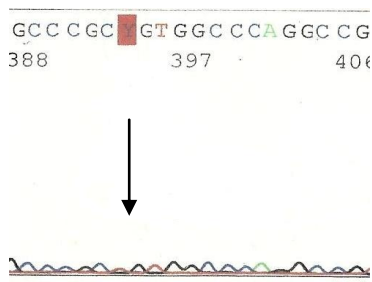


с.92C>T р.Т31М	Брой носители	Честота %
CC	8	89
CT	1	11
TT	0	0
C	17	94
T	1	6

Фиг. 26. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 3, честота и разпространение в групата.

3.2.4 Резултати от мутационния анализ на TfR2 гена

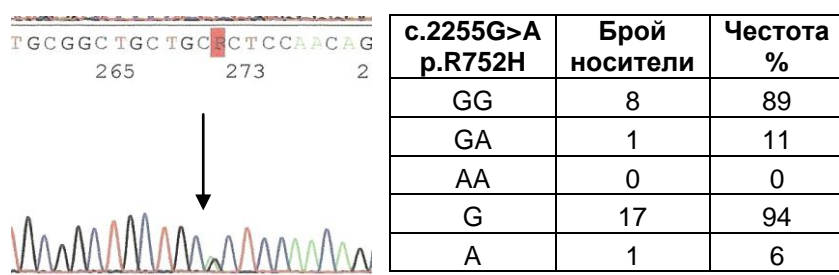
При 3 пациента установихме единична нуклеотидна замяна в екзон 17, с.1851C>T; при 2 в хетерозиготно, а при един пациент в хомозиготно състояние. Този известен полиморфизъм не води до аминокиселинна замяна. р.А617А.



с.1851C>T р.А617А	Брой носители	Честота %
CC	6	67
CT	2	22
TT	1	11
C	14	88
T	4	12

Фиг. 27. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 17, честота и разпространение в групата.

При 1 пациентка беше открита единична нуклеотидна замяна в екзон 19, с.2255G>A в хетерозотно състояние. Тя предизвиква замяна на аминокиселиния остатък аргинин с хистидин на позиция 752 р.R752H. Представява известна сравнително рядка миссенс мутация с код rs41295942. PolyPhen-2 софтуерът предсказва, че ефектът и е патогенен върху функцията на белтъка със скор 1 за HumDiv и HumVar. Честотата на генотиповете в европейската популация са съответно 97% за GG и 3% за GA. Алелните честоти са съответно 98% за G и 2% за A.

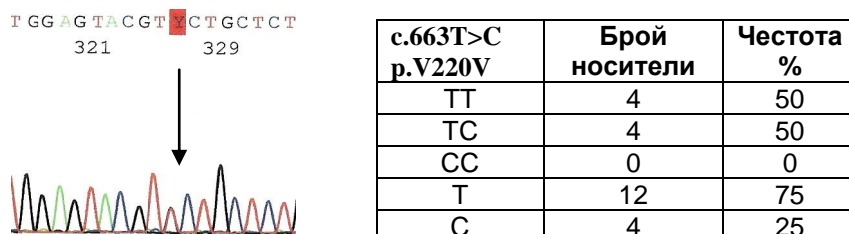


Фиг. 28. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 19, честота и разпространение в групата.

При 3 пациента беше открит SNP в интрон 8-9 с.967+61G>A в хетерозиготно състояние. Тази нуклеотидна замяна не е описвана в базите данни и ефектът и не е ясен. При двама пациента беше намерена малка инсерция в интрон 17-18 с.1996-110insCA, в хетерозиготност. Тя представлява известен полиморфизъм.

3.2.5 Резултати от мутационния анализ на SLC40A1 гена

При 4 пациента беше открита единична нуклеотидна замяна в екзон 6 с.663T>C в хетерозотно състояние. Тя обуславя синонимно кодиране р.V220V и е известен полиморфизъм.



Фиг. 29. Хетерозиготна нуклеотидна замяна в екзон 6, честота и разпространение в групата.

Установихме няколко единични нуклеотидни замени в интрони. При трима пациенти в интрон 1-2 се установи с.44-24G>C в хетерозиготност. Този полиморфизъм не е описван в базите данни и е с неясен ефект. При двама пациенти беше открит полиморфизъм в интрон 2-3 с.112+147A>G в хетерозиготно състояние. При 3 пациента беше установена единична нуклеотидна замяна в интрон 7-8 с.1402+117C>T в хетерозиготно състояние. Тя представлява известен полиморфизъм.

3.3 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. 24.

Таблица 24. 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)

При общо 9 от тези пациенти с клинично подозрение за хемохроматоза, 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 таблица 25

Таблица 25. Обобщение на молекулярно-генетичните находки при 9 пациента

Пациент	АК	ВА	ВГ	ММ	СБ	СК	ЕК	ДЧ	НБ
HFE									
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
HFE2									
IVS 2-3				c.98-6C>G				c.98-6C>G	
Генотип	CC	CC	CC	CG	CC	CC	CC	CG	CC
HAMP									
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

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

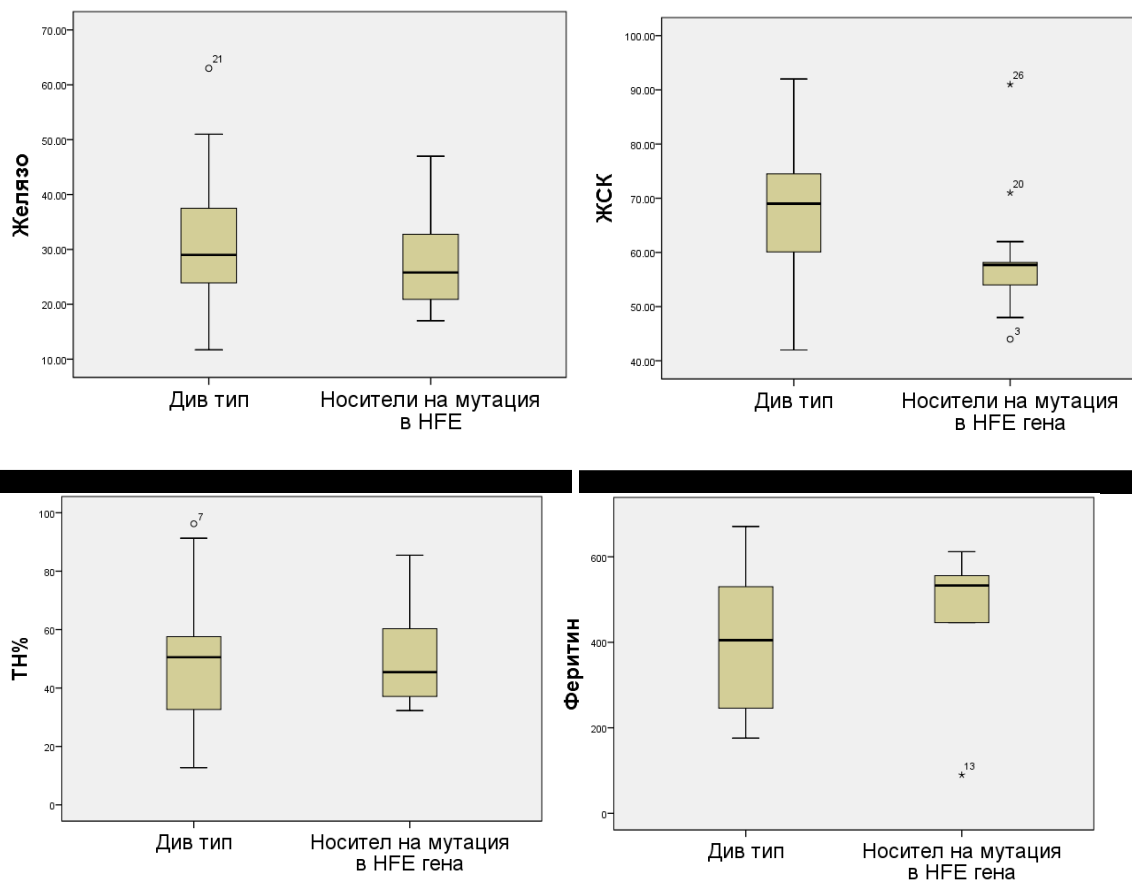
Сравнихме честотата на установените от нас мутации в HFE гена при пациенти със синдром на претоварване с желязо и здрави доброволци и пациенти с порфирия кутанеа тарда (изследвани от Ivanova и съавт. (88,189)). C282Y и S65C мутациите не са открити при контролната група лица, но присъстват в групата на 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. 26.

Таблица 26. 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

3.5 Връзка между хетеро- или хомозиготното носителство на мутации в HFE гена от една страна и стойностите на параметрите на обмяната на желязото, чернодробните ензими и наличието на ЧЦ и ЗД от друга

Не установихме връзка между носителството на някоя от мутациите на HFE гена (див тип с/у хетеро- или хомозиготно) и серумно желязо ($p=0,39$), ТН ($p=0,07$), както и феритина ($p=0.6$). Установихме връзка между наличието на някоя от мутациите в HFE гена и серумните стойности на ТЖСК ($p=0,01$)



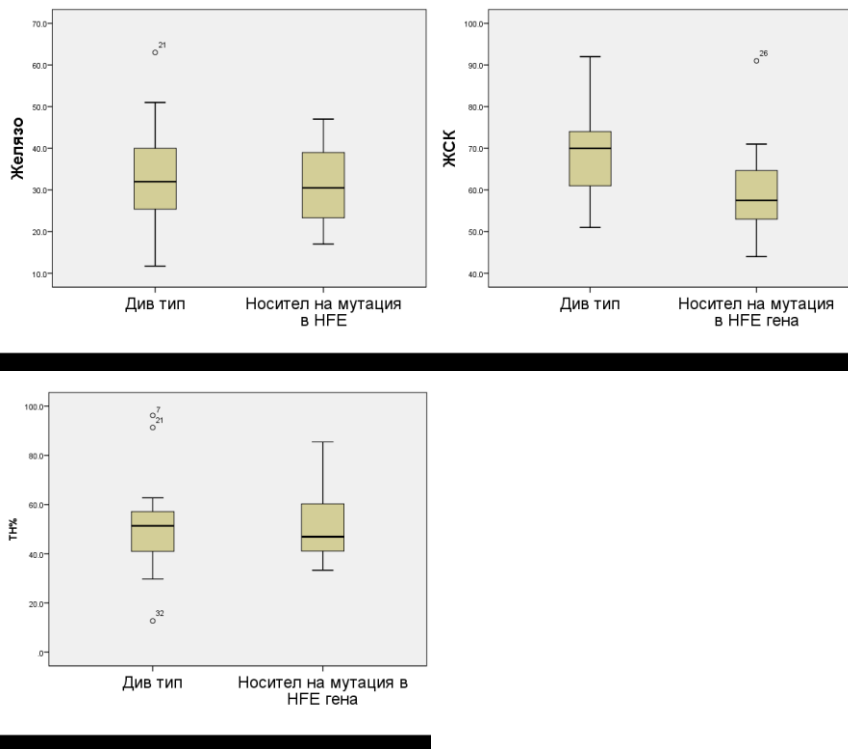
Фиг. 30. Параметри на желязната обмяна при носителите на мутация в HFE гена.

Не намерихме връзка между носителството на мутации в HFE гена и стойностите на чернодробните ензими – АСАТ ($p=0.056$); АЛАТ ($p=0.5$) и ГГТ ($p=0.5$). Установихме статистически значими по-високи стойности на АФ (но в допустимите референтни стойности и при двете групи) при пациентите носители на мутации, $p=0.02$

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), $p=0.6$.

3.6 Връзка между наличието на мутации в HFE гена и параметрите на желязната обмяна при пациентите с HCV инфекция.

В подгрупата на пациентите, позитивни за HCV (n=24) не установихме връзка между наличието на мутации в HFE гена и параметрите на желязната обмяна – серумно желязо ($p=0.8$), ТЖСК ($p=0.2$) и ТН% ($p=0.9$).

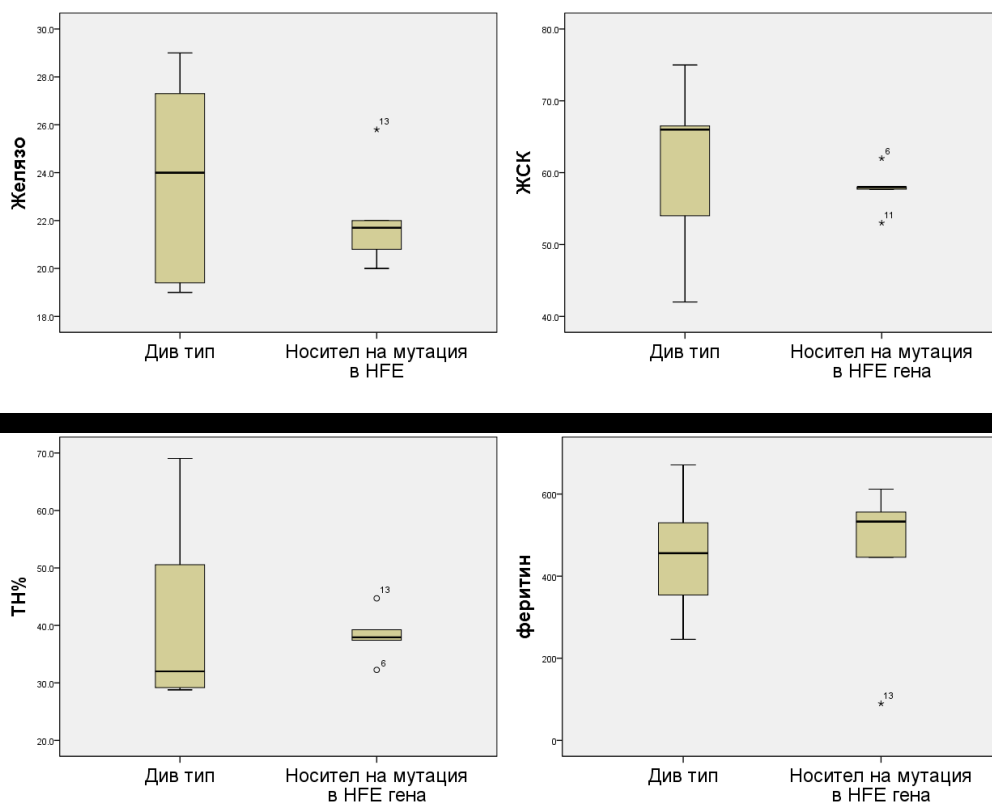


Фиг. 31. Параметри на желязната обмяна при носителите на HFE мутация в групата на HCV (+).

Не установихме връзка между носителството на мутации в HFE гена и стойностите на чернодробните ензими при пациентите с HCV (+) - АСАТ ($p=0.5$), АЛАТ ($p=0.6$), ГГТ ($p=0.5$). Установихме статистически значими по-високи стойности на АФ (но в допустимите референтни стойности и при двете групи) при пациентите HCV (+) и носители на мутации, $p=0.005$.

3.7 Връзка между наличието на мутации в HFE гена и стойностите на показателите на желязната обмяна и чернодробните ензими при пациенти с HCV (+)

Не установихме връзка между наличието на мутация в HFE гена и стойностите на желязната обмяна - серумно желязо ($p=0.9$), ТЖСК ($p=0.2$), ТН% ($p=0.5$), феритин ($p=0.8$).



Фиг. 32. Параметри на желязната обмяна при носителите на HFE мутация в групата на НАСБ

Не намерихме връзка между присъствието на мутация в HFE гена и стойностите на чернодобрните ензими АСАТ ($p=0.6$) АЛАТ ($p=0.3$) ГГТ ($p=1$) и АФ ($p=0.3$)

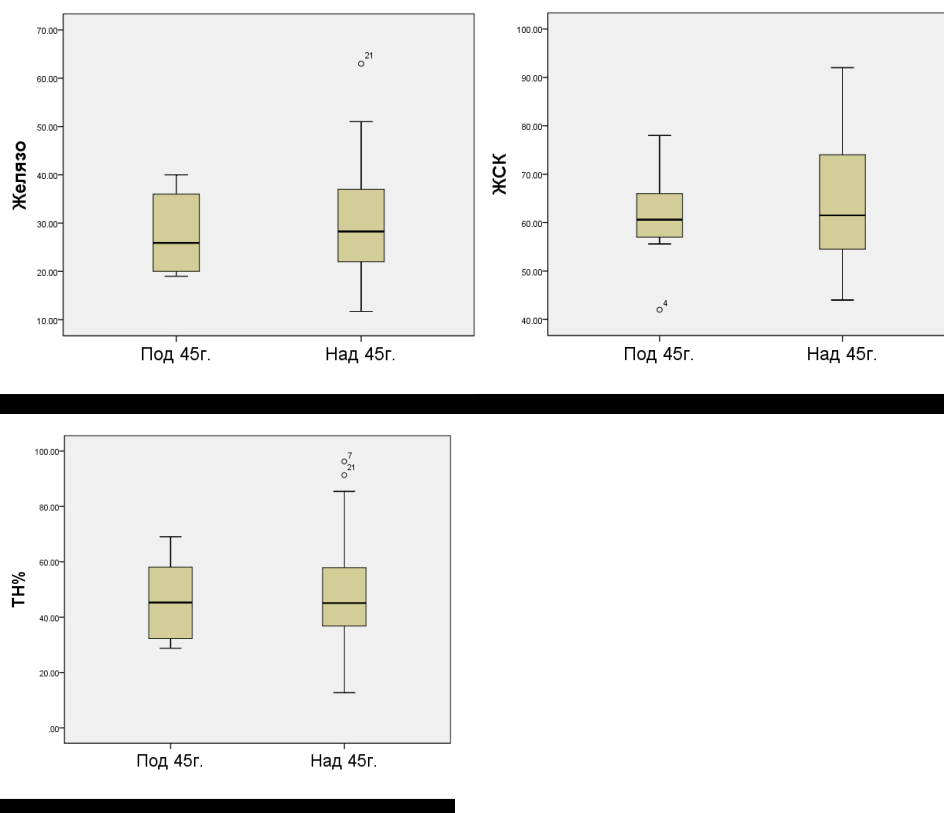
3.8 Връзка между стойностите на параметрите на желязната обмяна от една страна с възрастта, наличието на напреднала фиброза и цирроза

Статистическите показатели на желязната обмяна са отразени в табл. 27.

Таблица 27. Статистически параметри на показателите на желязната обмяна

Стойности	Желязо $\mu\text{mol/l}$	ЖСК $\mu\text{mol/l}$	ТН%	Феритин ng/ml
Средна	30.153	63.800	48.73	424.51
Медиана	28.500	61.500	46.31	456.00
Мода	20.0 ^a	58.0 ^a	33.33	90 ^a
Ст. отклонение	10.3825	12.3682	17.99	186.631
Минимална	11.7	42.0	12.71	90
Максимална	63.0	92.0	96.22	671

Не установихме разлика между отделните серумни маркери на желязната обмяна при изследваните лица и възрастта (под и над 45години) - серумно желязо ($p= 0,386$); ЖСК ($p=0,613$); ТН% ($p= 0,732$).



Фиг. 33. Параметри на желязната обмяна при лицата под и над 45г.

Не установихме връзка между отделните серумни маркери на желязна обмяна и наличието на ЧЦ– серумно желязо ($p= 0,14$); ЖСК ($p=0,460$); ТН% $p=0,179$. Установихме корелация между трансаминазите от една страна и от друга серумните показатели на желязната обмяна (феритин). Установихме 2 значими корелации между трансаминазната активност и показателите на желязната обмяна, детайлите са представени на табл.28

Таблица 28. Връзка между параметрите на желязна обмяна и чернодробни ензими

		Желязо	ЖСК	ТН%	
Сpearman-ро	ASAT	Коефициент на корелация	.487**	.233	.300
		Ниво на значимост	.002	.160	.067
	ALAT	Коефициент на корелация	.323	.460**	.090
		Ниво на значимост	.076	.009	.630
	GGT	Коефициент на корелация	.183	-.011	.211
		Ниво на значимост	.323	.954	.256
	АФ	Коефициент на корелация	.051	-.192	.091
		Ниво на значимост	.791	.309	.634

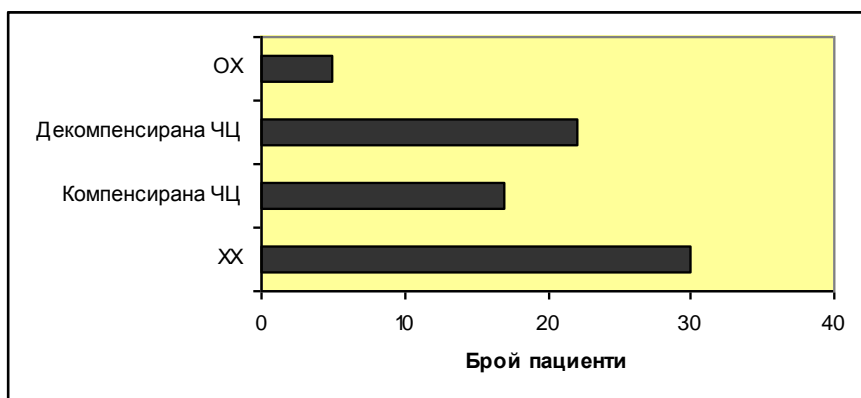
От гледна точка на хистологичните промени не установихме значима корелация между наличието на стеатоза и параметрите на желязната обмяна - серумно желязо $r=0,91$; ЖСК $r=0,38$; ТН $r=0,76$ при всички изследвани лица, както и поотделно в групата на хетерозиготите, така и в групата на пациентите без мутации.

Стойностите на показателите на обмяната на желязото не показаха значима корелация с наличието и стадия на фиброза – серумно желязо $r=0,92$; ЖСК $r=0,92$; ТН $r=0,82$ при всички изследвани лица, както и поотделно в групата на хетерозиготите, така и в групата на пациентите без мутации.

ЧАСТ 4. Болест на Уилсън

4.1 Спектър на чернодробната увреда при изявата на болестта на Уилсън

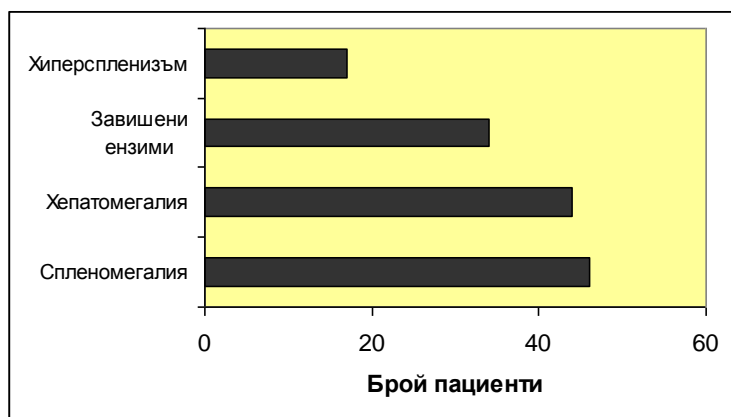
При поставяне на диагнозата 39 пациенти бяха с оформена ЧЦ, като при 17 болни беше в компенсирани стадий, а при 22 - в стадий на декомпенсация. Хроничен хепатит (включително и с напреднала фиброза) се установи при 30 пациента. Първата изява на заболяването при 5 пациента беше с остър хепатит (с придружаваща Coombs-отрицателна хемолитична анемия). Хронична HBV инфекция беше налице при 3 болни, а HCV - при 2. При една пациентка изявата на заболяването беше с картината на аутоимунен хепатит (завишен титър на ANA).



Фиг. 34. Спектър на чернодробното увреждане при болестта на Уилсън.

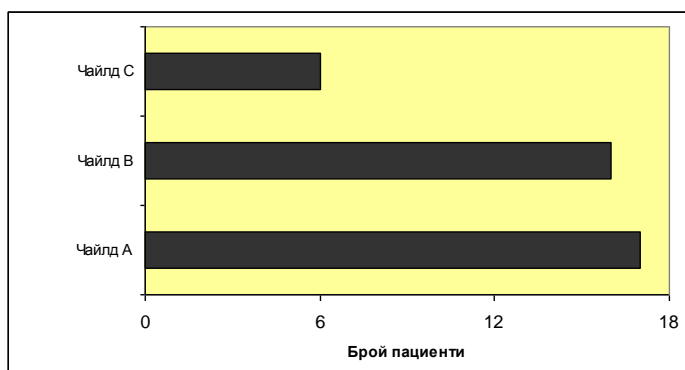
Най-честата клинична изява при пациентите беше спленомегалията, установена при 46 пациента, последвана от хепатомегалията - при 44. Завишени стойности на чернодробните ензими се наблюдаваха при 34. Прояви на хиперспленен синдром се

установиха при 17 пациента при поставяне на диагнозата. Чернодробна стеатоза беше установена при 23 болни.



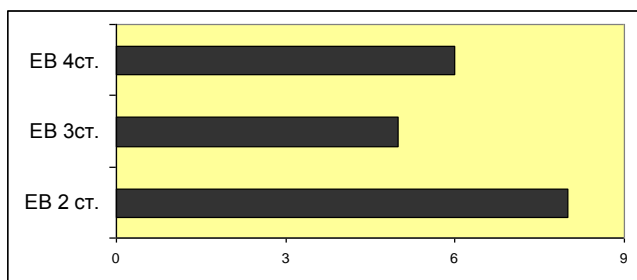
Фиг. 35. Физикални и лабораторни находки при поставяне на диагнозата.

При пациентите с болест на Уилсън с оформена ЧЦ, разпределението на тежестта на болестта според класа по Чайлд беше следното: 17 отговаряха на клас А; 16 бяха клас В и 6 - клас С (общо 22 пациента с декомпенсация на болестта). При 21 болни декомпенсацията на ЧЦ е била представена с оточно-асцитен сиднром, при 11 с иктер и при 11 с коагулационни нарушения.



Фиг. 36. Разпределение по Чайлд класификацията на пациентите с болест на Уилсън.

Оценката на степента на вариците на хранопровода беше извършена при 19 пациента с ЧЦ. При 8 пациента от тях се установиха езофагеални варици (ЕВ) 2 степен; при 5 от тях – 3 степен, при 6 от тях - 4 степен.



Фиг. 37. Степен на ЕВ при пациентите с болест на Уилсън.

4.2 Неврологично засягане и наличие на пръстен на КФ при изявата на болестта

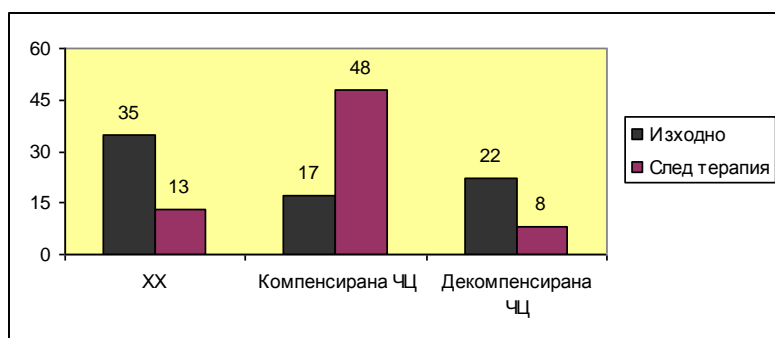
Неврологично засягане беше налице, при 45 пациента, а пръстен на Кайзер-Флайшер – при 50 (от общо изследвани 69 болни). Намерихме статистически значима връзка между едновременното присъствие на неврологичните симптоми и пръстена на КФ, $p=0.007$.

4.3 Прием на хелатори на медта и стойности на куприурията

В проследяването бяха включени общо 69 пациента. D-пенициламин беше прилаган при 72 пациента, а при други 2 – триентин. При 92% от пациентите се отчете системен прием на пенициламин в средна доза от 1025 мг. При 83% се наблюдаваха ефективни стойности на куприурията ($8.06 \pm 10.9 \mu\text{mol}/24\text{h}$).

4.4 Проследяване на тежестта на чернодробното заболяване на фона на терапия с D-пенициламин

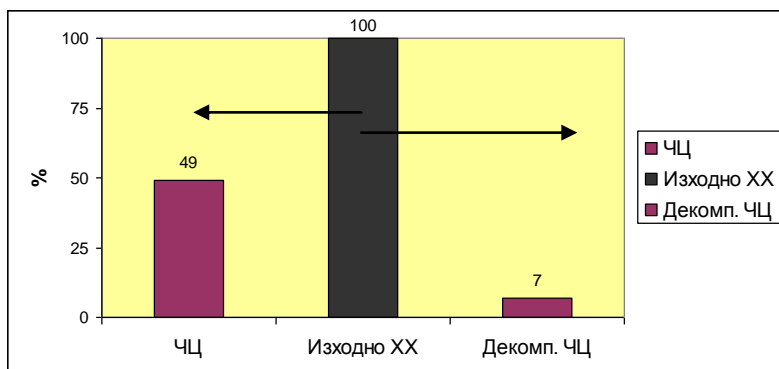
На фона на терапията мнозинството пациенти бяха в компенсирано състояние на чернодробната болест. При 13 се регистрира хроничен хепатит, а 47 бяха с компенсирана ЧЦ. Декомпенсирана ЧЦ беше налице при 8 пациента. При един от тях беше успешно извършена ортотопна трансплантация на черен дроб. Друг пациент с декомпенсирана ЧЦ бе също включен в списъка на чакащите.



Фиг. 38. Динамика на чернодробното увреждане на фона на терапия.

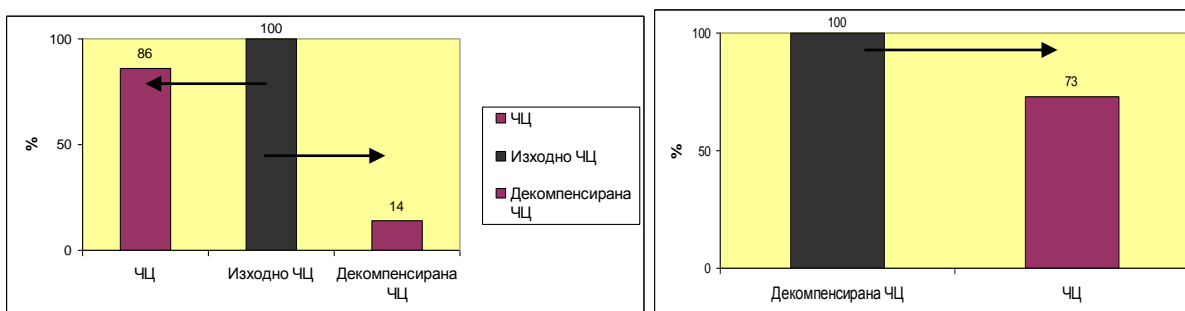
4.4.1 Прогресия на заболяването при пациенти с хроничен хепатит при изявата на заболяването

Остър и хроничен хепатит (XX) бяха първоначалните изяви на болестта при 35 пациента. За периода на проследяване в хода на провежданото лечение с D-пенициламин при около 52% от пациентите чернодробното увреждане прогресира до компенсирана ЧЦ, а при 7% до декомпенсирана чернодробна болест.



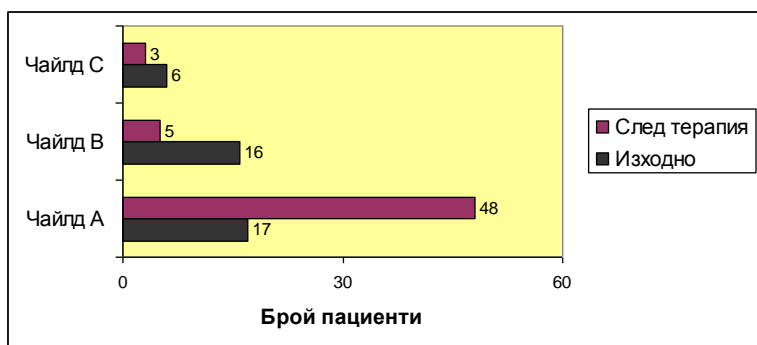
Фиг. 39. Прогресия на заболяването при болестта на Уилсън с изходна изява хроничен хепатит.

Компенсирана ЧЦ беше налична при 17 болни при поставяне на диагнозата. За периода на проследяване и в хода на провежданото лечение с D-пенициламин не се установи прогресия на болестта при 86% от пациентите, а при 4% болестта прогресира до декомпенсиран стадий. Декомпенсирана ЧЦ като изходна изява на болестта беше налична при 22 пациента. В хода на провежданото лечение 93% от тях преминаха в компенсиран стадий на ЧЦ.



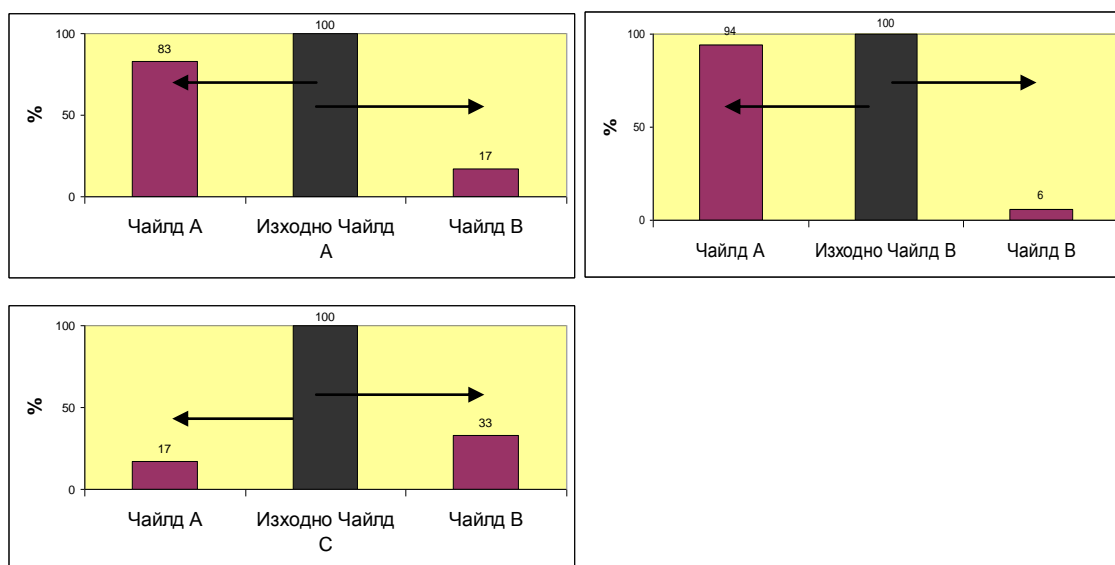
Фиг. 40. Прогресия за заболяването при начална изява с ЧЦ.

Разпределението на тежестта на ЧЦ оценена по Чайлд скор на фона на терапия с пенициламин беше следната: 48 пациента бяха Чайлд А; 5 - Чайлд В, а 3 - Чайлд С.



Фиг. 41. Разпределение на тежестта на ЧЦ по Чайлд на фона на терапия.

На фона на провежданата терапия при 83% от пациентите, които бяха изходно клас А по Чайлд (n=17) чернодробната болест остана в компенсирано състояние, а при 17% прогресира до декомпенсирана ЧЦ клас В по Чайлд. При пациентите, които бяха клас В по Чайлд при изявата на болестта (n=16), в 94% от случаите се наблюдава компенсирани на чернодробната функция. Болните, които бяха изходно клас С по Чайлд преминаха в Чайлд А при 17% от случаите и Чайлд в при 33% от случаите.

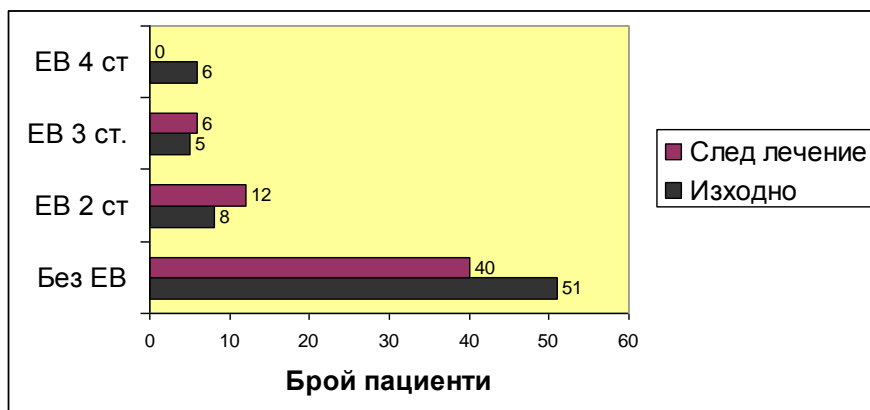


Фиг. 42. Динамика на тежестта на ЧЦ на фона на терапия.

4.4.2 Динамика на степента на вариците на хранопровода на фона на лечение

За периода на проследяване вариците на хранопровода бяха оценени при 58 пациента. При 2 беше извършена операция по Сугиура, а при 1 пациент беше проведено ендоскопско връзково лигиране на ЕВ. Кръвоизлив от ЕВ беше наблюдаван при 1

пациент. На фона на провежданото лечение при 41 пациента не се развиха ЕВ. Също така нямаше пациенти с високорискови ЕВ.



Фиг. 43. Прогресия на степента на ЕВ на фона на терапия.

4.4.3 Динамика на наличието на пръстен на Кайзер-Флайшер на фона на лечение

Редукция на пръстена на Кайзер-Флайшер се наблюдаваше при общо 20 болни на фона на приема на D-пенициламин.

4.5 Странични реакции и усложнения на фона на терапията

Наблюдаваните странични реакции бяха редки. При един пациент поради тубулопатия и тежка остеопороза се наложи прекъсване на лечението с пенициламин. При друг пациент след първото прилагане на пенициламин се наблюдаваше временна тежка неутропения. Бъбречни увреждания се наблюдаваха при 19% от болните на фона на лечение, най-често нефролитиаза, следвано от умерена протеинурия. Средните стойности на протеинурията на фона на терапия бяха 0.4 ± 0.2 г/24ч. Поради самоволно прекъсване на терапията при една пациентка се наблюдаваше тежко обостряне на неврологичната симптоматика, която доведе до трайна инвалидизация.

4.6 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

H1069Q на поне 1 алел, а 26 пациента са хомозиготи по тази мутация (44%).
Обобщените данни са представени на табл. 29.

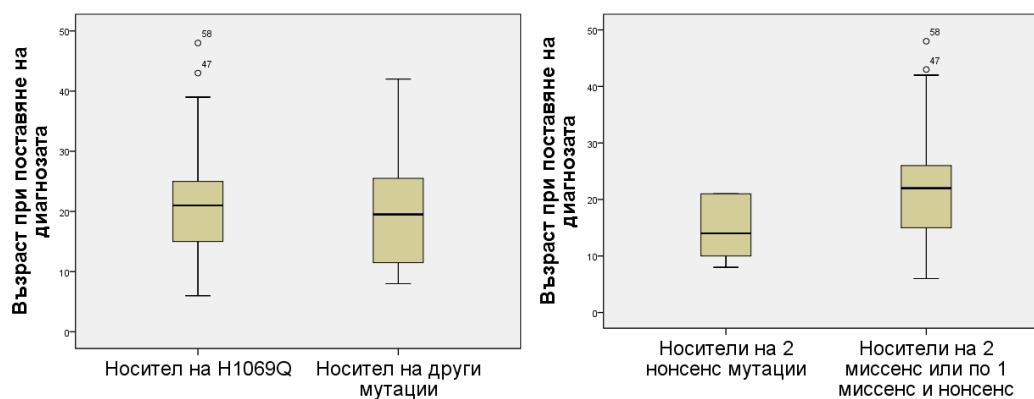
Таблица 29. Разпределение на мутациите при БУ

	H1069Q хомо- зиготи	H1069Q хетеро- зиготи	Носители на мутации, различни от H1069Q	Носители на 2 миссенс мутации	Носители на миссенс+ нонсенс мутации	Носители на 2 нонсенс мутации
Брой пациенти	26	13	20	43	8	8

4.6 Генотипно – фенотипни корелации – възраст на изява на заболяването

Не установихме статистически значима връзка относно възрастта на изява на болестта между пациенти носители на H1069Q и такива, при които тази мутация не се установява (средна възраст 21.6 ± 1.5 при носителите на H1069Q 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. 44. Средна възраст на изява при носителите на различни типове мутации.

4.7 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 ХХ, компенсирани и декомпенсирани ЧЦ при изявата и при проследяването на болестта между Н1069Q хомозиготите и останалите пациенти, $p=0.5$, $p=0.4$. Също така, не установихме връзка между изявата с и наличието при проследяване на ХХ, компенсирани и декомпенсирани ЧЦ при носителите на Н1069Q 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 - ХХ, компенсирани и декомпенсирани ЧЦ, $p=0.9$.

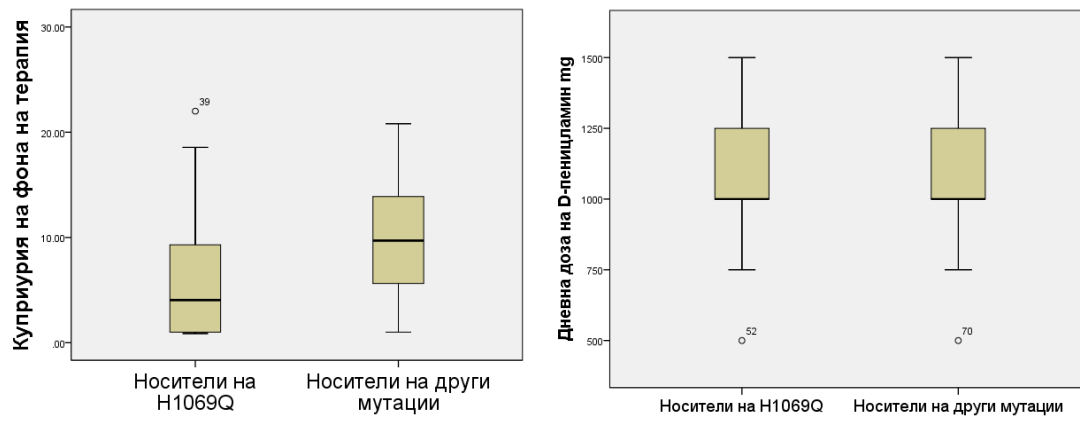
Генотип-фенотип корелации – наличие на неврологично засягане и пръстен на Кайзер-Флайшер при изявата на болестта

Носителите на Н1069Q ($n=39$) 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 $p=0.4$, $p=0.1$).

4.8 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. 45. Стойности на куприурията на фона на еднакви дози D-пенициламин при носителите на H1069Q.

VII. ОБСЪЖДАНЕ

ЧАСТ 1. Порфирии

Молекулярно-генетични находки при остра интермитентна порфирия

Молекулярно-генетичните находки при българските пациенти с остра интермитентна порфирия бяха разнородни, каквито са и данните от много други страни (198, 150). Три от единичните нуклеотидни замени, установени при българските пациенти с остра интермитентна порфирия се съобщават за различни етноси. Мутациите идентифицирани при семейства I-П1 (p.R26C) и IV-П4 (p.R149X) първоначално бяха описани при финландски болни (92). p.R26C порфирия вариетата оследствие е установена и сред славянското (86), испанското (176), френското (150), китайското (208) и венецуелското население (140). При изследване на група от 109 френски пациенти с остра интермитентна порфирия авторите са установили, че мутацията p.R149X е една от сравнително често срещаните (около 5%) (150). Доказано е, че остатъците R26 и R149 са разположени в джоба на ензима за свързване със субстрата и са от решаващо значение за ензимна активност (101, 69). Семейство IV е от особен интерес поради своя ромски произход. Ромите представляват най-голямото малцинство в България. В този смисъл търсенето на p.R149X мутацията при тази популация заслужава внимание.

При семействата VI-П6 и VII-П7 с остра интермитентна порфирия беше намерена идентична мутация - p.S96F в PBGD гена. Тя е описана за първи път от Kaupinnen и съавт. (92). Нямаше значима разлика в клиничната изява на двете пациентки. Болестта им се характеризираше само с един остър пристъп, най-вероятно отключен от хормонални промени през втората им декада. Наполседък пациентките са в клинична ремисия.

При семейства II, III и V бяха открити неописани досега единични нуклеотидни замествания в PBGD гена, които обуславяха фреймшифт и сплайсингова мутации. Малка инсерция (c.279-280insAT) и малка делеция (c.887delC) бяха идентифицирани при пробанди II-П2 и III-П3. Нуклеотидната промяна разкрита при семейството V-П5 (c.345-2A>C) засяга невариабилна сплайсинг акцепторна последователност AG и най-вероятно възпрепятства обработката на иРНК. На същата позиция, но различна нуклеотидна замяна (c.345-2 A> G) беше съобщена при шведски пациенти (61). 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> С мутацията е патогенна.

Молекулярно-генетични находки при потомство на болните с остра интермитентна порфирия

След откриване на специфичните мутации в семействата с остра интермитентна порфирия, наличните членове на семейството (n = 4 симптомни и n= 5 безсимптомни) бяха изследвани за носителство на установените мутации. Всички симптоматични роднини бяха носители на мутациите специфични за семейството. Измежду 5 асимптоматични индивиди, при 3 беше установено носителство на мутация: семейството II-Майка, VI-Дъщеря и VII-Дъщеря. Лицето от семейство II-Майка беше жена в менопауза със съпътстващ захарен диабет тип II. Активност на PBGD в еритроцитите при нея беше ниска. Дори при лекуван ЗД, най-вероятно леко повишените серумни нива на глюкоза са оказвали защитно действие срещу изява на заболяването (22). Лицата от семейства VI-Дъщеря и VII-Дъщеря бяха на възраст към момента съответно 21 и 15 години. Активността на PBGD в еритроцитите при тях не е налична, но те бяха носители на еднаква мутация. Този факт улеснява консултирането на пациентите с цел предотвратяване на остри кризи. Стойностите на PBGD бяха в референтни граници при 4 от лицата, които не бяха носители на мутация, а при другите 2 случая не бяха налични.

Молекулярно-генетични находки при порфирия вариегата

При по-голямата част от нашите пациенти порфирия вариегата се проявяваше само с тежка фотодерматоза, а често тя придружаваше и порфиричния простъп. Честота на тези находки беше подобна на тази съобщава при пациенти с порфирия вариегата в Южна Африка и Западна Европа (199).

Общо 3 различни неописани до момента единични нуклеотидни промени в PPOX гена отговорен за порфирия вариегата бяха налични при всичките 6 семейства. Те представляваха 2 мисенс мутации (p.L306P и p.C418R) 1 малка делеция (с.441-442delCA). Остатъците L306 и C418 са разположени в силно консервативния FAD-

свързващ домен (151), и тези АК промени най-вероятно нарушават това взаимодействие. Скората по HumVar със стойност 1.00 за p.L306P и 0.921 за p.C418R предсказва, че тези мутации са патогенни. В кодон 306 е описана малка делеция (c.916_917delCT) от Wilman и съавт. (202), а в кодон 418 досега не са докладвани мутации.

Молекулярно-генетични находки при потомството на болни с порфирия вариегата

Наличните членове на семействата с порфирия вариегата (n= 3 симптоматични и n=7 безсимптоматични) бяха изследвани за носителство на съответната нуклеотидни промени, подробна информация е отразена в Таблица 2. Индивидите с клинични симптоми III-Син, IV-Дъщеря и V-Сестра, бяха носители на специфичните за семейството нуклеотидни промените. Лицето III-Син беше с остър пристъп, последван от хронични неврологични симптоми и кожно ангажиране. Лабораторните находки при него бяха повишени нивата на ПБГ, ДАЛК, на общите порфирины в урината и изпражненията. Лицето IV-Дъщеря страдаше само от кожни лезии. При нея имаше пик на 626 нм при скениране на нативна плазма, нормални ПБГ и ДАЛК нива, обуславящи липсата на остри симптоми и повишени нива на порфирините в урина и изпражнение. Симптоматиката при лицето от семейство V-Сестра се изразяваше в порфиричен простъп и кожни лезии, но нивата ПБГ и ДАЛК, показани в табл.11 бяха измерени след възстановяване от кризата и бяха в границите на нормата. Въпреки това, пикемисионния пик на 626 нм при сканиране на нативна плазма и повишените общи порфирины в урината се наблюдаваха дори и това. Измежду 7-те безсимптомни индивиди при 4 - I-Дъщеря, II-Син, IV-Син и V-Племенница се установи носителство на специфичните за семейството ДНК промени. Биохимичните данни на подрастващи индивиди I-Дъщеря и V-Племенница не бяха налични. Индивидите от семейства II-Син и IV-Син имаха нормални стойности на общите порфирины в урината и изпражненията и такива на ПБГ и ДАЛК. Сканирането на нативна плазма също не показва отклонения при двете лица. Тези резултати могат да се очакват предвид факта, че значението на емисионния пик на 626 нм в плазмата е частично ограничено при безсимптомните носители в напреднала възраст (IV-Син). Пикът обикновено отсъства и при асимптоматични деца (II-Син) (85). За съжаление, активността на PPOX не беше измерена, за да се докаже съпадението на присъствието на мутации с ниските нива на

ензимната активност. Все пак са необходими и допълнителни функционални изследвания, за да се потвърди патогенността на тези промени.

По-голямата част от пациентите с порфирия вариегата произхождат от 2 ендемични области. 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 вариегата там споделят р.С418R 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. Ендемична представяне на семейства с порфирия вариегата и разпределението на съответните нови мутации също подчертават патогенния им ефект.

Молекулярно генетичен дефект при болната с вродена копропорфирия

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.

Заклучение

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 ОП чрез избягване на добре познатите екзогенни отключващи фактори.

Молекулярно-генетични находки при порфирия кутанеа тарда

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 p.Q206X в екзон 6 (38). 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. Най-вероятно продуктът, при който липсват оставащите 161 аминокиселинни остатъка, е нестабилен белтък, който се подлага на протеолитично раграждане. Общо 3 кръвни родственика безсимптомни към момента се оказаха носители на мутацията. Нейното наличие при 4 от всичко 5 неподбрани болни, нямащи роднински връзки, е от несъмнен интерес. Дали този факт може да се окаже ефект на основателя? Последният е налице при 2 отделни групи български пациенти с порфирия вариегата (4). Разбира се необходими са изследвания на по-голям брой лица, за да се изрази категорично такова становище. Евентуалното потвърждаване на високата честота на тази мутация би улеснило значително молекулярно-генетичното изследване при порфирия кутанеа тарда у нас.

Другата миссенс мутация V134Q, установена при 1 пациент, също е вече описвана. Meguro и съавт. (111) я съобщава 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 T399G400T401 се заменят с САА. Първият единичен нуклеотиден полиморфизъм с.399T>C не води до промяна в кодирания аминокиселинен остатък (ТАТ> ТАС). Следващите две единични нуклеотидни замени с.400G>C и с.401T>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. Енимната 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 (144). Двамата родственика на изследвания пробанд не бяха носители на мутацията и в екзон 5 при тях не се намериха SNPs, което насочва, че трите единични нуклеотидни промени се намират върху 1 алел.

Броят на носителите на UROD мутации, т.е. на лицата с порфирия кутанеа тарда беше по-малък от този на болните със спорадична порфирия кутанеа тарда, което съответстваше на очакванията ни. Прилагайки определяне на активността на UROD в

еритроцитите при 106 болни с порфирия кутанеа тарда, Аджаров (3) е установил 26 пробанда (25%) с фамилна порфирия кутанеа тарда. Различни доклади представят честота на фамилната форма от 24% сред порфициите в Дания до около 50% сред тези от Чили (148).

Прави впечатление наличието на по-млади хора между болните с фамилна порфирия кутанеа тарда. Върху по-голям контингент пациенти е установено, че 27% от болните с тази форма у нас са под 30 годишна възраст (срещи едва 6% при спорадичната порфирия кутанеа тарда), а 42% са под 35 години (срещу само 11% при спорадичната порфирия кутанеа тарда).(3)

Диагностични различия между фамилната и спорадичната форми

При всички болни бяха налице споменатите вече отключващи фактори на заболяването, но с изключение на 1 болен с фамилна порфирия кутанеа тарда, който употребяваше системно алкохол, при останалите носители на мутации в Уро Д, нямаше драстично действащи нокси. При дефектен ензим обаче дори нередовната у умерена употреба на алкохол е достатъчна за клиничната изява на заболяването. При спорадичната порфирия кутанеа тарда влиянието на екзогенните фактори (алкохол+НСV) беше много по-силно. Безспорно това е и причината за по-изразените ехографски изменения при спорадичните случаи, някои от които бяха развили ЧЦ през четвъртото десетилетие (номера 7 и 10). Промените в порфириновата обмяна не разкриха различия между двете форми на порфирия кутанеа тарда. Ексцесивните увеличения на порфирините в урината и плазмата са от сходен порядък при фамилната и спорадичната порфирия кутанеа тарда. Същото се отнася и за желязото. ТН беше повишено или горно-гарнично при 11 от 13 болни. Следователно биохимичните резултати не предлагат различия между фамилната и спорадичната порфирия кутанеа тарда.

Оптималната диагностика на всеки новооткрит порфирик е желателно да включва и молекулярно-генетичен анализ. Той е полезен не толкова за самия болен, тъй като лечението на двете форми на порфирия кутанеа тарда е едно и също, а в по-голяма степен за неговите роднини с оглед своевременно установяване на латентна фамилна порфирия кутанеа тарда. Поради значително по-малката честота на фамилната форма е препоръчителен известен подбор на пациентите, т.е. да се прецени при кои от тях търсенето на генни мутации е наложително. Настоящото проучване цели да долови

тенденциите в различията между двете форми, с което да се характеризира по-добре предполагаемия болен с фамилна порфирия кутанеа тарда. От клинична гледна точка видими различия между двете форми имаше при следните показатели: 1. възраст на поява на заболяването, 2. продължителност и степен на въздействие на основните отключващи фактори и 3. тежестта на чернодробното увреждане. Болните с фамилна форма обикновено са в по-млада възраст, при тях по-рядко се установява продължително и драстично въздействие на екзогенни фактори, а чернодробното увреждане не е много напреднало. Разбира се тези критерии са ориентировъчни, тъй като понякога се срещат отклонения от горната характеристика (напр. възрастта на пациенти 3, 4, 9 и 10 и системната употреба на алкохол при 2). Предложената точкова система улеснява оценката относно необходимостта от извършването на молекулярно-генетичен анализ. Скорове над 6 с голяма вероятност подсказват спорадична форма и не налагат генетично изследване.

Молекулярно-генетични находки при еритропоеична протопорфирия

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 (SM040219 код 84). 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 код 84). 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

полиморфизма в FESN гена, което доказва унаследяването в позиция транс на двете нуклеотидни промени.

ЧАСТ 2 и 3. Хемохроматоза и хронични чернодробни заболявания със съпътстващ синдром на претоварване с желязо

Молекулярно-генетични находки при хемохроматоза

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 в гена за хемоювелин HFE2 в хомозиготно състояние p.G320V. Тази мутация е описана за пръв път от Paranioulau и съавт. (138) при семейства от гръцки произход, едно канадско и едно френско семейство с ювенилен тип хемохроматоза с неоткриваеми нива на хепсидина при всички в урината. Освен това, тази мутация е била открита и при пациенти от други части на Европа, както и у обитаващи разнообразни географски райони, чието население е в голяма степен с европейско потекло като САЩ, Австралия, Канада. Въз основа на това се счита, че G320V мутацията е най-честата мутация в европейската популация при пациенти с ювенилна хемохроматоза тип 2а. Впоследствие при отделни семейства са описани и други патогенни мутации в HFE2 гена, т.нар. „частни мутации”, основно при пациенти от Азия и Тихоокеанския басейн (110).

Патогенният ефект на G320V мутацията беше доказан от Silvestri и съавт. (165). Авторите изследват биосинтезата и матурацията на 5 транскрипта на хемоювелина, съдържащи миссенс мутации (една от които е била G320V) с цел да изучат патогенезата на ювенилната хемохроматоза и да характеризират функционалните свойства на хемоювелина. След прилагането на сложни биохимични техники авторите установяват, че транскриптът носещ G320V мутацията, която се намира в С-края на пептида, е с нарушено гликозилиране и следователно нарушена конформация на протеина. Това води до невъзможността той да бъде автокаталитично разцепен. 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 и съавт. (56). Тази мутация е най-честата, причиняваща хемохроматоза в северно европейските народи, понеже е с „келтски произход”. Алелната ѝ честота в споменатите европейски региони е около 6.2%, но паказва изразена градация от юг към север. От алелната честота може да се изчисли честотата на генотипа на хомозиготите, който е около 0.38%. Това означава, че 1 на 260 индивида в европейското население са хомозиготи по мутацията (според уравнението на Хайди-Вейнберг). Въпреки това, този факт се отнася предимно за пациенти от Северна Европа и е от основно значение за бързото молекулярно-генетично потвърждаване на диагнозата при тях. При популациите от Южна Европа алелната честота е между 0 и 3.2% (54). При изследване на екзон 4 на HFE гена при 100 здрави доброволци от български произход Ivanova и съавт. (88) не установява наличие на 282Y алела, т.е. може да се предположи, че честотата в нашето население клони към 0%, или е много ниска. За сметка на това около 80,6% от европейците, страдащи от хемохроматоза са хомозиготи по C282Y (54), което напълно оправдава целенасоченото търсене на тази мутация за поставяне на диагнозата. Това беше осъществено като първоначална стъпка и при нашия пациент. Липсата на тази честа нуклеотидна замяна обаче не изключва диагнозата хемохроматоза особено в южните народи, а налага по-задълбочено изследване на гените отговорни за желязния метаболизъм.

H63D се счита за „второстепенния” вариант на HFE гена. Той е с по-висока честота при пациентите с хемохроматоза в сравнение с общата популация. Алелната му честота не показва такова различие спрямо географския район на изследваното население и се движи около 14%, т.е. представлява сравнително чест SNP. Около 5.3% от пациентите с хемохроматоза в Европа са сложни хетерозиготи по C282Y/H63D мутациите. Смята се, че хомозиготността по H63D мутацията сама по себе си не е достатъчна генетична предпоставка за развитие на клинична картина, свързана със синдрома на претоварване с желязо (54). Ако се установи хомозиготно носителство на тази мутация със съпътстваща хиперферитинемия, най-често са налице и други фактори. Освен това то не отразява и точно степента на отлагане на желязо в тъканите. (163). При популационно изследване при кръвни донори авторите установяват, че хомозиготността по H63D мутацията се свързва с повишено ТН (89).

Категорични данни относно патогенността на този сравнително чест полиморфизъм не са открити. Проучването на Waheed и съавт. (192) доказва, че за

разлика от C282Y, H63D транскрипта се свързват правилно с бета2-микроглобулина. Синтезата, вътреклетъчната обработка и експресията върху клетъчната мембрана при мутантния транскрипт и дивия тип не се различават съществено. Въпреки тези нормални функционални характеристики авторите считат, че повишената честота на този алел при пациенти с хемохроматоза допринася за развитието на претоварване с желязо, особено и при сънаследяване с класическия алел C282Y. Въпреки че 63D остатък се намира в неконсервативен по своята нуклеотидна последователност участък при молекулите от HLA-H семейството, той е разположен в близост до полипептид-свързващата кухина в ензима (в алфа2 домейна). Авторите предполагат, че H63D мутацията в HFE протеина намалява афинитета му към лиганда вътреклетъчно или на клетъчната повърхност. Категорични доказателства подкрепящи тази хипотеза не са установени, което към момента подсказва, че H63D варианта е по-скоро рисков фактор за повишени показатели на жлезната обмяна, отколкото патогенна мутация.

Два интронни полиморфизма бяха установени в HFE гена при нашите пробанди, съответно с.340+4T>C в интрон 2-3 и с.1007-47G>A в интрон 5-6 (както в хетерозиготно, така и в хомозиготно състояние). Те представляват сравнително чести варианти. Внимание заслужава с.340+4T>C полиморфизма, понеже има предположения за патогенния му ефект върху HFE протеина. Floreani и съавт. (60) предполагат че липсата на екзон 2 при снаждането на протеина може да се дължи на този полиморфизъм когато се сънаследява с S65C мутацията (друга мутация, която се установява по-често при пациенти с хемохроматоза, но при нашите пробанди не беше открита) и го свързва с клиничен фенотип на хемохроматоза при изследваното от тези автори семейство. Други автори обаче са отхвърлили тази хипотеза, тъй като този полиморфизъм е много често срещан и в общата популация и са доказали, че с.340+4T>C е неутрален що се касае до риска от развитието на клинично проявена хемохроматоза (39,43).

Единичните нуклеотидни замени с.1851C>T[A617A] и с.2085G>C [S695S], установени в екзоните на TfR2 и съответно с.663T>C [V220V] в SLC40A1 гена обуславят синонимно кодиране и не се очаква да влияят на белтъчната структура и функция. Освен това не са разположени в началото или края на екзона и не би следвало да оказват ефект върху снаждането на екзоните, т.е. представляват неутрални SNPs.

В същите тези два гена се установиха и интронни полиморфизми. Бе описана за пръв път една малка инсерция в хетерозиготно състояние с.1996-110insCA в интрон 17-18 на TfR2 гена. Предполага се, че този полиморфизъм е неутрален. Намериха се и два

известни, най-вероятно бенигнени интронни SNPs в SLC40A1 гена, а именно с.44-24G>C в интрон 1 и с.112+147A>G в интрон 2.

Клинично протичане на хемохроматозата

Клиничната картина на нашите 4 пробанда отговаря напълно на хода на болестта при ювенилна хемохроматоза. Първата изява на заболяването е на около 35г. при нашите пациенти, но при вече оформена ЧЦ (компенсирана), а при 2 от случаите с прояви на СН. Също така менопауза е била налице при пациентките средно поне 5 години преди поставянето на диагнозата, т.е. налице е забавяне в диагностицирането на ювенилната хемохроматоза в България. В сравнение при П5 с класическа С282У HFE-хемохроматоза, изявата на болестта е към 5-тата декада без значими клинични оплаквания освен леко завишени трансаминази. По литературни данни ювенилната хемохроматоза се изявява от юношеска до към 20 - 30г. възраст най-често с хипогонадизъм (в 96% от случаите), репродуктивни затруднения и/или кардиомиопатия (в около 35%) (44). Трябва да се отбележи, че 3 от пробандите (освен П2) имат потомство родено през 20-тата декада. Най-вероятно само една от пациентките е засегната от репродуктивни неуспехи в млада възраст. Две от пробандите П2 и П3 са сестри и носят един и същ генетичен терен за развитие на хемохроматоза (двойни хомозиготи по G320V в HFE2 гена и H63D в HFE гена). Въпреки това, съществуват различия във фенотипната изява на болестта при тях: пълно разгръщане на клиничната картина с дилатативна кардиомиопатия, аменорея и хипогонадизъм при едната и липсата на значими клинични симптоми (освен ранна менопауза, и то след създаване на потомство) у другата. Най-вероятно други гени–модификатори играят роля за тежестта на фенотипната проява при ювенилната хемохроматоза. Двата пола са еднакво засегнати от ювенилния тип за разлика от класическата хемохроматоза, където преобладава мъжкия пол, но в нашето скромно като брой участници изследване всички пациентки с ювенилна хемохроматоза са от женски пол.

В нашия университетски център за периода от последните 20 години освен гореописаните 4 пациентки с ювенилен тип и 1 болен е с класическия тип 1 хемохроматоза е диагностицирана още една пациентка, която е била сложен хетерозигот по С282У/Н63D мутациите в HFE гена (при целенасочено изследване на мутациите само в този ген). Тя е починала през 90-те години от метастатичен рак на млечната жлеза. Така пациентите с класическа хемохроматоза представляват 1/3 , а тези

с ювенилен тип – 2/3 от лекуваните и диагностицирани хемохроматози за този доста дълъг период от време. 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.

Молекулярно-генетични находки при потомство на болните с хемохроматоза

Точната молекулярна диагноза при пациентите с хемохроматоза позволи ДНК анализ в потомството им. По отношение на патогенната мутация в HFE2 гена, отговорен за ювенилната хемохроматоза тип 2а, изследваните 4 потомци са хетерозиготи, което при автозомно-рецесивното унаследяване означава практически здрави. Дъщерите на ПЗ обаче са и хетерозиготи по H63D в HFE гена, т.е те са двойни хетерозиготи по описаните мутации. Рискът от фенотипна изява при тях е нисък, но не са изключени леко завишени показатели на желязната обмяна.

Наличие и честота на HFE мутациите при пациенти с хронични чернодробни заболявания със съпътстващ синдром на претоварване с желязо

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. Предполага се, че мутациите в HFE гена и по-специално C282Y мутацията, дори в хетерозиготно състояние може да допринесе за натрупване на желязо в черния дроб (чрез увеличената му абсорбция). Чрез повишения оксидативен стрес това може да причини по-тежко чернодробно увреждане (30,164,79,193). Предположението е добре аргументирано при порфирия кутанеа тарда, където доста проучвания доказват по-високи честоти на мутациите в HFE гена в сравнение с общото население (30, 164, 193, 52, 95). Това, обаче не е толкова ясно при пациенти с хронични чернодробни болести като хроничните хепатити С и В и НАСБ, където са съобщени доста противоречиви резултати (164, 193).

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 (88, 189). Това съответства с литературните данни за географското разпределение на HFE мутациите в Европа (54). Както вече беше споменато при южните европейски народи честотата на C282Y клони към 0%, а тази на H63D се движи между 15 – 19%. При българското население тя надхвърля 20% и може да се очаква, че този SNP би бил по важен при развитието на синдрома на претоварване с желязо, въпреки по-мекия си ефект. Все пак, при нашите порфирици порфирия кутанеа тарда също не се асоциира с нито една от мутациите в HFE гена (88, 189). Може би подобно на находките при българските болни с хемохроматоза, полиморфизми в другите поредки гени, отговорни за желязната обмяна играят роля при появата синдрома на претоварването с желязо.

Клинично значение на HFE мутациите при пациенти с хронични чернодробни заболявания със съпътстващ синдром на претоварване с желязо

В нашето проучване наличието на поне 1 мутация в HFE гена не показваше връзка със серумните нива на желязото, феритина, и ТН. Установиха се статистически значимо по-ниски стойности само на ЖСК в групата на носителите на поне 1 мутация. При тях завишеното серумно желязо може да се дължи на етиологията (НСV, HBV, НАСХ, ПБЦ, Порфирия кутанеа тарда) на чернодробното увреждане, но най-вероятно носителството и на мутация обуславя значимо по-ниските стойности на ЖСК и по-високото ТН (по подобие на желязната обмяна при хемохроматозата, която се характеризира с високи стойности на желязо, ниски стойности на ЖСК и почти 100% ТН). Доколко това обаче съответства на степента на натрупване на желязо в черния дроб и тежестта на фиброзата е спорно, понеже носителството на мутация в HFE гена не показва връзка със стойностите на чернодробните ензими и с наличието на напреднала фиброза и цирроза. Присъствието на мутация в HFE гена също така не се свързва и с един от признаците на хемохроматоза, наличието на ЗД в изследваните от

нас лица. Доста по-вероятно е диабетът да се обуславя от други, най-вече метаболитни фактори.

В нашето проучване не се установиха носители на мутация при пациентите с HBV инфекция. Някои проучвания не съобщават за връзка между мутациите на HFE гена и серумните стойности на показателите на желязната обмяна, както и с тежестта на сидерозата при пациенти с хроничен хепатит В (103). Други автори обаче са установили, че H63D мутацията в HFE гена е свързана с напреднала фиброза и прогресията към чернодробна цироза (102, 95). При друго изследване само при болните от мъжки пол се наблюдава по-висока степен на сидероза при C282Y хетерозиготите, както и корелация между H63D мутацията и серумните показатели на синдрома на претоварване с желязо само при пациентите от мъжки пол (147).

Носители на поне 1 мутация в HFE гена бяха 8 пациента с HCV инфекция и синдром на претоварване с желязо. В тази подгрупа не намерихме връзка между наличието на мутация от една страна и стойностите на индексите на желязната обмяна и чернодробните ензими от друга. При болните с хроничен хепатит С няколко автори са установили по-висока честота на HFE мутациите в сравнение с общото население (31, 167). Други автори, които установяват че HFE полиморфизмите не са по-чести при тези пациенти изтъкват че или пациентите с HCV носители на някоя мутация в HFE гена се характеризират с по-високи параметри на желязна обмяна или хетерозиготното носителство на някой HFE полиморфизъм е независим рисков фактор за прогресия на чернодробното увреждане (135, 53, 66, 67, 181) или липсва връзка между C282Y и H63D мутациите и хепатосидерозата (46, 83, 124, 166, 173). Наскоро мета-анализ, включващ 202 проучвания върху HFE генотипа и общо 66 263 случая и 226 515 контроли доказва връзка между HFE мутациите и хроничния хепатит С (odds ratio 4.1) (52).

Установихме 1 сложен хетерозигот, 1 хомозигот и 4 хетерозигота по H63D мутацията измежду пациентите с НАСХ. Наличието на мутация в HFE гена не показва връзка със серумните показатели на желязния метаболизъм и чернодробните ензими при нашите пациенти. Разнопосочни резултати са съобщени относно честотата на HFE мутациите при пациентите с НАСБ. Авторите на мета-анализ от 2011г., целящ да потвърди честотата на HFE полиморфизмите и особено на C282Y хомозиготите и сложните хомозиготи с H63D при пациенти с НАСБ от бялата раса, изследват общо 2610 случая и 7298 контролни лица. Резултатите отхвърлят възможна връзка между честотата на HFE мутациите и наличието на НАСБ (82). Някои автори съобщават за

връзка между наличието на C282Y или други полиморфизми в HFE гена и по-тежкото чернодробно увреждане (125, 182). Други обаче не откриват влияние на мутациите в този ген. Vanelli и съавт. (183, 184) показват, че въпреки че HFE мутациите повишават риска от интрапаренхимно натрупване на желязо в хепатоцитите, те не са свързани с тежестта на фиброзата, най-вероятно поради слабата асоциация между хепатоцелуларното натрупване на желязо и наличието на HFE мутации. Това може да се обясни с факта, че пенетрантността на HFE мутациите, дори и в хомозиготно състояние, е много ниска и само между 1% до 20% от индивидите развиват болест, свързана с натрупване на желязо (206). В този смисъл трудно би могло да се очаква хетерозиготите по „по-леките“ мутации или сложните хетерозиготи да повлияят съществено чернодробното увреждане (13). Налице са разнопосочни резултати относно типа на натрупване на желязо в чернодробната тъкан и ефекта му върху тежестта на фиброзата; едни автори установяват предимно интрапаренхимното като рисков фактор за прогресия на болестта (183), а други не-паренхимното (126).

Все пак, установихме 2 сложни хетерозигота C282Y/H63D с известна етиология (ПБЦ и НАСБ) 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 (54). Въпреки това през последните години редица автори считат, че той отговаря по-скоро на представата за рисков фактор (самостоятелно не би повлиял появата на болест). В подкрепа на това Gurrin и съавт. (78) демонстрират в едно проспективно проучване, че честотата на повишеното ТН% е значимо по-висока при сложните хетерозиготи в сравнение с индивидите, които не носят тези мутации. Изходните средни стойности на ТН и тези при проследяването на пациентите обаче остават в референтни стойности. Авторите не са могли да определят наличието на други коморбидни фактори при сложните хетерозиготи по C282Y/H63D със съпътстваща хиперферитинемия. В друго проучване Walsh и съавт. (194) демонстрират, че сложните хетерозиготи, които са били с клинични прояви са имали значително по-високи стойности на параметрите на желязна обмяна в сравнение със сложните хетерозиготи, които са били открити при фамилен анализ. Авторите допълват, че при всички носители на C282Y/H63D със съпътстваща хиперферитинемия се установяват други рискови фактори, като алкохолна консумация и затлъстяване. Установено е, че при C282Y хетерозиготите, с по-тежка хепатосидерозата е по-вероятно да се открият „частни“ мутации на втория HFE алел (16, 104), а при C282Y хетерозиготите без

доказана хепатосидероза вторичните причини за хиперферитинемия са чести (104). В друго проучване при кохорта от 325 пациенти, лекувани с кръвопускане, авторите показват, че честотата на С282У хомозиготите е значително по-висока в сравнение с тази на сложните хетерозиготи (154). И при тези болни значително по-често се установявали коморбидни фактори. Не на последно място, че при сложните хетерозиготи е налице в по-лека степен на хепатосидероза (оценена чрез количеството отстранено желязо (г) до достигане на лек железен дефицит, и нивата на ТН) (142). Освен тези клинични доказателства трябва да се има предвид, че Н63D алела на ниво протеин не променя структурата на HFE, за разлика от С282У, който нарушава асоциацията с бета2 микроглобулина и експресията на клетъчната мембрана.

Два от пациентите (с HCV инфекция и НАСБ) бяха хомозиготи по Н63D мутацията, която най-вероятно допринася за синдрома на свръхнасищане с желязо. Както беше обсъдено в главата за хемохроматоза, данните сочат, че тази мутация е фактор, който повлиява серумните стойности на показателите на желязната обмяна (107, 89, 72, 23, 142, 143). Phatak и съавт. (143) установяват, че при хомозиготите по Н63D са налице значимо по-високи стойности на ТН (но все пак в нормални граници) в сравнение с дивия тип. Gochee и съавт. (72) намират статистически значимо повишени нива на ТН% в около 15% от Н63D хомозиготите и 12% от хетерозиготите от мъжки пол в сравнение с 5% при дивия тип. Проучването HEIRS (80) също намира завишените стойности на ТН и феритин (макар и близо до референтните стойности) при сложните хетерозиготи и Н63D хомозиготите. Дали повишените параметри на обмяна на желязото отразяват натрупването му в черния дроб и развитието на болест е спорно, но резултатите са в полза на изключително ниската пенетрантност на Н63D хомозиготите (26). По тази причина доста автори считат, че за развитие на клинично значимо заболяване, дължащо се на претоварване с желязо са нужни и допълнителни фактори като алкохол затлъстяване и др. (23, 26). При 2 пациенти с HCV инфекция установихме хетерозиготност по S65С мутацията. Тя има значение за натрупване на желязо в тъканите основно ако е унаследена в транс с С282У мутацията (54), какъвто ние не установихме. При нашите болни S65С полиморфизмът беше унаследен заедно с с.340+4Т>С полиморфизма (в хомозиготно и хетерозиготно състояние). Floreani и съавт. (60) предполага че липсата на екзон 2 при снаждането на HFE протеина може да се дължи на полиморфизма с.340+4Т>С, когато той се сънаследява с S65С мутацията. Авторите го свързват с клиничен фенотип на хемохроматоза при изследваното от тях семейство. Други изследователи обаче отхвърлят тази хипотеза, тъй като този

полиморфизъм е много често срещан и в общата популация и са доказали, че с.340+4Т>С е неутрален относно риска от развити на хемохроматоза (39, 43). Още един интронен полиморфизъм беше установен в HFE гена с.894+47G>А , но най-вероятно с неутрален ефект.

Мутации в HFE2, HAMP, TfR2 и SLC40A1 гените и клиничното им значение при пациенти с хронични чернодробни заболявания и синдром на свръхнасищане с желязо

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 С282Y/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 цироза 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 и съавт. 2001. Установен е при 2 от 23 пациента с хемохроматоза, но също така и при 9 от 65 здрави контроли (108, 97, 99, 115). Според авторите на проучване на TfR2- свързаната хемохроматоза, този рядък полиморфизъм има модифицираща роля при фенотипната изява на болестта (Biasotto 2003). Категорични доказателства за патогенната роля на R752H няма и ефектът му остава неясен. PolyPhen-2 софтуерът предсказва патогенен ефект за миссенс мутация. Все пак унаследяването с хетерозиготна S65C мутация може би допринася за значително повишените стойности на ТН (до 85%) и тъмния бронзов цвят на кожата при тази пациентка.

Друг пациент с хроничен хепатит С беше двоен хетерозигот H63D+/- в HFE гена и с.98-6С>Т+/- 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 и съавт. (99) при пациенти с фенотип на синдром на претоварване с желязо, като алелната му честота е била 2.03%. Авторите са установили, че този полиморфизъм е най-честата вариация в ДНК последователността на HFE2 гена. Ролята му върху обмяната на желязото е спорна. Това предположение се

потвърждава и от голямо проучване, включващо 136 хомозиготи по С282У мутацията. Болните носители на с.98-6С>Т полиморфизма са имали сравними или по-ниски стойности на желязната обмяна отколкото контролните лица (98). Освен това при 2 жени и 2 мъже от това изследване, сънаследяването на с.98-6С>Т заедно с хетерозиготно носителство на С282У или сложно хетерозиготно носителство на С282У/Н63D не води до значим синдром на свръхнасищане с желязо и клинична картина на хемохроматоза. (98). От друга страна, Mendes и съавт. 2009 считат, че този полиморфизъм може да възпрепятства снаждането на HFE2 протеина и да доведе до алтернативни сплайсинг варианти на белтъка.

Открихме 1 хетерозиготен носители на Т31М мутация в HAMP гена. Тази рядка миссенс замяна е установена в хомозиготно състояние от Lee и съавт. (99) 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. Т31М 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.

Категорични данни за патогенността на установените мутации в хетерозиготно или двойно хетерозиготно състояние няма. Фактът обаче че те са установени при подбрани 4 пациента с хронични чернодробни болести със значително завишени стойности на ТН и феритина говори в полза на ролята им като фактори повлияващи синдрома на претоварване с желязо при пациенти.

ЧАСТ 4. Болест на Уилсън

Клинична изява и протичане на болестта на Уилсън

При нашите пациенти с болест на Уилсън типът на чернодробното увреждане обхваща целия спектър на изява на болестта, описван в литературата. Наблюдавахме остър хепатит със съпътстваща хемолитична криза в около 6% от случаите. По литературни данни честотата на тази форма е до около 12% (196), но са описвани и

ниски честоти до 2 на 283 пациента в Япония с болест на Уилсън (157). При една от нашите болни първата изява на болестта беше с клинични и лабораторни находки като при автоимуен хепатит, но при нея не се отчете задоволителен ефект от стандартна терапия с глюкокортикостероиди. По литературни данни болестта на Уилсън може да дебютира с находки наподобяващи тези при автоимуен хепатит - със завишени стойности на имуноглобулини и титър на автоантитела, но с липса на ефект от приложената терапия. Чернодробна цироза при изявата на болестта беше налична при около 52% от нашите случаи, а 56% от тях бяха във фаза на декомпенсация. Тези находки са в рамките на тези съобщавани в литературата при серии от пациенти с болест на Уилсън с чернодробно ангажиране. В някои от тях декомпенсираната ЧЦ е първата изява на болестта при 86% (197). Спленомегалията, като белег на неразпознатата цироза, беше най-четият клиничен симптом в нашата група. По литературни данни тя е първият симптом на болестта в около 56% от случаите с чернодробно ангажиране (59). В заключение болестта на Уилсън се изявява с напреднало чернодробно увреждане при повече от половината болни, най-вероятно поради липсата на характерни белези и фамилно изследване.

Около 60% от нашите пациенти бяха с неврологични симптоми при изявата на болестта. При по-голямата част от тях обаче, в около 72% беше наличен пръстена на Кайзер-Флайшер. Понякога той не свързан с наличната неврологична форма, а съпътстваше ЧЦ. По данни на Mihaylova и съавт. (119) пръстена на Кайзер-Флайшер е бил наличен при 81% от пациентите с неврологична форма на болестта. Следователно липсата му при пациенти само с неврологично засягане не бива да възпрепятства диагнозата.

Нашите пациентите проследени за период малко над 10 години, които дебютират с декомпенсирана цироза в по-голямата си част преминават в компенсиран стадий. Също така пациентите с компенсирана чернодробна цироза на фона на провежданата терапия подържат нормална чернодробна функция и не се регистрира прогресия на болестта. При около 3 пациента обаче, нямаше значимо подобрене по отношение на чернодробната функция. При единият се проведе успешно чернодробна трансплантация, а другият е в очакване на такава. При болните, които бяха с хроничен хепатит при изявата на болестта, чернодробното увреждане в една голяма част прогресира до компенсирана ЧЦ. Този факт доказва, че лечението забавя драстично естествения ход на болестта.

В нашата група пациенти с болест на Уилсън се наложи замяна на D-пеницилмина с триентин при 2 пациента (2%). При единият - поради алергична реакция, а при другия - поради бъбречни увреждания. При друг пациент (чакащ ЧТ) е наблюдавална тубулопатия с развитието на тежка остеопороза след према на D-пенициламин, което е наложило спиране на медикамента и прилагане на цинков препарат. След обратното развитие на остеопоротичните промени, приемът на D-пенициламин е възобновен. Временна неутропения след първия прием на пенициламин се разви при друг болен, която обаче беше преодоляна и лечението продължи. При някои пациенти повишените стойности на протеинурията наложиха корекция на дозата на D-пенициламин. Нефролтиазата и протеинурията бяха най-честите бъбречни увреждания на фона на терапията. Бяха наблюдавани в 19% от случаите. Нашите данни сочат, че лечението с D-пенициламин се понася добре и в редки случаи нежелани лекарствени реакции налагат прекъсването му временно и в още по-редки заместване с друг медикамент.

Генотипно-фенотипни корелации при пациентите с болест на Уилсън

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 (137).

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 (76, 117). 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 чернодорбна форма на болестта на Уилсън. За разлика от резултатите при проучвания, които показват същата връзка (168,137,190), 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 и съавт. (119) 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, насочени от невролог за оценка 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 и съавт. (119) 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 – хроничен хепатит, 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 куприурята 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 куприурята 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 (32). 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 гнеzdови 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. Използвана литература

1. Аджаров Д. Порфирии. Българска хепатогастроент. 2001;3 (2):95-105
2. Адажров Д. Порфирии. В: Клиничната лаборатория и клиничната медицина. Ред. З. Кръстев и Т. Шипков. Изд. Иван Сапунджиев, София 2005.
3. Аджаров Д. Определяне на уропорфириноген декарбоксилазната активност в еритроцитите при диганостика на фамилната porphyria cutanea tarda. Съвр. Мед. 1997; 48(2):44-48
4. Атанасова П, Гроздев И, Тренова А, Иванова А, Аджаров Д. Особенности на porphyria variegata в България. Медицински преглед. 2005; 41, № 3, 59-65
5. Диагностичен и терапевтичен алгоритъм (консенсус) българско научно дружество по гастроентерология. Порфирии. Българска хепатогастроент. Г2010 КН.1
6. Диагностичен и терапевтичен алгоритъм (консенсус) българско научно дружество по гастроентерология. Идиопатична хемохроматоза. Българска хепатогастроент. Г2010 КН.1
7. Диагностичен и терапевтичен алгоритъм (консенсус) българско научно дружество по гастроентерология. Болест на Wilson. Българска хепатогастроент. Г2010 КН.1
8. Пенкова М, Гълъбова М, Ананиев Юл, Иванова Р, Матева Л. Честота и характеристика на синдрома на претоварване с желязо при пациенти с хронични чернодробни заболявания. Българска хепатогастроентерология Г.2011 КН1 стр. 59-66
9. Пенкова М, Гълъбова М, Ананиев Юл, Иванова Р, Матева Л. Серумни нива на хепсидина при хронични чернодробни заболявания. Г2012 КН1; стр.67-74
10. Aarsand AK, Boman H, Sandberg S. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: characterisation and diagnostic strategies. Clin Chem 55:4, 2009, 795-803
11. Aarsand A , Sandberg S. Porphyrrias: a challenge for diagnostic assessment and treatment. Clin Lab Int. 2004;28 (8)6-8

12. Adjarov DG, Naydenova EN, Kerimova MA, Pentieva ED, Ivanova LB, Ivanova VA. Influence of protein calorie malnutrition and fasting on the activities of δ -aminolevulinic acid dehydratase and porphobilinogen deaminase in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 1994; 46: 199-202
13. Adams, P.C., Reboussin, D.M., Barton, J.C. et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1769–1778
14. Adams PC, Barton JC. Haemochromatosis. *Lancet* 2007; 370:1855-1860
15. Andersson GJ, Powell LW. HFE and non-HFE hemochromatosis. *Int J Haematol.* 2002; 76:203-207
16. Aguilar-Martinez P, Grandchamp B, Cunat S, Cadet E, Blanc F, Nourrit M, Lassoued K, Schved JF, Rochette J. Iron overload in HFE C282Y heterozygotes at first genetic testing: a strategy for identifying rare HFE variants. *Haematologica.* 2011 Apr;96(4):507-14.
17. Ala A, Borjigin J, Rochwarger A, Schilsky M. Wilson disease in septuagenarian siblings: raising the bar for diagnosis. *Hepatology* 2005; 41: 668–70.
18. Alla V Bonkovsky HL. Iron in nonhemochromatotic liver disorders. *Semin Liv Dis* 2005; 25(4): 461-72
19. Al Jumah M, Majumdar R, Al Rajeh S, et al. A clinical and genetic study of 56 Saudi Wilson disease patients: identification of Saudi-specific mutations. *Eur J Neurol* 2004; 11: 121–24.
20. Alt E, Sternlieb I, Goldfischer S. The cytopathology of metal overload. *Int Rev Exp Pathol* 1990; 31: 165–88.
21. Andersson C, Thunell S, Floderus Y et al. Diagnosis of acute intermittent porphyria in northern Sweden: and evaluation of mutation analysis and biochemical methods. *J Int. Med.* 1995; 237:301-308
22. Andersson C, Lithner F. Diabetic metabolism protective in severe acute intermittent porphyria. *Lakartidningen* 2001; 98(51-52):5874-6

23. Aranda N, Viteri FE, Montserrat C, Arija V. Effects of C282Y,H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann Hematol* 2010;89:767-73.
24. Aurizi C, Schneider-Yin X, Sorge F, Macri A, Minder El, Biolcati G. Heterogeneity of mutations in the ferrochelatase gene in Italian patients with erythropoietic protoporphyria. *Mol Genet Metab* 2007, 90:402-7
25. Babbitt JI et al. Modulation of bone morphogenic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 2007; 117:1933-1939
26. Bacon BR, Olynyk JK, Brunt EM, Britton RS, Wolff RK. HFE genotypes in hemochromatosis and other liver diseases. *Ann Intern Med* 1999;130:1018-9.
27. Barbaro M, Kotajarvi M, Harper P, Floderus Y. Partial protoporphyrinogen oxidase (PPOX) gene deletions, due to different Alu-mediated mechanisms, identified by MLPA analysis in patients with variegate porphyria. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8:13
28. Benedetto, A.V., J.P. Kushner, J.S. Taylor. Porphyria cutanea tarda in three generations of a single family. *N.Engl.J.Med.* 298, 1978, 358-362.
29. Biasotto G, Belloli S, Ruggeri G, Zanella I, Gerardi G, Corrado M, Gobbi E, Albertini A, Arosio P. Identification of the new mutations of the HFE, hepcidin and transferrin receptor 2 genes by denaturing HPLC analysis of individuals with biochemical indications of iron overload. *Clin. Chem.* 49 (2003)1981-1988.
30. Bonkovsky HL, Lambrecht RW and Shan Y. Iron as a comorbid factor in nonhemochromatotic liver disease, *Alcohol* 30 (2003), 137–144. 1
31. Bonkovsky HL, Troy N, McNeal K et al., Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C, *J Hepatol* 37 (2002), 848– 854.
32. Brewer GJ, Yuzbasiyan-Gurkan V, Lee DY, Appelman H. Treatment of Wilson's disease with zinc. VI: initial treatment studies. *J Lab Clin Med* 1989;114:633–638
33. Burke W, Imperatore G, McDonnell SM, Baron RC, Khoury MJ. Contribution of different HFE genotypes to iron overload disease: A pooled analysis. *Gene Med* 2000;2:271-7

34. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993; 5: 327–37.
35. Butler P, McIntyre N, Mistry PK. Molecular diagnosis of Wilson disease. *Mol Genet Metab* 2001; 72: 223–30.
36. Camaschella C, Roetto A, Cali A et al. The gene TfR2 is mutated in a new type of hemochromatosis mapping to 1q22. *Nat Genet* 2000; 25:14-15
37. Campo, E., M. Bruguera, J. Rodes. Are there diagnostic histologic features of porphyria cutanea tarda in liver biopsy specimens? *Liver* 10, 1990, 185-190.
38. Capellini MD, Martinez di Montemuros, Tavazzi D et al. Seven novel point mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase (UROD) gene in patients with familial porphyria cutanea tarda. *Hum Mutat.* 2001; 17(4):350
39. Curcio M, Fornaciari S, Mariotti ML, Chelazzi S, Scatena F, Presciuttini S. 2008. Haplotype analysis of the H63D, IVS2+4t/c, and C282Y polymorphisms of the HFE gene reveals rare events of intragenic recombination. *Eur J Haematol.* 80:341-5.
40. Deacon AC, Elder GH. Front line tests for the investigation of suspected porphyria. ACP Best Practice No 165. *J Clin Pathol.* 2001; 54:500-507
41. Deybach JC, de Verneuil H, Nordmann Y. The inherited enzymatic defect in porphyria variegata. *Hum Genet* 1981; 58(4):425-28
42. De Besceglie AM. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992;102(6):2108-13
43. de Lucas AP, Fulgencio MG, Robles JM, Sierra EM, del Rey Cerros MJ, Perez PM. 2005. Is the IVS2+4T>C variant of the HFE gene a splicing mutation or a polymorphism? A study in the Spanish population. *Genet Med.* 7:212- 3.
44. De Gobbi M, Roetto A, Piperno A. Natural history of juvenile hemochromatosis. *Br J Haematol.* 2002; 117:973-9

45. Dhawan A, Taylor RM, Cheeseman P, De Silva P, Katsiyiannakis L, Mieli-Vergani G. Wilson's disease in children: 37-Year experience and revised King's score for liver transplantation. *Liver Transpl* 2005;11:441- 448.
46. Distante S, Bjoro K, Hellum KB et al., Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection, *Liver* 22 (2002), 269–275.
47. Drakesmith H et al. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood* 2005; 106:1092-1097
48. Elder, G.H. Porphyria cutanea tarda. *Semin.Liver Dis.* 18, 1998, 67-75.
49. Elder, G.H., D.M. Sheppard, R. Enriquez de Salamanca, A. Olmos. Identification of two types of porphyria cutanea tarda by measurement of erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase. *Clin.Sci.* 58, 1980, 477-484.
50. Elder, G.H., A.J. Urquhart, R. E. de Salamanca, J.J. Munoz, H.L. Bonkovsky. Immunoreactive uroporphyrinogen decarboxylase in the liver in porphyria cutanea tarda. *Lancet ii*, 1985, 229-233.
51. Elder, G.H., D.M. Sheppard, J.A. Tovey, A.J. Urquhart. Immunoreactive uroporphyrinogen decarboxylase in porphyria cutanea tarda. *Lancet II*, 1983, 1301-1304.
52. Ellervik C, Birgens H, Tybjaerg-Hansen A and Nordestgaard A. Hemochromatosis genotypes and risk of 31 disease endpoints: meta-analyses including 66,000 cases and 226,000 controls, *Hepatology* 46 (2007), 1071–1080.
53. Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C et al. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis, *J Hepatol* 38 (2003), 335–342.
54. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines for HFE Hemochromatosis. *J Hepatol* (2010). doi: 10.1016/j.jhep.2010.03.001.
55. Facchini FS. Effect of iron depletion in carbohydrate -intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122:931-9

56. Feder JN, Gnirke A, Thomas W et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet.* 1996; 13:399-408.
57. Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee AK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Starnes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, Schatzman RC. The Hemochromatosis Founder Mutation in HLA-H Disrupts b2-Microglobulin Interaction and Cell Surface Expression. *J Biol Chem.* 1997 May 30;272(22):14025-8.
58. Fernandez-Real JM. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* 2002; 51:2348-54
59. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int* 2003; 23: 139–42.
60. Floreani A, Navaglia F, Basso D, Zambon CF, Basso G, Germano G, Rizzotto ER, Guido M, Plebani M. Intron 2 [IVS2, T-C +4] HFE gene mutation associated with S65C causes alternative RNA splicing and is responsible for iron overload. *Hepatol Res.* 2005; 33:57-60.
61. Floderus Y, Shoolingin-Jordan PM, Harper P. Acute intermittent porphyria in Sweden. Molecular, functional and clinical consequences of some new mutations found in the porphobilinogen deaminase gene. *Clin Genet* 2002; 62(4): 288–97
62. Frazer DM, Andersson GI. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30:288-297
63. Frommer DJ. Urinary copper excretion and hepatic copper concentrations in liver disease. *Digestion* 1981;21:169-178
64. Fujita N. Patients with chronic hepatitis C achieving sustained virological response to peginterferon and ribavirin therapy recover from impaired hepcidin secretion. *J Hepatol* 2008; 49:702-10
65. Gao et al. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 2009; 9:217-227

66. Gehrke S, Stremmel G, Mathes I et al., Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype, *J Mol Med* 81 (2003), 780–787.
67. Geier A, Reugels, R. Weiskirchen et al., Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C, *Liver Int* 24 (2004), 285–294.
68. Giacchino R, Marazzi MG, Barabino A, Fasce L, Ciravegna B, Famularo L, et al. Syndromic variability of Wilson's disease in children. Clinical study of 44 cases. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;29:155-161.
69. Gill R, Kolstoe S, Mohammed F et al. Structure of human porphobilinogen deaminase at 2.8 Å: the molecular basis of acute intermittent porphyria. *Biochem J* 2009; 420(1):17-25
70. Girelli D, Bozzini C, Roetto A. et al. Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in the transferrin receptor 2 gene. *Gastroenterology* 2002; 122:1295-1302
71. Gitlin J Wilson disease *Gastroenterology* 2003; 125:1868 – 1877
72. Gochee PA, Powell LW, Cullen DJ, et al. A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. *Gastroenterology* 2002;122:646-51.
73. Gouya L, Martin-Schmidt C, Robreau AM, Austerlitz F, Da Silva V, Brun P, Simonin S, Lyoumi S, Grandchamp B, Beaumont C, Puy H, Deybach JC. Contribution of a single nucleotide polymorphism to the genetic predisposition for erythropoietic protoporphyria. *Am J Hum Genet* 2006, 78:2-14
74. Grandchamp B, Puy H. Lamoril Y. et al. Molecular pathogenesis of hepatic acute porphyrias. *J Gastroenterol Hepatol.* 1996; 11:1046-1052
75. Gross JB, Jr., Ludwig J, Wiesner RH, McCall JT, LaRusso NF. Abnormalities in tests of copper metabolism in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1985;89:272-278

76. Gromadzka G, Schimdt H, Genschel J et al. Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7b are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. *Clin Genet*. 2005; 68:524-532
77. Gu YH, Kodama H, Du SL, Gu QJ, Sun HJ, Ushijima H. Mutation spectrum and polymorphisms in ATP7B identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnic patients with Wilson's disease. *Clin Genet* 2003; 64: 479–84.
78. Gurrin LC, bertalli NA, Dalton GW, Osborne NJ, Constantine CC, et al. HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis-related morbidity. *Hepatology* 2009 50:94-101
79. Harrison-Findik DD. Role of alcohol in the regulation of iron metabolism, *World J Gastroenterol* 13 (2007), 5:4925–4930
80. HEIRS Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 2005;352:1769-78.
81. Hentze MW, Muckenthaler Mu, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabaolism. *Cell* 2004; 117:285-297
82. Hernaez R, Yeung E, Clark J, Kowdley K, Brancati F and Kao W. Hemochromatosis gene and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2011 November ; 55(5): 1079–1085. doi:10.1016/j.jhep.2011.02.013
83. Hezode C, Cazeneuve C, Coue O et al., Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions, *J Hepatol* 31 (1999), 979–984.
84. HGMD <https://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi>
85. Hift RJ, Davidson BP, van der Hooft C, Meissner DM, Meissner PN. Plasma fluorescence scanning and fecal porphyrin analysis for the diagnosis of variegate poprhya: precise determination of sensitivity and specificity with detection of protoporphyrinogen oxidase mutations as a reference standard. *Clin Chem* 2004; 50(5):915-23

86. Hrdinka M, Puy H, Martasek P. May 2006 Update in porphobilinogen deaminase gene polymorphisms and mutations causing acute intermittent porphyria: comparison with the situation in Slavic population. *Physiol Res* 2006; 55(2): S119-S136
87. Huster D, Hoppert M, Lutsenko S, et al. Defective cellular localization of mutant ATP7B in Wilson's disease patients and hepatoma cell lines. *Gastroenterology* 2003; 124: 335–45.
88. Ivanova A. C282Y and H63D mutations in the HFE gene are not associated with porphyria cutanea tarda in Bulgaria [letter]. *Hepatology* 1999;30:1532-1533
89. Jackson HA, Carter K, Darke C, Guttridge MG, Ravine D, Hutton RD, Napier JA, Worwood M. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *Br J Haematol* 2001;114:474–484.
90. Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. The porphyrias. In: *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds), McGraw-Hill, New York Vol 2, 1995p.2103-2159
91. Kalkan A, Bulut V, Avci S, Celik I, Bingol NK. Trace elements in viral hepatitis. *J Trace Elem Med Biol.* 2002;16(4):227-30.
92. Kauppinen R, Mustajoki S, Pihlaja H, Peltonen L, Mustajoki P. Acute intermittent porphyria in Finland: 19 mutations in the porphobilinogen deaminase gene. *Hum Mol Genet* 1995; 4(2):215-222
93. Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T et al., The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C, *Gastroenterology* 116 (1999), 127–134.
94. Kim CH. Association of elevated serum ferritin concentration with insulin resistance and impaired glucose metabolism in Korean men and women. *Metabolism* 2010
95. Kratka K, Dostalikova-Cimburova M, Michalikova H et al., High prevalence of HFE gene mutations in patients with porphyria cutanea tarda in the Czech Republic, *Br J Dermatol* 159 (2008), 585–590

96. Kumar S, Thapa BR, Kaur G, Prasad R. Identification and molecular characterization of 18 novel mutations in the ATP7B gene from Indian Wilson disease patients: genotype. *Clin Genet* 2005; 67: 443–45.
97. Lee PL, Halloran C, West C, Beutler E. Mutation analysis of the transferrin receptor-2 gene in patients with iron overload. *Blood Cells Mol. Dis.* 27 (2001) 285-289.
98. Lee PL, Barton JC, Brandhagen D, Beutler E. Hemojuvelin (HJV) mutations in persons of European, African –American and Asian ancestry with adult onset haemochromatosis. *Br J Haematol* 2004; 127: 224–229.
99. Lee P, Gelbart T, West C, et al. A study of genes that may modulate the expression of hereditary hemochromatosis: transferrin receptor-1, ferroportin, ceruloplasmin, ferritin light and heavy chains, iron regulatory proteins (IRP)-1 and -2, and hepcidin. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:783–802.
100. Lin CC, Huang JF, Tsai LY, Huang YL. Selenium, iron, copper, and zinc levels and copper-to-zinc ratios in serum of patients at different stages of viral hepatic diseases. *Biol Trace Elem Res.* 2006 Jan;109(1):15-24.
101. Llewellyn DH, Whatley S, Elder GH. Acute intermittent porphyria caused by an arginine to histidine substitution (R26H) in the cofactor-binding cleft of porphobilinogen deaminase. *Hum Mol Genet* 1998; 2(8):1315-6
102. Mah YH, Kao JH, Liu CJ et al., Prevalence and clinical implications of HFE gene mutations (C282Y and H63D) in patients with chronic hepatitis B and C in Taiwan, *Liver Int* 25 (2005), 214–219
103. Martinelli AL, Filho AB, Franco RF et al., Liver iron deposits in hepatitis B patients: association with severity of liver disease but not with hemochromatosis gene mutations, *J Gastroenterol Hepatol* 19 (2004), 1036–1041
104. Mariani R, Pelucchi S, Arosio C, Coletti S, Pozzi M, Paolini V, Trombini P, Piperno A. Genetic and metabolic factors are associated with increased hepatic iron stores in a selected population of p.Cys282Tyr heterozygotes. *Blood Cells Mol Dis.* 2010 Mar 15;44(3):159-63

105. Marchesini G. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-23
106. Martins da Costa C, Baldwin D, Portmann B, Lolín Y, Mowat AP, Mieli-Vergani G. Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease. *Hepatology* 1992;15: 609-615.
107. Matas M, Guix P, Castro JA, et al. Prevalence of HFE C282Y and H63D in Jewish populations and clinical implications of H63D homozygosity. *Clin Genet* 2006;69:155-62
108. Mattman A, Huntsman D, Lokitch G, Langlois S, Buskard N, Ralston D, Butterfield Y, Rodrigez P, Jones S, Porto G, Marra M, de Sousa M, Vatcher G. Transferrin receptor 2 (tfr2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel Tfr2 mutation. *Blood* 100 (2002) 1075-1077.
109. McManus, J.F., C.G. Begley, I.S. Ratnaike. Eight new mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene. International Symposium on Porphyrins and Heme Related Disorders: Molecular Basis, Diagnostics and Clinical Aspects. Helsinki 28 June - 2 July 1995. Abstracts. Nr.19.
110. McDonald CJ, Wallace DF, Crawford DH, Subramaniam VN. Iron storage disease in Asia-Pacific populations: the importance of non-HFE mutations. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jul;28(7):1087-94. doi: 10.1111/jgh.12222.
111. Meguro K, Fujita Nishida N et al. Molecular defects in uroporphyrinogen decarboxylase in a patient with mild hepatoerythropoietic porphyria. *J Invest Dermatol.* 2004; 151(4):920-923
112. Meissner P, Day R, Moore M et al. Protoporphyrinogen oxidase and porphobilinogen deaminase in variegate porphyria. *Eur J Clin Invest.* 1986;16:257-261
113. Meissner PN, Dailey TA, Hift RJ, Ziman M, Corrigan AV, Roberts AG et al. A R59W mutation in human protoporphyrinogen oxidase results in decreased enzyme activity and is prevalent in South Africans with variegate porphyria. *Nat Genet* 1996; 13(1):95-97

114. Mendes AI, Ferro A, Martins R, Picanco I, Gomes S, Cerqueira R, et al. Non-classical hereditary hemochromatosis in Portugal: novel mutations identified in iron metabolism-related genes. *Ann Hematol* 2009; 88: 229–234.
115. Meregalli M, Corbetta N, Pellagati A, di Montemuroz M, Tavazzi D, Fargion S, Sampietro M. A novel polymorphism (219G>A) in the transferrin receptor gene. *Hum Mutat.* 15 (2000)389.
116. Meram I, Sirmatel F, Ahi S, Tarakcioglu M . Plasma copper and zinc levels in chronic viral hepatitis. *Saudi Med J.* 2004 Aug;25(8):1066-9
117. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut* 2007;56:115-120
118. Merle U, Weiss KH, Eisenbach C et al. Truncating mutations in the Wilson disease gene *ATP7b* are associated with very low serum ceruloplasmin oxidase activity and an early onset of Wilson disease. *BMC Gastroenterol.* 2010;18:8-10.
119. Mihaylova V, Todorov T, JeleV H, Kotsev I, Angelova L, Kosseva O, Georgiev G, Ganeva R, Cherninkova S, Tankova L, Savov A, Tournev I. Neurological symptoms, genotype-phenotype correlations and ethnic specific differences in Bulgarian patients with Wilson disease. *The Neurologist* 2012 18 (4):184-189
120. Moran-Jimenez, M.J., C.Ged, M. Romana, R. Enriquez De Salamanca, A. Taieb, G. Topi, L. D'Alessandro, H. de Verneuil. Uroporphyrinogen decarboxylase: complete human gene sequence and molecular study of three families with hepatoerythropoietic porphyria. *Am.J.Hum.Genet.* 58, 1996, 712-721.
121. Monnier PP, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Mueller BK. RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature.* 2002 Sep 26;419(6905):392-5.
122. Montosi G et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (*SLC11A3*) gene. *J Clin Invest.* 2001; 108:619-623
123. Mustajoki P. Variegated porphyria. Twelve years experience in Finland. *Q J Med.* 1980;194:191-203

124. Negro F, Samii K, Rubbia-Brandt L et al., Hemochromatosis gene mutations in chronic hepatitis C patients with and without liver siderosis, *J Med Virol* 60 (2000), 21–27.
125. Nelson JE, Bhattacharya R, Lindor KD, et al. HFE C282Y mutations are associated with advanced hepatic fibrosis in Caucasians with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;46: 723–729.
126. Nelson JE, Wilson L, Brunt EM, et al. Hepatic iron deposition in reticuloendothelial cells but not hepatocytes is associated with more severe NASH: results from the NASH clinical research network. 2009 International BioIron Society meeting, Porto, Portugal; 2009:185.
127. Nemeth et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306:2090-2093
128. Njajou Ot et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat genet* 2001; 28:213-214
129. Nicolas G et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *J Clin Invest* 2002; 110:1037-1044
130. Nicastro E, Loudianos G, zancan et al. Genotype-phenotype correlation in Italian children with Wilson's disease. *J Hepatol.*2009;50:555-561
131. Nordmann, Y. Erythropoietic protoporphyria and hepatic complications. *J.Hepatol.* 16, 1992, 4-6
132. Olynyk JK, Trinder D, Ramm GA, Britton RS, Bacon BR. Hereditary hemochromatosis in the post HFE era. *Hepatology* 2008; 48:991-1001
133. Olynyk JK. Duration of hepatic iron exposure increases the risk of significant fibrosis in hereditary hemochromatosis: a new role of magnetic resonance imaging. *Am J Gastroeneterol.* 2005. 100:837-841
134. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, et al. U.S. Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002; 137:947–54.

135. Pacal L, Husa P, Znojil V and Kankova K. HFE C282Y gene variant is a risk factor for the progression to decompensated liver disease in chronic viral hepatitis C subjects in the Czech population, *Hepato Res* 37 (2007), 740–747.
136. Pagani A, Silvestri L, Nai A, Camaschella C. Hemojuveline N-terminal mutants reach the plasma membrane but do not activate the hepcidin response. *Haematologica* 2008. 93:1466-1472
137. Panagiotaki E, Tzetis M, Manolaki et al. Genotype-Phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7b). *Am J Med Gen.* 2004;131A:168-173
138. Papanikoulau G, Samuels ME, Ludwig EH. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Gen.* 2004. ; 36:77-82.
139. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary anti microbial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 2001; 276:7806-7810
140. Paradisi I, Arias S. Marked geographic aggregation of acute intermittent porphyria families carrying mutation Q180X in Venezuelan populations, with description of further mutations. *J Inherit Metab Dis* 2010 DOI 10.1007/s10545-010-9228-x
141. Perri RE, Hahn SH, Ferber MJ, Kamath PS. Wilson Disease—keeping the bar for diagnosis raised. *Hepatology* 2005;42: 974.
142. Pedersen P, Milman N. Genetic screening for HFE hemochromatosis in 6,020 Danish men: penetrance of C282Y, H63D, and S65C variants. *Ann Hematol.* 2009 Aug;88(8):775-84
143. Phatak PD, Ryan DH, Cappuccio J, et al. Prevalence and penetrance of HFE mutations in 4865 unselected primary care patients. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:41-7.
144. Phillips JD, Parker LT, Schubert HL et al. Functional consequences of naturally occurring mutations in human uroporphyrinogen decarboxylase. *Blood.* 2001; 98(2): 3179-3185

145. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease. *N Engl. J. Med.* 2004; 350:2382-2397
146. Pigeon C et al. A new mouse liver-specific gene , encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276:7811-7819
147. Piperno A, Vergani A, Malosio I et al., Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE gene mutations, *Hepatology* 28 (1998), 1105–1109.
148. Poblete-Gutierrez P, Mendez M, Wiederholt T et al . The molecular basis of porphyria cutanea tarda in Chile: Identification and functional characterization of mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene. *Exp Dermatol.* 2004 Jun;13(6):372-9
149. Puy H, Robreau AM, Rosipal R et al. Protoporphyrinogen oxidase complete genomic sequence and polymorphisms in the human gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;22:226-230.
150. Puy H, Deybach JC, Lamoril J et al. Molecular epidemiology and diagnosis of PBG deaminase gene defects in acute intermittent porphyria. *Am J Hum Genet* 1997; 60(6):1373-83
151. Qin X, Tan Y, Wang L et al (2011) Structural insight into human variegate porphyria disease. *The FASEB J* 25:653-664
152. Roberts EA, Jimenez C, O'Connor C, Cox DW. Diagnosis and outcome of Wilson disease in a paediatric cohort [Abstract]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39(Suppl 1):A128.
153. Roetto A et al. Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: Identification of a new mutation (C70R). *Blood* 2004; 103:2407-2409
154. Saliou P, Le Gac G, Mercier A, Chanu B, Gueguen P, Merour M et al. Evidence for high importance of co-morbid factors in HFE C282Y/H63D patients cared by phlebotomies : results from an observational prospective study. *PLOS ONE* 2013. 8(12):e81128

155. Sassa S. Modern diagnosis and management of the porphyrias. *Br J Haematol* 2006; 135(3):281-92
156. Solis, J.A., P. Betancor, R. Campos. Association of porphyria cutanea tarda and primary liver cancer. *J.Dermatol.* 121, 1982, 131-137
157. Saito T. Presenting symptoms and natural history of Wilson disease. *Eur J Pediatr* 1987;146:261–265.
158. Sallie R, Katsiyiannakis L, Baldwin D, et al. Failure of simple biochemical indexes to reliably differentiate fulminant Wilson's disease from other causes of fulminant liver failure. *Hepatology* 1992;16: 1206–11.
159. Sanchez-Albisua I, Garde T, Hierro L, Camarena C, Frauca E, de la Vega A, et al. A high index of suspicion: the key to an early diagnosis of Wilson's disease in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28: 186-190.
160. Schilsky ML, Scheinberg IH, Sternlieb I. Prognosis of Wilsonian chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1991; 100: 762–67.
161. Schmidt HH. Role of genetic testing in liver transplantation for Wilson's disease. *Transplant Proc* 2003; 35: 2078–79.
162. Schmidter J, Engelkamp D. Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm. *Gene Expr Patterns.* 2004 Jan;4(1):105-10.
163. Sebastiani G, Wallace DF, Davies SE, Kulhalli V, Walker AP, Dooley JS. Fatty liver in H63D homozygotes with hyperferritinemia. *World J Gastroenterol* 2006;12:1788–1792.
164. Sebastiani G and Walker AP. HFE gene in primary and secondary hepatic iron overload, *World J Gastroenterol* 2007; 5:4673–4689
165. Silvestri L, Pagani A, Fazi C, Gerardi G, Levi S, Arosio P, Camaschella C. Defective targeting of hemojuvelin to plasma membrane is a common pathogenetic mechanism in juvenile hemochromatosis. *Blood.* 2007 May 15;109(10):4503-10.

166. Sikorska K, Bielawski KP, Stalke P et al., HFE gene mutations in Polish patients with disturbances of iron metabolism: an initial assessment, *Int J Mol Med* 16 (2005), 1151–1156.
167. Smith BC, Gorge J, Guzail AL et al., Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C, *Hepatology* 27 (1998), 1695–1699.
168. Stapelbroek JM, Bollen CW, van Amstel JK, et al. The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J Hepatol* 2004; 41: 758–63.
169. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, et al. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* 1997;113:212-218
170. Sternlieb I. Mitochondrial and fatty changes in hepatocytes of patients with Wilson's disease. *Gastroenterology* 1968; 55: 354–67.
171. Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, et al. Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat Med* 1998; 4: 588–93.
172. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993; 5: 344–50.
173. Thorburn C, Curry G, Spooner R et al., The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C, *Gut* 50 (2002), 248–252.
174. Thunell S, Floderus Y, Henrichson A, Harper P (2006) Porphyria in Sweden. *Physiol Res* 55(Suppl 2):S109-18
175. Tissieres P, Chevret L, Debray D, Devictor D. Fulminant Wilson's disease in children: appraisal of a critical diagnosis. *Pediatr Crit Care Med* 2003; 4: 338–43.

176. To-Figueras J, Badenas C, Carrera C et al. Genetic and biochemical characterization of 16 acute intermittent porphyria cases with a high prevalence of R173W mutation. *J Inher Metab Dis* 2006; 29(4):580-5
177. Todorov T, Savov A, Mihaylova V, Koseva O, Krustev Z, Jelev H, Tournev I, Penkov V, Konstantinova D, Tankova L, Tzolova N, Kremenski I. Ethnic specific background of mutations in Bulgarian patients with Wilson disease. *Genet Counsel.* 2007 18 (4): 445-450
178. Tsivkovskii R, Efremov RG, Lutsenko S. The role of the invariant His-1069 in folding and function of the Wilson's disease protein, the human copper-transporting ATPase ATP7B. *J Biol Chem* 2003; 278:13 302–08.
179. Tu JB, Blackwell RQ. Studies on levels of penicillamine-induced cupriuresis in heterozygotes of Wilson's disease. *Metabolism* 1967;16:507-513.
180. Tung BY. Hepatitis S, iron status and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology* 2003; 124:318-26
181. Valenti L, Pulixi E, Arosio P et al., Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis, *Haematologica* 92 (2007), 1037–1042
182. Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL, et al. HFE mutations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2008;47:1794–1796.
183. Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi A, Dongiovanni A, Galmozzi A, Vanni E, Canavesi E, Lattuada E, Roviato R, Marchesini G, Fargion S. HFE Genotype, Parenchymal Iron Accumulation, and Liver Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *GASTROENTEROLOGY* 2010;138:905–912
184. Valenti L et al. Beta-globin mutations are associated with parenchymal siderosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2010.
185. Verneuil H, Bourgeois F, de Rooij F, Siersema PD, Wilson JH, Grandchamp B, Nordmann Y. Characterization of a new mutation (R292G) and a deletion at the human uroporphyrinogen decarboxylase locus in two patients with hepatoerythropoietic porphyria. *Hum Genet.* 1992 Jul;89(5):548-52.

186. Verneuil, H. de, B. Grandchamp, C. Beaumont, C. Picat, Y. Nordmann. Uroporphyrinogen-decarboxylase structural mutant (Gly281-Glu) in a case of porphyria. *Science* 234, 1986, 732-734.
187. Verneuil, H. de, B. Grandchamp, P.H. Romeo, N.Raich, C. Beaumont, M. Goossens, H. Nicolas, Y. Nordmann. Molecular analysis of uroporphyrinogen-decarboxylase deficiency in a family with two cases of hepatoerythropoietic porphyria. *J.Clin.Invest.* 77, 1986, 431-435.
188. Verneuil, H. de, J. Hansen, C. Picat, B. Grandchamp, J. Kuchner, A. Roberts, G. Elder, Y. Nordmann. Prevalence of the 281(Gly→Glu) mutation in hepatoerythropoietic porphyria and porphyria cutanea tarda. *Hum.Genet.* 78, 1988, 101-102
189. von Ahsen N, Wieland E, Adjarov D et al. The HFE gene S65C polymorphism is rare among Bulgarian porphyria cutanea tarda patients. *J Hepatol* 2001; 34:484-488
190. Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, Kozak L. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab* 2005; 86: 277–85.
191. Vujic Spasic M et al. HFE acts in hepatocytes to prevent hemochromatosis. *Cell Metab* 2007; 7:205-214
192. Waheed A, Parkkila S, Zhou X et al. Hereditary xeroderma: Effects of C282Y and H63D mutations on association with b2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 12384–12389, November 1997 *Cell Biology*
193. Wallace DF and Subramaniam VN. Co-factors in liver disease: the role of HFE-related hereditary hemochromatosis and iron, *Biochim Biophys Acta* 1790 (2009), 663–670.
194. Walsh A1, Dixon JL, Ramm GA, Hewett DG, Lincoln DJ, Anderson GJ, Subramaniam VN, Dodemaide J, Cavanaugh JA, Bassett ML, Powell LW. The clinical relevance of compound heterozygosity for the C282Y and H63D substitutions in hemochromatosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Nov;4(11):1403-10.

195. Walshe JM, Waldenstrom E, Sams V, Nordlinder H, Westermark K. Abdominal malignancies in patients with Wilson's disease. *QJM* 2003; 96: 657–62.
196. Walshe JM. The liver in Wilson's disease. In: Schiff L, Schiff ER, editors. *Diseases of the Liver*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott; 1987. p. 1037–1050.
197. Walshe JM. Wilson's disease presenting with features of hepatic dysfunction: a clinical analysis of eighty-seven patients. *Q J Med* 1989;70:253–263.
198. Whatley SD, Mason NG, Woolf JR, Newcombe RG, Elder GH, Badminton MN. Diagnostic strategies for autosomal dominant acute porphyrias: retrospective analysis of 467 unrelated patients referred for mutational analysis of the HMBS, CPOX, or PPOX gene. *Clin Chem* 2009; 55(7):1406-14
199. Whatley SD, Puy H, Morgan R et al. Variegate Porphyria in Western Europe: Identification of PPOX Gene Mutations in 104 Families, Extent of Allelic Heterogeneity, and Absence of Correlation between Phenotype and Type of Mutation. *Am J Hum Genet*. 1999; 65(4): 984–994
200. Whatley SD, Ducamp S, Gouya L, Grandchamp B, Beaumont C, Badminton MN, Elder GH, Holme SA, Anstey AV, Parker M, Corrigan AV, Meissner PN, Hift RJ, Marsden JT, Ma Y, Mieli-Vergani G, Deybach JC, Puy H. C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. *Am J Hum Genet* 2008, 83:408-14
201. Whatley SD, Mason NG, Khan M, Zamiri M, Badminton MN, Missaoui WN, Dailey TA, Dailey HA, Douglas WS, Wainwright NJ, Elder GH. Autosomal recessive erythropoietic protoporphyria in the United Kingdom: prevalence and relationship to liver disease. *J Med Genet* 2004, 41:e105
202. Wiman A, Harper P, Floderus Y. Nine novel mutations in the protoporphyrinogen oxidase gene in Swedish families with variegate porphyria. *Clin Genet* 2003; 64(2):122-30
203. Wilkinson ML, Portmann B, Williams R. Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper. *Gut* 1983; 24: 767–71.

204. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912;34: 20–509
205. Wilson DC, Phillips MJ, Cox DW, Roberts EA. Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children. *J Pediatr* 2000; 137: 719–22.
206. Wood, M.J., Powell, L.W., and Ramm, G.A. Environmental and genetic modifiers of the progression to fibrosis and cirrhosis in hemochromatosis. *Blood*. 2008; 111: 4456–4462
207. Wu ZY, Wang N, Lin MT, Fang L, Murong SX, Yu L. Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in chinese patients with Wilson disease. *Arch Neurol* 2001;58: 971–76.
208. Yang CC, Kuo HC, You HL et al. HMBS mutations in Chinese patients with acute intermittent porphyria. *Ann Hum Genet* 2008; 72(Pt 5):683-6
209. Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 271–77.