

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Laimutis Kučinskas

**METABOLINĖS KEPENŲ LIGOS:
VILSONO LIGOS IR
HFE-HEMOCHROMATOZĖS
GENETINĖ CHARAKTERISTIKA**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai,
medicina (06B)

Kaunas, 2013

Disertacija rengta Lietuvos sveikatos mokslų universitete Medicinos akademijoje.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas

prof. habil. dr. Limas Kupčinskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Nariai:

prof. habil. dr. Algimantas Irnius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

prof. dr. Gediminas Kiudelis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

prof. dr. Algirdas Utkus (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

prof. dr. Mārcis Leja (Latvijos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija bus ginama viešame Medicinos krypties tarybos posėdyje 2013 m. gegužės 14 d. 14 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto Simpoziumų salėje.

Adresas: Sukilėlių pr. 17, LT-50161 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Laimutis Kučinskas

**METABOLIC HEPATIC DISEASES:
GENETIC CHARACTERISTICS
OF WILSON DISEASES AND
HFE-HEMOCHROMATOSIS**

Doctoral Dissertation
Biomedical Sciences,
Medicine (06B)

Kaunas, 2013

Dissertation has been prepared at the Medical Academy of Lithuanian University of Health.

Dissertation is defended extramurally.

Scientific consultant:

Prof. Dr. Habil. Limas Kupčinskas (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences

Chairperson

Prof. Dr. Habil. Vaiva Lesauskaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Members:

Prof. Dr. Habil. Algimantas Irnius (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Gediminas Kiudelis (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Algirdas Utkus (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Mārcis Leja (University of Latvia, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council of Lithuanian University of Health Sciences at 14:00 on the 14th of May 2013, in the Symposium auditorium of Institute of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių 17, LT-50161 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
IVADAS	8
Darbo tikslas ir uždaviniai	9
Darbo uždaviniai:	9
Darbo aktualumas ir naujumas	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Vilsono liga: epidemiologija	11
1.2. Vilsono ligos molekuliniai mechanizmai	11
1.3. Vilsono liga: molekulinė genetika	13
1.4. Vilsono liga: klinikiniai simptomai	16
1.4.1. Virškinimo organų sistemos pažeidimai	17
1.4.2. Nervų sistemos pažeidimai	17
1.4.3. Kitų organų ir sistemų pakitimai	18
1.5. Vilsono liga: biocheminiai pokyčiai	19
1.6. Vilsono ligos genotipo - fenotipo sąsaja	20
1.7. Geležies apykaitos mechanizmas	21
1.8. Padidėjusio geležies kaupimo organizme ligos	23
1.9. HFE – hemochromatozės epidemiologija ir molekulinė patogenezė	24
1.10. HFE geno mutacijų kilmė	27
1.11. HFE geno mutacijų paplitimas	27
1.12. HFE – hemochromatozės formos	30
1.13. HFE hemochromatozės laboratoriniai pakitimai	31
2. METODIKA	32
2.1. Tiriamieji	32
2.1.1. Vilsono liga sergantieji ir jų giminaičiai	32
2.1.2. Savanoriai kraujo donorai	33
2.2. DNR išskyrimas iš periferinio kraujo leukocitų	33
2.3. DNR koncentracijos ir grynumo įvertinimas spektrofotometru	35
2.4. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)	36
2.5. <i>ATP7B</i> geno sekoskaita	37
2.6. <i>ATP7B</i> geno c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos nustatymas	37
2.7. <i>HFE</i> geno 2 egzono gausinimo PGR reakcijos protokolas	42
2.8. HFE-hemochromatozės <i>HFE</i> geno 4 egzono gausinimas	44
2.9. Agarozės gelio elektroforezė	46
2.10. Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) analizė	48
2.11. Genotipo vertinimas	52
2.12. Statistinė duomenų analizė	57

3. REZULTATAI.....	59
3.1. <i>ATP7B</i> geno mutavusių alelių dažnis.....	59
3.2. Vilsono liga sergančiųjų genotipavimo rezultatai	59
3.3. Vilsono liga sergančiųjų giminių genotipavimo rezultatai	61
3.4. Vilsono ligonių klinikinių požymių tyrimų rezultatai.....	63
3.5. Vilsono ligonių biocheminių tyrimų rezultatai	64
3.6. Vilsono liga sergančiųjų genotipo – fenotipo sąsajos tyrimo rezultatai.....	67
3.7. HFE – hemochromatozės alelių c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys) dažnis Lietuvos populiacijoje	68
3.8. HFE – hemochromatozės genotipų dažnis Lietuvos populiacijoje	70
3.9. HFE – hemochromatozės genotipų dažnis skirtinguose Lietuvos etnokultūrinuose regionuose	71
4. REZULTATŲ APITARIMAS.....	76
IŠVADOS.....	82
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS	84
PRIEDAI	94
MOKSLO STRAIPSNIAI.....	97
SUMMARY.....	108

SANTRUMPOS

ATP7B	–	P tipo vario transporto–adenozintrifosfatazės genas
BMR	–	branduolinis magnetinis rezonansas
BMP	–	kaulų morfogenetinis proteinas
BMPR		kaulų morfogenetinio proteino receptoriaus
Bp	–	bazių pora
CYBRD1	–	geležies-chelato reduktazės baltymas
CTR1	–	vario transporto baltymas 1
DMT1	–	dvivalenčių metalų pernešėjas
DNR	–	dezoksiribonukleininė rūgštis
ERK1/2		ekstraceliulinių signalų reguliuojamos kinazės
Fe		geležis
HAMP		hepcidinas
HJV		hemojuvelinas
HLA	–	žmogaus leukocitų antigenas
HO1	–	hemooksigenazė 1
KFŽ	–	Kaizerio Flaišerio žiedas
M	–	mutavęs alelis
N	–	normalus alelis
PCFT	–	su protonu susietas folatų pernešėjas
PGR	–	polimerazės grandininė reakcija
PI	–	pasikliautinasis intervalas
RNR	–	ribonukleininė rūgštis
SMAD		baltymas prieš DPP homologą
Tf	–	transferinas
TfR1	–	transferino receptoriaus 1
TfR2	–	transferino receptoriaus 2
VL	–	Vilsono liga
FPN	–	feroportino baltymas

IVADAS

Europos sąjungoje reta liga serga penki arba dar mažiau asmenų iš dešimt tūkstančių individų. Nors retųjų ligų dažnis nėra didelis, bet sergančiųjų gali būti daug, kadangi yra žinoma maždaug 7 000 ligų. Retos ligos dažnai kelia grėsmę gyvybei ar nuolat sekina. Todėl šių ligų diagnostika ir gydymas yra vienas iš sveikatos programų prioritetų Europos sąjungos valstybėse. Dažniausiai ligonių, sergančių šiomis ligomis, išgydyti negalima, tačiau anksti diagnozavus galima pagerinti sergančiųjų gyvenimo kokybę ir pailginti jo trukmę. Vilsono liga (VL) ir HFE-hemochromatozė – monogeninės, pagal Mendelio dėsnius paveldimos retos ligos. Šių ligų priežastis yra P tipo vario transporto – adenozintrifosfazės (*ATP7B*) arba *HFE* genų mutacijos, sukeliančios gyvybei pavojingas lėtines ligas. Vėlyvas šių ligų gydymas būna sudėtingas ir (ar) brangus ir tik ankstyva diagnostika bei laiku pradėtas gydymas padeda išvengti komplikacijų ir ankstyvos mirties. Šios ligos pažeidžia virškinimo, nervų, atramos – judėjimo ir kitų organų sistemas. Todėl nustatant šias ligas yra labai svarbus jautrus ir specifiskas molekulinis genetinis tyrimas.

ATP7B geno mutavusių alelių nešiotųjų ir sergančiųjų Vilsono liga dažnis pirmą kartą nustatytas Airijoje ir Vokietijoje tiriant asmenis pažeista nervų sistema [7, 88]. Atlikus šių šalių populiacijų tyrimus nustatyta, kad 1: 30 000–1: 50 000 iš populiacijos serga VL. Heterozigotinių individų dažnis tiriamose populiacijose buvo 1:90–1:150 [88]. Panašus heterozigotinių individų dažnis 1:30 000–1:50 000 gali būti ir Lietuvoje, todėl šia liga sergančių asmenų Lietuvoje galėtų būti 70–100 asmenų. Vilsono liga sergantiesiems nustatomi nervų bei virškinimo sistemos pakitimai, kurie pasireiškia kepenų pažeidimais (ciroze, kepenų funkcijos nepakankamumu, ūmiu ar lėtiniu hepatitu), Parkinsono ligos simptomais ir psichikos pokyčiais [4]. Rečiau nustatomi kitų organų sistemų pažeidimai. Laiku paskyrus gydymą liga neprogresuoja, galima išvengti ligos komplikacijų bei neįgalumo. Vilsono liga diagnozuojama remiantis klinikiniais požymiais bei laboratoriniais tyrimais (ceruloplazmino koncentracijos kraujo plazmoje, vario koncentracijos nustatymu paros šlapime ir šio metalo koncentracijos tyrimu kepenų biopsijos bandinyje). Visi aukščiau paminėti laboratoriniai tyrimai yra nepakankamai jautrūs ir specifiški. Todėl tiesioginis mutacijų nustatymas *ATP7B* gene yra svarbus patvirtinant VL diagnozę ir nustatant asimptominius giminaičius. Skirtingose šalyse yra paplitusios įvairios mutacijos, todėl vienas iš uždavinių buvo nustatyti Lietuvos populiacijai būdingas *ATP7B* geno mutacijas.

HFE-hemochromatozė yra autosominė recesyvinė liga, dažniausiai pažeidžianti kepenis. Sergant šia liga rečiau nustatomi širdies, sąnarių, sėklidžių pažeidimai, kuris atsiranda dėl padidėjusio geležies kaupimosi. Ligai būdingas

nevisiškas penetrantiškumas ir įvairi ligos ekspresija. Be klinikinės ligos formos yra asimptominė (latentinė) ir biocheminė ligos formos, kurioms būdingi tik biocheminiai pakitimai (padidėjusi feritino koncentracija ir transferino saturacija) arba tik genotipas, lemiantis ligos atsiradimą. Rečiausia šios ligos forma yra klinikinė – jai būdingi klinikiniai požymiai ir genotipas c.[845G>A]; [845G>A] p.[Cys282Tyr]; [Cys282Tyr] arba c.[845G>A]; [187C>G] p.[Cys282Tyr]; [His63Asp], lemiantis padidėjusį geležies kaupimą [1]. Molekulinis genetinis tyrimas padeda atskirti pirminę hemochromatozę nuo antrinės bei nustatyti asimptominės ligos formas, kurių progresavimas vėliau galėtų būti tiriamas biocheminiais ir klinikiniais tyrimais.

Trijų pagrindinių *HFE* geno c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys) mutacijų nustatymas yra nesudėtingas ir nustačius *HFE*-hemochromatozę šią ligą gydyti yra pigu ir paprasta (gydymo metodas flebotomija – kraujo nuleidimas). Flebotomija padeda išvengti ligos komplikacijų bei negalios, todėl svarbu yra nustatyti asimptominės (latentinės) *HFE*-hemochromatozės dažnį ir klinikinėje praktikoje įtariant šią ligą, turėtų būti atliekamas molekulinis genetinis tyrimas patvirtinantis klinikinę ir laboratorinę diagnozę.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas buvo nustatyti ligonių, sergančių metabolinėmis kepenų ligomis – Vilsono liga ir *HFE*-hemochromatoze genų mutacijas ir šių ligų fenotipines charakteristikas bei ištirti *HFE* geno pagrindinių mutavusių alelių dažnį Lietuvos savanorių kraujo donorų populiacijoje.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti Vilsono liga sergančiųjų ir jų pirmos eilės giminaičių *ATP7B* geno mutacijas bei jų dažnį.
2. Įvertinti genetinio tyrimo reikšmę Vilsono ligos diagnostikai.
3. Ištirti *HFE* geno c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys) mutacijų dažnį Lietuvos sveikų kraujo donorų populiacijoje.
4. Nustatyti asimptominės *HFE*-hemochromatozės dažnį Lietuvos sveikų kraujo donorų populiacijoje.
5. Ištirti *HFE* geno mutacijų c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys) paplitimo skirtumus atskiruose Lietuvos etnokultūriniuose regionuose.

Darbo aktualumas ir naujumas

Pirmą kartą Lietuvoje nustatant ar patvirtinant Vilsono ligą buvo naudota molekulinė genetinė diagnostika. Šio darbo metu molekuliniais genetiniais metodais patvirtinta Vilsono ligos diagnozė, nustatyti asimptominiai asmenys ir aptiktos Lietuvos populiacijai būdingos *ATP7B* geno mutacijos bei nustatytas jų dažnis. Remiantis tyrimo rezultatais pasiūlytas laboratorinis diagnostinis algoritmas Vilsono ligai patvirtinti. Pirmą kartą Lietuvoje buvo tirti savanoriai Lietuvos kraujo donorai ir nustatytas trijų dažniausių ir svarbiausių *HFE* geno mutacijų paplitimas Lietuvos populiacijoje bei aptiktas statistškai patikimai didesnis c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis Žemaitijos etnokultūriniame regione.

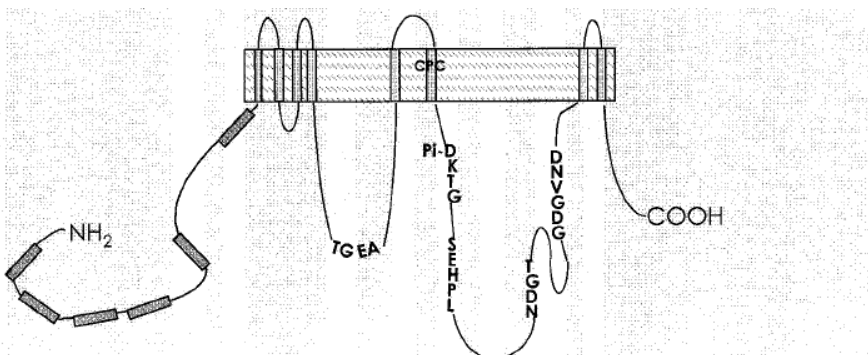
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Vilsono liga: epidemiologija

Vilsono liga (OMIM 277900) yra autosominiu recesyviniu būdu paveldima liga, kuria sergama visose populiacijose [13]. Šios ligos metu sutrinka vario ekskrecija su tulžimi, didėja intraląstelinė vario koncentracija parenchiminiuose organuose ir atsiranda klinikiniai ligos požymiai [22]. Dažniausiai Vilsono liga pasireiškia antrą arba trečią gyvenimo dešimtmetį virškinimo ir nervų sistemos pažeidimų kombinacija. VL dažnis buvo nustatomas analizuojant šios ligos atvejų skaičių per metus arba autopsijų metu buvo ieškoma ligonių su specifiniais Vilsono ligos pažeidimais [29, 45]. Šie metodai nėra tikslūs, bet atlikus keletos skirtingų populiacijų tyrimus buvo nustatyta, kad šios ligos dažnis yra 1:30 000–1:50 000, o heterozigotinių individų dažnis skirtingose populiacijoje svyruoja nuo 1:90 iki 1:150 [4].

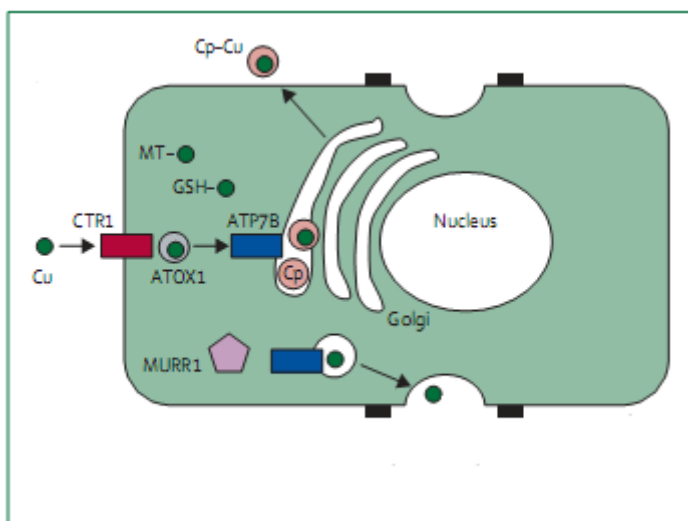
1.2. Vilsono ligos molekuliniai mechanizmai

Vienintelis Vilsono ligos genas yra *ATP7B* (P tipo adenozintrifosfatazė, dalyvaujanti vario transporte) [101, 14]. Šio geno vieta yra 13 chromosomos ilgojo peties viduryje (13q14.3-q21.1) ir jį sudaro 21 koduojantis egzonas. *ATP7B* geno produktas yra ATP7B baltymas, kurio didžiausia raiška yra kepenyse, inkstuose ir placentoje [101]. ATP7B baltymas sudarytas iš šešių vario jonus prijungiančių domenų, transdukcijos domeno (amino rūgštys 837–864, jame yra dažnai pasikartojantis Thr-Gly-Glu motyvas), katijonų kanalo ir fosforilinimo domenų (amino rūgštys 971–1035, jame yra konservatyvus Asp-Lys-Thr-Gly-Thr motyvas), nukleotidų prisijungimo motyvas ir aštuonios hidrofobinės sekos. *ATP7B* geno struktūra pavaizduota 1.2.1 paveiksle.



1.2.1 pav. *ATP7B* geno struktūra

Varis iš kraujo, dalyvaujant hepatocitų plazminėje membranoje esančiam vario transporto baltymui (CTR1), patenka į kepenų ląstelių citoplazmą. Hepatocituose gliutationas ir metalotioninas susijungia su didžiąja dalimi laisvo vario ir apsaugo ląstelę nuo toksinio vario poveikio. Varis jungiasi su ATOX1 baltymu ir yra transportuojamas ląstelėje. Jeigu ląstelėje vario koncentracija yra nedidelė tuomet ATP7B baltymas, esantis trans–Goldžio membranoje perkelia varį į Goldžio aparato vidų ir sujungia su ceruloplazminu, sudarydamas vario-ceruloplazmino kompleksą. Vario–ceruloplazmino kompleksas keliauja iš hepatocito į periferinius audinius. Jei vario koncentracija ląstelėje didelė, varis jungiasi su MURR1 baltymu ir vario perteklius patenka į tulžį [4]. Vario patekimo į hepatocitą ir šio metalo apykaitos schema pavaizduota 1.2.2 pav.



1.2.2 pav. Vario patekimo į hepatocitą schema
(modifikuota pagal Afta et.al 2007)

Padidėjus vario koncentracijai įvairių organų ląstelėse (kepenų, galvos smegenų neuronuose, ragenos ir kt. ląstelėse) atsiranda oksidacinių pažeidimų, nulemiančių Vilsono ligos vystymąsi [38]. Tai įrodo ir VL sergančiųjų hepatocitų tyrimai: padidėjęs deguonies laisvųjų radikalų kiekis, lipidų oksidacija bei atsirandantys DNR pažeidimai [4].

Vilsono ligos atveju nėra visiškai aiški genotipo – fenotipo sąsaja, kadangi ir mutacijų pobūdis atskiruose ATP7B baltymo dalyse ir laisvųjų radikalų padidėjimas ląstelėje nepaaiškina visų atsirandančių pokyčių. Tiriant bakterijas įrodyta, kad varis konkuruodamas su geležimi gali pakeisti geležies atomus ir susidaręs vario-fermentų kompleksas sutrikdo normalią elektronų pernašos

grandinę [60]. Šis elektronų pernašos grandinės sutrikdymas gali įtakoti laisvųjų radikalų padidėjimą bei simptomų atsiradimą.

1.3. Vilsono liga: molekulinė genetika

Sekoskaita arba kitais molekuliniais genetiniais metodais ištyrus Vilsono liga sergančiųjų *ATP7B* geną nustatyta daugiau negu 500 mutacijų (Kardifo universiteto Velse mutacijų duomenų bazės duomenimis) ir (Albertos Universiteto Kanadoje Vilsono ligos mutacijų duomenų bazės duomenimis). Dauguma nustatytų mutacijų yra „missens“ (kitapasmės) tipo, retesnės – insercijos (intarpai), delecijos (iškritos), delecijos (iškritos) ir insercijos (intarpai) kartu (indels tipo) bei „sukirpimo“ tipo mutacijos. Skirtingų Europos šalių populiacijose dažnesnė viena arba kelios, specifinės tai populiacijai, mutacijos, kitų rūšių mutacijos būna nustatomos rečiau. Pagal dažniausias mutacijas ir Europos šalių geografinę padėtį yra išskiriamos dviejų grupių šalys: Centrinės, Rytų ir Šiaurės Europos šalių grupė ir Viduržemio jūros regiono šalių grupė [36]. Dažniausia *ATP7B* geno mutacija Centrinės, Rytų ir Šiaurės Europos šalių populiacijose yra c.3207C>A (p.His1069Gln), kurios dažnis šių Europos šalių regionų populiacijose yra 35–40 proc. [36]. Be c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos kitos *ATP7B* geno mutacijos yra būdingos tik tam tikrų šalių populiacijoms. Pvz., Didžiojoje Britanijoje dažna mutacija yra c.2305A>G (p.Met769Val), buvusioms Jugoslavijos tautoms būdinga citozino nukleotido insercija koduojančioje *ATP7B* geno grandinėje tarp 2299 ir 3000 nukleotidų–c.2299insC, Lenkijos gyventojams būdinga c.3400delC mutacija [24, 36, 41].

Centrinės, Rytų ir Šiaurės Europos šalių populiacijoms būdingos *ATP7B* geno mutacijos apibendrintos 1.3.1 lentelėje.

1.3.1 lentelė. Dažniausios *ATP7B* geno mutacijos Centrinės, Rytų ir Šiaurės Europos šalių populiacijose (modifikuota pagal Ferenci 2006)

Šalis (nuoroda)	N	Dažniausia mutacija (dažnis proc.)	Egzonas	Kitos dažnos mutacijos (dažnis proc.)	Egzonas
Švedija(Waldenstrom et al.1996)		c.3207C>A (p.His1069Gln) (33)	14	c.2930C>T (p.Thr977Met) et)	13
Danija (Moller et al. 2011)	41	c.3207C>A (p.His1069Gln) (18)	14	c.2336G>A (p.Trp779Stop)	8
Austrija (Ferenci P (2005b)	125	c.3207C>A (p.His1069Gln) (34,1)	14	c.2128G>A (p.Gly710Ser) (6,4)	8
Vokietija (Ferenci 2005b; Caca et all. 2001)	243	c.3207C>A (p.His1069Gln) (34,1)	14	c.3400delC p.Pro1134fs (4,3)	15
Beniliukso šalys (Ferenci 2005b)	53	c.3207C>A (p.His1069Gln) (48,1)	14		
Jungtinė karalystė (Curtis et al. 1999)	42	c.3207C>A (p.His1069Gln) (17)	14	c.2305A>G (p.Met769Val) (8)	8
Lenkija (Gromadzka et al. 2005)	142	c.3207C>A (p.His1069Gln)	14	c.3400delC p.Pro1134fs (7,3)	15
Čekija ir Slovakija (Vrabelova et al. 2005)	200	c.3207C>A (p.His1069Gln) (57)	14	c.3402delC (3,4)	15
Vengrija (Falhoffer et al. 2007)	109	c.3207C>A (p.His1069Gln) (71 proc.)	14		
Buvusios Jugoslavijos šalys (Ferenci 2005(b))	35	c.3207C>A (p.His1069Gln) (48,9)	14	c.2299insC (p.Pro767fs)	8
Bulgarija (Todorov et al., 2005)	89	c.3207C>A (p.His1069Gln) (58,8)		c.2299insC (p.Pro767fs)	8

Viduržemio jūros regiono šalyse *ATP7B* geno c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacija yra retesnė, bet ši mutacija taip pat yra dažniausiai nustatoma Viduržemio jūros šalyse. Dažniausiai ši mutacija yra nustatoma žemyninėje

Italijoje, Graikijoje ir Turkijoje. Sardinijos gyventojams yra būdinga -441/-447 del mutacija, žemyninėje Ispanijoje p.Met645Arg, mutacija, o Kanarų salose (p.Leu708Pro) mutacija [55, 56, 39, 61].

Dažniausios *ATP7B* geno mutacijos Viduržemio jūros šalių regiono populiacijose nurodytos 1.3.2 lentelėje.

1.3.2 lentelė. *Dažniausios ATP7B geno mutacijos Viduržemio jūros šalių regiono populiacijose*

Šalis (nuoroda)	N	Dažniausia mutacija (dažnis proc.)	Egzonas	Kitos dažnos mutacijos (dažnis proc.)	Egzonas
Žemyninė Italija (Loudianos 1998)	99	c.3207C>A (p.His1069Gln) (13)	14	c.2299insC (6)	8
Kanarų salos (Garsia – Villareal et al., 2000)	24	p.Leu708Pro (64)	8		
Žemyninė Ispanija (Margarit et al., 2005)	40	p.Met645Arg (27)			
Graikija (Panagiotakaki et al. 2004)	63	c.3207C>A (p.His1069Gln) (35)	14	p.R969Q (12)	13
Turkija (Ferenci 2005)	80	c.3207C>A (p.His1069Gln) (9,4)	14	A1003T (5,6)	13
Sardinija (Loudianos 1998)	40	-441/-427 del (60,5)	Promotorius	2463delC	10

Azijos šalyse dažniausia nustatoma c.2333G>T (p.Arg778Leu) mutacija, kuri reta Europos šalyse [42]. Vienintelė ši mutacija yra labiau paplitusi Azijos šalių populiacijose, ji sudaro 34 proc. – 38 proc. mutacijų. Kitų kontinentų šalims taip pat būdingos savitos mutacijos. Pvz., Indijoje dažniausiai nustatoma c.813C>A (p.Cys271Ter) mutacija, Saudo Arabijoje - c.4193delC (p.Ser1398fs) mutacija. Dažniau pasitaikančios *ATP7B* geno mutacijos ne Europos kontinento šalyse yra nurodytos 1.3.3 lentelėje.

1.3.3. lentelė. *ATP7B geno dažniausios mutacijos ne Europos šalių populiacijose*

Šalis (nuoroda)	n	Dažniausia mutacija (dažnis proc.)	Egzonas	Kitos dažnos mutacijos (dažnis proc.)	Egzonas
Kinija (Giu et al. 2003, Liu et al. 2004, Wu et al. 2000)	150	c.2333G>T (p.Arg778Leu) (37,1)	8		
Japonija (Okadaet al. 2000; Shimzuet al. 1995)	70	c.2874delC (30) 2871delC (15,9)	13	c.2333G>T (p.Arg778Leu) (13,4)	8
Korėja (Kim et al. 1998)	?	c.2333G>T (p.Arg778Leu) (37,5)	8		
Brazilija (Deguti et al. 2004)	46	c.3400delC (30,8)	15	p.Leu708Pro	8
Saudo Arabija (Al Jumah et al. 2004)	56	p.Gln1399Arg (32)	21	p.Ser774Arg (16)	8

1.4. Vilsono liga: klinikiniai simptomai

Wilson ir kt. 1912 metais pirmą kartą aprašė šią ligą kaip nozologinį vienetą. Jau 1912 metais. S. A. Vilson nurodė, kad labiausiai būdingi šiai ligai yra kepenų ir nervų sistemos pažeidimai. Rečiau būna psichikos pažeidimų požymių ar nustatomas Kaizerio Flaišerio žiedas. Dar rečiau pasitaiko–inkstų pažeidimas, hemolizinė anemija ar kitų sistemų pažeidimai. Vilsono ligos klinikiniai požymiai apibendrinti 1.4.1 lentelėje. Kiekvienai organų sistemai yra būdingi saviti pakitimai, kurie apžvelgiami kituose šio skyriaus poskyriuose.

1.4.1 lentelė. Vilsono liga sergančiųjų klinikiniai požymiai

Požymis	Dažnis (proc.)	Pasireiškimo laikas	Kepenų liga	Neurologinė liga	Psichikos pokyčiai	Kaizerio Flaišerio žiedas (proc.)
Kepenų liga	~40	6-45 (3-70)	+	+/-	+/-	~50
Neurologinė liga	~40	6-50	-/ Vidutinio sunkumo	+	+/-	~90
Psichikos pokyčiai	~20	Paauglystė-jaunystė	-/ vidutinio sunkumo	+/-	+	~90
Hemolizinė anemija	Keletui	Paauglystė-jaunystė	+	-	-	+

1.4.1. Virškinimo organų sistemos pažeidimai

Kepenų pažeidimo požymiai yra dažniausiai pasitaikantys Vilsono ligos klinikiniai pasireiškimai. Anksčiausiai pasireiškiantys požymiai aprašyti literatūroje buvo nustatyti šešerių metų pacientams, vėliausiai liga diagnozuota aštuntajame dešimtmetyje [4, 110]. Dažniausiai liga pasireiškia trečiajame–ketvirtajame gyvenimo dešimtmetyje nuolat recidyvuojančia gelta. Taip pat Vilsono ligai būdinga gelta būna dėl hemolizės arba pasikartojančio kepenų uždegimo. Retai kepenų pakenkimo požymiai yra greitas nuovargis, anoreksija, dešiniojo pašonkaulio skausmas ir autoimuninio hepatito požymiai – artropatija, odos bėrimai, gelta bei pilvo skausmai [4]. Sunkiausia kepenų pažeidimo forma – ūmus kepenų nepakankamumas, kuriam būdingas sutrikęs kraujo krešėjimas, encefalopatija, intravaskulinė hemolizė ir atsirandantis ir greitai progresuojantis inkstų nepakankamumas [77]. Lėtinio kepenų pažeidimo metu būna portinė hipertenzija, splenomegalija, ascitas, hipoalbuminemija bei koagulopatija. [4]. Tiriant kepenų pakitimus biopsijos būdu nustatoma kepenų cirozė, fibrozė, nekrozavusios ląstelės. Retai randama kepenų nekrozė be cirozės ir fibrozės [102, 92].

1.4.2. Nervų sistemos pažeidimai

Neurologiniai ir psichinės veiklos pokyčiai nustatomi 40 proc.–50 proc. sergančiųjų Vilsono liga. Yra pagrindinės dvi nervų sistemos pažeidimo klinikinės formos:

- 1) akinetinis-rigidinis sindromas ar distoninis pažeidimas;
- 2) sindromas, kuriam būdingas tremoras, ataksija, mikrografija, chorėja ar choreoatetozė [100].

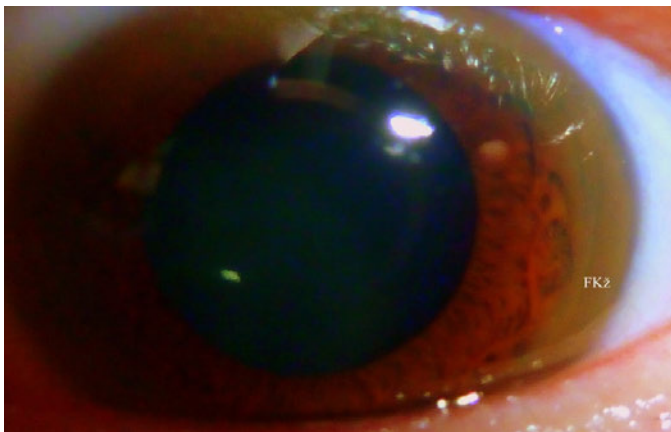
Subtilūs pažeistos nervų sistemos požymiai gali būti nustatomi iki ryškių, aukščiau minėtų simptomų komplekso pasireiškimo. Jie pasireiškia elgesio pokyčiais, blogesniais mokymosi rodikliais ir nesugebėjimu atlikti veiksmus, kuriems reikalinga gera rankų–akių koordinacija.

Kiti neurologiniai simptomai yra tremoras, sutrikusi motorinė koordinacija, seilėtekis, dizartrijs, distonija ir padidėjęs spastiškumas. Kartu su elgesio pokyčiais būna ir depresija bei nerimas. [4].

Tiriant Vilsono liga sergančiųjų galvos smegenis branduolinio magnetinio rezonanso būdu nustatomi ir morfologiniai pokyčiai uodeguotajame branduolyje, kiaute, blyškiajame kamuolyje, tarpinių smegenų gumbure, vidurinėse smegenyse, tilte ir smegenėlėse. Galvos smegenų žievėje išsivysto atrofija ir baltos smegenų medžiagos pakitimai. Pomirtinio galvos smegenų tyrimo metu nustatomi ląsteliniai pakitimai yra padidėjęs astrocitų kiekis pilkojoje galvos smegenų žievėje, sumažėjęs neuronų kiekis, gliozė ir daug fibrilinio proteino [51, 98].

1.4.3. Kitų organų ir sistemų pakitimai

Du dažniausi sergančiųjų Vilsono liga akių pakitimai yra Kaizerio-Flaišerio žiedas (toliau – KFŽ ir „saulėgrąžos formos“ katarakta). KFŽ atsiranda dėl besikaupiančio vario ragenos Descemeto membranoje. KFŽ parodytas 1.4.3.1 paveiksle.



1.4.3.1 pav. Lietuvos VL sergančiojo Kaizerio-Flaišerio žiedas ragenoje

„Saulėgrąžos“ katarakta matoma tik plyšine lempa. Ši kataraktos forma regėjimo nesutrikdo. Retesni akių pakitimai yra vištakumas, optinis neuritas ir optinio disko blyškumas.

Kiti reti ekstrahepatiniai simptomai – hipoparatiroidizmas, nevaisingumas, pasikartojantys nėštumo nutrūkimai bei inkstų pakitimai (Fankonio sindromas). Be Fankonio sindromo, kurio metu sutrinka amino rūgščių ir kitų reikalingų organizmui medžiagų reabsorbcija būna hiperkalciurija bei nefrokalcinozė. Ji atsiranda dėl kanalėlių reabsorbcijos sutrikimų [59].

Labai reti kitų organų sistemų pažeidimai yra osteoporozė, osteomaliacija, spontaniniai lūžiai, suaugusiųjų rachitas, osteochondrozė, disekuojantis osteochondritas, chondrocalcinozė, subchondrinių cistų formavimasis ir pirštų pokyčiai. Besikaupiantis varis širdyje gali sukelti kardiomiopatiją ir aritmijas, nors tokie simptomai yra reti.

1.5. Vilsono liga: biocheminiai pokyčiai

Suaugusio žmogaus organizme yra apie 100 mg vario, kurio pusiausvyra yra palaikoma reguliuojant vario absorbciją virškinamajame trakte ir išskyrimą su tulžimi. Kiekvieną dieną su maistu į mūsų organizmą patenka 4–6 mg vario, kurio 40 proc. (1,6–2,4 mg) yra absorbuojama ir tiek pat netenkama su tulžimi [66]. Varis yra absorbuojamas skrandyje ir dvylikapirštėje žarnoje ir į vartų venos kraujotaką patenka susijungęs su baltymu albuminu arba amino rūgštimi histidinu. Dalis vario patenka į kepenis, dalis nukeliauja į periferinius organus (raumenis ir smegenis). Vario pasiskirstymo organizme mechanizmas, kurį reguliuoja kepenys, kol kas nėra galutinai aiškus. Šiuo metu nustatyta, kad biocheminiai pokyčiai vykstantys sergančiųjų Vilsono liga padeda šios ligos biocheminei diagnostikai. VL patvirtinti ir nustatyti naudojami biocheminiai tyrimai: ceruloplazmino koncentracija kraujo serume, vario išskyrimas su šlapimu bei vario koncentracija kepenyse. Vilsono ligai yra būdinga sumažėjusi ceruloplazmino koncentracija ($<0,2$ g/l). Tiesa, jau Steindl ir kt. 1997 metais nustatė, kad 5 proc. sergančiųjų Vilsono liga, pasireiškusia neurologiniais simptomais, ceruloplazmino koncentracija buvo normali ir net 40 proc. sergančiųjų Vilsono liga, kuriems buvo būdingi kepenų pažeidimai, ceruloplazmino koncentracija kraujyje taip pat buvo normali. 20 proc. heterozigotinių asmenų kraujyje ceruloplazmino koncentracija buvo mažesnė negu $0,2$ g/l, t.y. buvo gauti klaidingai teigiami rezultatai. Vario išskyrimas su šlapimu per parą dažniausiai būna padidėjęs simptomine Vilsono liga sergantiesiems (daugiau negu $0,6$ μmol /per 24 valandas). Šis metodas buvo jautriausias ir specifiskiausias sergančiųjų Vilsono liga. Sergant VL vario koncentracija kepenyse taip pat yra padidėjusi. Ji yra didesnė negu 250 $\mu\text{g/g}$ sauso kepenų svorio (norma: <55 $\mu\text{g/g}$ sauso svorio). Šis biocheminis metodas taip pat nėra pakankamai jautrus ir specifiskas, kadangi vario koncentracija kepenyse gali būti padidėjusi ir sergant kitomis lėtinėmis kepenų ligomis [4].

1.6. Vilsono ligos genotipo - fenotipo sąsaja

Skirtingų mokslininkų grupių atlikti tyrimai siekiant nustatyti genotipo – fenotipo sąsają yra prieštaringi. Kai kurių tyrimų duomenimis nustatyta, kad mutacijos, kurioms būdingas ATP7B baltymo sutrumpėjimas, lemia ankstyvą ligos pradžią. Ankstyva ligos pradžia ir kepenų pažeidimai buvo išaiškinti c.2333G>T (p.Arg778Leu) mutacijos atveju [114]. Stapelbroek ir kt. (2004) nustatė, kad dažniausiai Europoje nustatytai mutacijai c.3207C>A (p.His1069Gln) yra būdinga sąsaja su vėlyva pradžia ir neurologinių požymių raiška [25]. Kitų autorių atlikti tyrimai neparodė genotipo-fenotipo asociacijos [31]. Aprašyti atskiri ligos atvejai, kad esant vienodiems genotipams VL klinikinė eiga buvo skirtinga. Monozigotiniams identiškiems dvyniams buvo nustatyta visiškai skirtinga ligos eiga (fulminantinis hepatitas vs. ikisimptominis kepenų pažeidimas). Tokią skirtingą ligos eigą lemia nevienodas aplinkos poveikis ir epigenetiniai pokyčiai [25]. Vis dėlto mutacijos, kurių metu pažeidžiamos konservatyvios ir (ar) svarbios funkciniai požūriū sekos, lemia ankstyvą kepenų pažeidimo atsiradimą [31]. Jei mutacija pažeidžia ne tokius svarbius ATP7B baltymo domenų pirmiausia pažeidžiama nervų sistema. Dauguma ATP7B geno mutacijų yra retos, unikalios, todėl sergantieji Vilsono liga dažnai yra sudėtiniai heterozigotai.

Tiriant retesnes mutacijas nustatyta, kad „beprasms“ (nonsens) ir „rėmelio poslinkį“ sukeliančios mutacijos c.2807T>A (p.Leu936Ter), c.865C>T (p.Gln289Ter) ir c.2530delA (p.K844fs) yra būdingos sunkesnei ir anksčiau pasireiškiančiai Vilsono ligos formai [21]. „Kitaprasms“ (misens) mutacijos sukelia lengvesnius ligos požymius. Mutacijos (genotipas c. [3833C>T]; [3833C>T] p. [Thr1288Arg]; [Thr1288Arg]) homozigotiniams individams nustatoma lėtai progresuojanti kepenų liga. Homozigotinio genotipo c.[3207C>A]; [3207C>A] p.[His1069Gln]; [His1069Gln] arba c.[2906G>A]; [2906G>A] p.[Arg969Gln]; [Arg969Gln] individams būdinga taip pat būdinga lėta eiga ir vėlai pasireiškiantys klinikiniai Vilsono ligos požymiai [31]. Azijos šalių pacientų genotipas c.[2333G>T];[2333G>T] p.[Arg778Leu];[Arg778Leu] lėmė ankstyvą ligos raišką bei kepenų ligos pažeidimus [54]. Klinikinei ligos išraiškai turi aplinkos ir (ar) genetiniai faktoriai, t.y vario kiekis maiste, metalotionino sugebėjimas prijungti metalo jonus bei sugebėjimas pašalinti metalo jonų perteklių (gliutatio, superoksido dismutazės ir šiluminio šoko proteinų kiekis) bei genai modifikatoriai, kurie gali keisti ATP7B geno veiklą [21].

1.7. Geležies apykaitos mechanizmas

Geležis yra mikroelementas, kuris įeina į kvėpavimo grandinės I ir II komplekso baltymų sudėtį ir dalyvauja oksidacijos - redukcijos reakcijose. Hemo geležis, esanti hemoglobino ir mioglobino baltymo molekulėje, dalyvauja transportuojant deguonį.

Geležies apykaitos sutrikimų metu būna padidėjusi arba sumažėjusi geležies koncentracija audiniuose. Šio elemento trūkumas lemia mažakraujystę ir sutrikusius oksidacijos - redukcijos procesus ląstelėse, o padidėjusi koncentracija sąlygoja žalingą organizmui laisvųjų radikalų formavimąsi audiniuose [109]. Todėl geležies homeostazėje yra būtina griežta kontrolė tarp geležies patekimo į organizmą ir jos netekimo. Per parą į žmogaus organizmą patenka 15–20 mg geležies, kurios dvylikapirštėje žarnoje absorbuojama tik 10–15 proc. (0,5–1,5 mg). Toks pat geležies kiekis netenkamas vykstant žarnyno ir kitų organų epitelinio audinio ląstelių deskvamacijai, senų eritrocitų ardymui, o moterys geležies netenka menstruacijų, nėštumo metu ir maitinant kūdikį pienu. Geležis absorbuojama dviejų formų: esanti hemo ir nehemo grupių sudėtyje. Absorbuojama nehemo grupės geležis būna trivalentė. Ji redukuojama dalyvaujant geležies – chelato reduktazės baltymui (toliau – CYBRD1) baltymui, kuris yra dvylikapirštės ir viršutinės tuščiosios žarnos enterocitų plazminės membranos baltymas. Redukavus nehemo geležį transmembraninis dvivalenčių metalų pernešėjas (toliau – DMT1) dvivalentę geležį perneša į enterocitus. Enterocituose dvivalentė geležis jungiasi su feritinu ir saugoma arba feroportino (toliau – FPN) pagalba per bazolateralinę membraną perkeliama į intersticiumą [46].

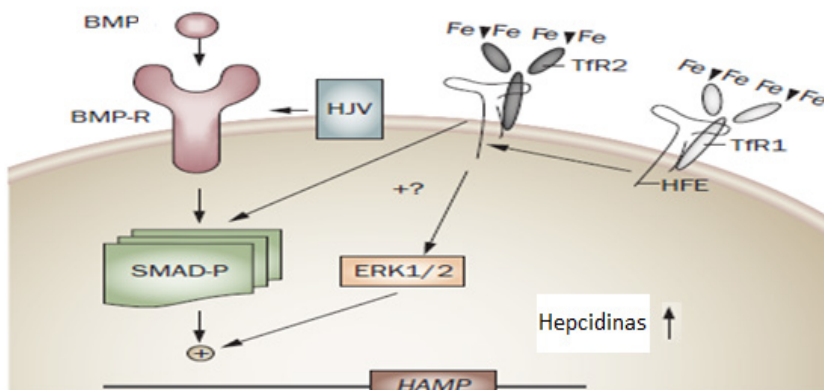
Mitybinio hemo geležies absorbcijos mechanizme dalyvauja baltymas - folatų pernešėjas (su protonu susietas folatų pernešėjas (toliau – PCFT)). Į enterocitą patekusi geležis veikiant baltymui hemooksigenazei (toliau – HO1) yra atskiriama nuo hemo, oksiduojant geležį (susidaro trivalentė geležis) bei susidarant anglies monoksidui. Trivalentė geležis ląstelėje vėl redukuojama iki dvivalentės ir saugoma enterocite susijungusi su feritinu arba transportuojama iki feroportino. Feroportinas esantis enterocitų plazminėje membranoje perkelia dvivalentę geležį į intersticiumą, kur baltymas hefestinas redukuoja dvivalentę geležį iki trivalentės. Transferinas (toliau – Tf), esantis kraujo plazmoje, transportuoja Fe^{3+} į eritrocitų sintezės vietas [109].

Transferino ir geležies kompleksas sąveikauja su transferino receptoriumi 1 (TfR1), esančiu ląstelių plazminėje membranoje ir receptorinės endocitozės būdu patenka į ląstelės vidų. Į naujai susiformavusias endosomas taip pat perkeliama ir vandenilio jonai. Rūgščioje endosomų terpėje įvyksta transferino ir transferino receptoriaus baltymo konformaciniai pokyčiai, kurių metu atsiskiria geležies jonai [109]. CYBRD1 fermentas, esantis endosomoje

redukuoja Fe^{3+} iki Fe^{2+} , o endosomų membranos DMT1 baltymas perkelia geležį į citoplazmą. Tf ir TfR1 baltymai patenka atgal į ląstelės paviršių ir toliau gali dalyvauti geležies patekimo į ląsteles cikle. TfR1 geno raiška vyksta beveik visose žmogaus organizmo ląstelėse. Tf/TfR1 sąveikos mechanizmu taip pat naudojasi ir kamieninės kaulų čiulpų ląstelės, kurioms reikia didelio geležies kiekio hemoglobino sintezei [39].

Transferino receptoriaus 2 (toliau – TfR2), kurio raiška vyksta hepatocituose, dvilykapištės žarnos gleivinės liaukų ląstelėse ir pirminių kamieninių kaulų čiulpų ląstelėse taip pat sąveikauja su transferinu. Tiesa, sąveika yra silpnesnė ir tolimesnė geležies apykaitos raida nėra žinoma. [39].

Reguliuojant geležies apykaitą žmogaus organizme svarbiausią vaidmenį atlieka baltymas hepcidinas. Hpcidinas yra *HAMP* geno koduojamas 25 amino rūgščių peptidas, kuris sintetinamas hepatocituose [73]. Patekęs į sisteminę kraujotaką jis blokuoja dvilykapištės žarnos enterocitų ir blužnies makrofagų plazminės membranos feroportiną. Feroportinas degraduoja ir geležies perkėlimas į intersticiumą sumažėja. Hpcidinas turi įtakos ir DMT1 baltymo degradacijai, skatindamas ją ir mažindamas geležies patekimą į enterocitus. Pagrindiniai hepcidino sintezę veikiantys faktoriai yra į padidėjusį geležies kiekį reaguojantys ir sintetinami kaulų morfogenetiniai faktoriai (toliau – BMP) [73, 109]. BMP6 yra svarbiausias BMP baltymas, kuris sąveikauja su BMP receptoriais (BMPI ir BMPRII) bei hemojuvelino baltymu (BMPII koreceptoriumi) ir aktyvuoja SMAD baltymus (SMAD 1, 5 ir 8), esančius hepatocito citoplazmoje. Prie aktyvuotų SMAD 1, 5 ir 8 jungiasi SMAD 4 ir visas kompleksas keliauja į branduolį, kuriame skatina hepcidino geno raišką. HFE–TfR1 kompleksas taip pat dalyvauja reguliuojant hepcidino geno raišką. Padidėjus geležies jonų koncentracijai kraujyje HFE baltymas nuo HFE–TfR1 komplekso persikelia ir prisijungia prie TfR2 ir skatina SMAD baltymų veiklą, tuo pačių skatindami hepcidino sintezę. Hpcidino sintezės reguliacija parodyta 1.7.1 paveiksle.



1.7.1 pav. Pagrindiniai hepcidino sintezės reguliavimo mechanizmai

1.8. Padidėjusio geležies kaupimo organizme ligos

Esant sutrikusiems pirminiams geležies absorbcijos reguliavimo mechanizmams sergama hemochromatoze (geležies kaupimosi organizme liga). Pirminės hemochromatozės formos yra:

- 1) su *HFE* genu susijusi hemochromatozė (1 tipo hemochromatozė) – dažniausia hemochromatozės forma;
- 2) juvenilinė hemochromatozė (2 tipo hemochromatozė). Jos priežastis yra genų hemojuvenilo (*HJV*) arba hepcidino (*HAMP*) mutacija;
- 3) su *TFR2* genu susijusi hemochromatozė (3 tipo hemochromatozė);
- 4) su feroportinu susijusi hemochromatozė (4 tipo hemochromatozė).

Visos hemochromatozės formos, jų paveldėjimas, klinikiniai ypatumai apibendrinti 1.8.1 lentelėje.

1.8.1 lentelė. Pirminės hemochromatozės formos ir jų ypatumai

Charakteristika	Su HFE susijusi hemochromatozė. Juvenilinė hemochromatozė	A tipas Juvenilinė hemochromatozė	B tipas	Su TFR2 genu susijusi hemochromatozė	Su feroportinu susijęs geležies perteklius
Genas ir jo vieta chromosomoje	<i>HFE</i> 6p21.3	<i>HJV</i> 1q21	<i>HAMP</i> 19q13.1	<i>TfR2</i> 7q22	SLC40A1 2q32
Geno produktas	HFE baltymas	Hemojuvelinas	Hepcidinas	Transferrino receptorius 2	Ferroportinas
Geno funkcija	Sąveika su transferino receptoriumi 2; hepcidiną moduliuojantis veikimas	Nežinoma	Enterocitų veiklos neigiama reguliacija	Geležies patekimas į hepatocitų ląsteles	Geležies transportavimas iš enterocitų, makrofagų, placentos ląstelių
Paveldėjimo būdas	Autosominis recesyvinis	Autosominis recesyvinis	Autosominis recesyvinis	Autosominis recesyvinis	Autosominis dominantinis
Organai, kuriuose kaupiasi geležis	Kepenys, endokrininės liaukos, širdis	Kepenys, endokrininės liaukos, širdis	Kepenys, endokrininės liaukos, širdis	Kepenys, endokrininės liaukos, širdis	Kepenys, blužnis
Ligos pradžia (dekada)	4 ar 5	2 ar 3	2 ar 3	4 ar 5	4 ar 5

1.9. HFE–hemochromatozės epidemiologija ir molekulinė patogenezė

Pati dažniausia pirminė hemochromatozė–1 tipo hemochromatozė (su HFE–asocijuota hemochromatozė) yra autosominiu recesyviniu būdu paveldima liga (OMIM 235200). Tai lėtinė liga, atsirandanti dėl padidėjusios geležies absorbcijos virškinimo trakte ir dėl to atsirandančio geležies susikaupimo širdyje, kepenyse, kasoje, sėklidėse, odoje ir sąnariuose. HFE–hemochromatozė 1935 metais buvo atpažinta kaip atskira liga Sheldon ir bendraautorių, kurie apibendrino 311 klinikinių atvejų [93]. Jie nustatė, kad HFE hemochromatozė yra įgimta medžiagų apykaitos liga, kurios pasireiškimo dažnis nuo 1/2 000 iki 1/5 000 individų, ja sergama trumpai, ji paveldima recesyviniu būdu ir ligoniai miršta anksti dėl infekcijų ir diabeto komplikacijų.

1977 metais Simon su bendraautorais įrodė, kad HLA 1 klasės antigenai yra sukibę su HFE-hemochromatozės genu [94]. Genotipavimas ir šeimų tyrimai įrodė, kad HFE-hemochromatozės dažnis Europos šalių populiacijose svyruoja nuo 0,79 iki 1,2 proc. [9, 26]. Sveikų žmonių tyrimai parodė, kad sergančiųjų transferino saturacija yra aukšta ir 2/3 ligos atvejų patvirtinama kepenų biopsija [52]. Kohortiniai tyrimai taip pat patvirtino ankstyvos diagnostikos ir flebotomijos svarbą ligos kontroliavimui [71, 72].

HFE-hemochromatozę sukeliančio geno mutacija buvo nustatyta 1996 metais. Tais pačiais metais buvo nustatytos ir pirmosios mutacijos, sukeliančios HFE-hemochromatozę. Šios ligos priežastis yra *HFE* geno, esančio 6 chromosomos trumpajame petyje (geno lokalizacija – 6p21.3), mutacija. Genas yra sudarytas iš 7 egzonų, jo ilgis 13 kbp ir jo produktas yra įvairios HFE baltymo izoformos, kurios susidaro dėl alternatyvaus sukirpimo metu susiformuojančių 9 skirtingų RNR molekulių. *HFE* geno didžiausias produktas yra 321 amino rūgšties HFE baltymas, kuris savo ir pirmine, ir antrine struktūra yra labai panašus į HLA I klasės baltymą. HFE baltymas yra enterocitų plazminėje membranoje ir su beta – 2 mikroglobulinu sudaro heterodimerą. *HFE* geno identifikavimas padėjo nustatyti dvi pagrindines c.845G>A (p.Cys282Tyr) ir c.187C>G (p.His63Asp) mutacijas, sukeliančias 1 tipo hemochromatozę. c.845G>A (p.Cys282Tyr) homozigotiniai individai sudaro nuo 85 proc. iki 90 proc. pacientų Šiaurės Europoje. Šiuo metu yra nustatytos 28 mutacijos *HFE* gene (dažniausiai nustatoma stabdančioji mutacija arba kitapasmė mutacija), bet iš jų svarbiausios yra trys mutacijos–c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys).

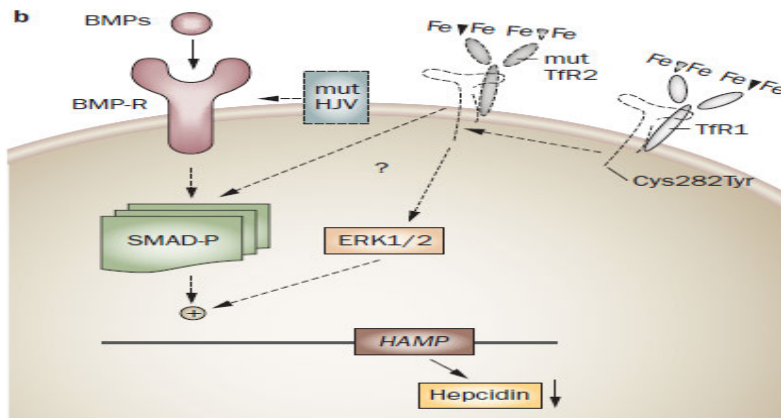
HFE-hemochromatozės atsiradimui svarbiausi keturi mechanizmai: (1) padidėjusi geležies absorbcija plonosiose žarnose, (2) sumažėjusi hepcidino koncentracija organizme, (3) pakitusi HFE baltymo funkcija, (4) dėl geležies poveikio atsiradęs audinių pažeidimas ir fibrinogenezė.

Sutrikusi geležies absorbcija. HFE baltymas, asocijuotas su β_2 –mikroglobulinu, sudaro kompleksą su transferino receptoriais 1. Šis kompleksas buvo nustatytas dvilykapištės žarnos kriptų enterocituose, kurie dalyvauja reguliuojant geležies absorbciją. Jei HFE baltymas yra nepakitęs geležies jonų patekimas nesutrunka, kadangi enterocitai, susiformavę iš kamieninių kriptų ląstelių, absorbuoja normalų geležies jonų kiekį. Dėl *HFE* geno c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys) mutacijų pakitusiam HFE baltymui nesijungiant su Tfr1 baltymu nesudaro normalus HFE–Tfr1 baltymų kompleksas kriptų ląstelių bazolateralinėje membranoje. Sutrinka geležies jonų patekimas į ląstelę ir ląstelė pradeda „badauti“. Todėl iš kriptų ląstelių išsivystę enterocitai pradeda nuolat ir pastoviai absorbuoti ir kaupti padidėjusius geležies kiekius, kurie per feroportino baltymą patenka į kraują. FPN raiška vyksta geležį kaupiančiose

ląstelėse – makrofaguose, enterocituose ir hepatocituose. Šiuo metu manoma, kad „kriptų“ modelis yra ne toks svarbus atsirandant *HFE*–hemochromatozei, kadangi svarbiausias vaidmuo reguliuojant geležies apykaitą tenka hepcidinui [39].

Ekstraląstelinė *HFE* baltymo dalis susideda iš trijų kilpų. *HFE* baltymo struktūra yra panaši į HLA I klasės baltymus, bet *HFE* baltymas nedalyvauja kaip antigeną pateikianti ląstelė. Pagrindiniai mechanizmai, kuriais *HFE* baltymas reguliuoja geležies absorbciją nėra galutinai aiškūs. Bet manoma, kad pakitus *HFE* baltymui sutrinka baltymo atsipalaidavimas nuo Tfr1 baltymo, nesusidaro Tfr2 ir *HFE* baltymo kompleksas ir neskatinama SMAD baltymų komplekso fosforilinimas bei hepcidino raiška.

Pagrindiniai molekulinės patogenezės mechanizmai parodyti 1.9.1 paveiksle.



1.9.1 pav. *Hepcidino sintezė HFE-hemochromatozės metu*

Feroportinas yra geno *SLC40A1* koduojamas transmembraninis baltymas, dalyvaujantis geležies apykaitoje. Šis baltymas būna placentos sincitiotrofoblasto, enterocitų, hepatocitų ir makrofagų plazminės membranos. Ferroportinui sąveikaujant su hepcidinu, vyksta ferroportino degradacija ir sumažėja geležies eksportas į organizmą. Jeigu organizmui reikalinga geležis yra slopinama hepcidino sintezė, padidėja ferroportino sintezė, šis baltymas įtvirtinamas plazminėje membranoje ir padidėja geležies eksportas į organizmą. Šis neigiamojo grįžtamojo ryšio mechanizmas leidžia geležies koncentracijai organizme užtikrinti reikiamą kiekį hemoglobino sintezei ir apsaugoti nuo oksidacinių pežeidimų.

1.10. *HFE* geno mutacijų kilmė

HFE pagrindinių mutacijų c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys) paplitimas yra ištirtas skirtingų šalių populiacijose. Dažniausiai c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija yra nustatoma keltų populiacijose (Airija, Didžioji Britanija, Britanė (Prancūzija)) ir Skandinavijos šalyse. Kol kas dar nėra tiksliai nustatyta c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos kilmė. Siekiant nustatyti mutacijos kilmę buvo atlikti sergančiųjų HLA-A ir HLA-B antigenų tyrimai. Simon ir kt. teigimu *HFE* geno mutavusio alelio c.845G>A (p.Cys282Tyr) kilmės vieta – Centrinės Europos keltų chromosomoje ir keltų migracijos metu ši mutacija paplito dabartinėje Airijos bei Anglijos teritorijoje [94]. Ši mutacija turėjo atsirasti chromosomoje, kurioje buvo HLA A3-B7 arba HLA A3-B14 haplotipo grupė vieno iš keltų genotipe ir kartu su haplogrube paplito Airijoje ir Skandinavijoje. Šiai hipotezei neprieštaruoja ir didesnis c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis Prancūzijos Britanės provincijoje bei šalyse, kurios tradiciškai yra priskiriamos keltų apgyvendintoms teritorijoms. 1981 metais Olsson ir Ritter bei 1983 metais Milman ir Sorensen pasiūlė kitą c.845G>A (p.Cys282Tyr) kilmės hipotezę, kurioje teigė, kad mutacija c.845G>A (p.Cys282Tyr) atsirado vikingų genotipe ir vikingų migracija lėmė c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos paplitimą skirtingose Europos šalyse [69]. Apie 1000 metus Skandinavijos vikingai tapo jūrininkais, kurie apgyvendino jūrų pakrantes Šiaurės Europoje. Todėl ir dabar didžiausias c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis yra nustatomas jūrų pakrantėse Šiaurės Europos regione [69]. Vikingų paplitimas buvo didžiausias Danijoje, Islandijoje, Farerų salose, Norvegijoje, Švedijoje bei Aalandų salose bei yra svarbus ir Škotijoje, Anglijoje, Airijoje ir Šiaurės Prancūzijoje.

1.11. *HFE* geno mutacijų paplitimas

Didžiausias tyrimas, siekiant sužinoti *HFE* geno mutavusių alelių dažnį buvo atliktas JAV 2005 metais [1]. HEIRS studijos metu buvo tirti 99 711 dalyviai, kurie priklausė skirtingoms JAV subpopuliacijoms. Tyrimo metu nustatytas buvo nustatytas skirtingas c.845G>A (p.Cys282Tyr) homozigotinių individų dažnis įvairiose subpopuliacijose – europidų populiacijoje (0,44 proc.), indėnų tarpe (0,11 proc.), ispaniškai kalbančių populiacijoje (0,027 proc.), afroamerikiečių (0,014 proc.), afroazijiečių (0,000039 proc.) [1]. Australijoje taip pat buvo tirtas c.845G>A (p.Cys282Tyr) homozigotinių asmenų dažnis ir nustatyta, kad c.845G>A (p.Cys282Tyr) homozigotų dažnis yra artimas JAV europidų populiacijos dažniui (0,5 proc.) [30]. Pietų ir Centrinėje Amerikoje *HFE* geno alelių dažnis yra rečiausias. Pavyzdžiui, ištyrus Brazilijos indėnus buvo nustatytas tik normalus *ATP7B* geno alelis. [2]. Tuo tarpu mišrioje

Brazilijos populiacijoje c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis buvo 1,1 proc., o c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos dažnis buvo didesnis – 9,8 proc. [2]. Argentinoje c.845G>A (p.Cys282Tyr) ir c.187C>G (p.His63Asp) mutacijų dažniai tirti 2008 metais ir taip pat nustatytas mažas abiejų mutacijų dažnis. Kitose Pietų ir Centrinės Amerikos šalyse HFE-hemochromatozės c.845G>A (p.Cys282Tyr) ir c.187C>G (p.His63Asp) mutacijų taip pat retai nustatomos. Mutacijų dažnis priklauso ir nuo tiriamos populiacijos hogeniškumo, Pvz., Centrinės ir Pietų Amerikos populiacijos yra nevienalytės, jos atspindi buvusią migraciją. Argentinoje tироje *HFE* geno skirtingų alelių paplitimo studijoje buvo tirti ispaniškai kalbantys asmenys, gyvenantys Kordoboje, t.y Centrinėje Argentinos dalyje. Dauguma šių gyventojų yra išeivių iš Ispanijos ir Italijos palikuonys ir šioje Argentinos populiacijos dalyje c.845G>A (p.Cys282Tyr) ir c.187C>G (p.His63Asp) mutacijų dažniai 2,6 proc. ir 6,7 proc. yra panašūs į Italijos ir Ispanijos populiacijose nustatytą mutacijų dažnio paplitimą (Ispanijoje 1,7 proc. ir 16,4 proc. bei Italijoje 1,6 proc. ir 13,3 proc.). Centrinės ir Pietų Amerikos šalių c.845G>A (p.Cys282Tyr) ir c.187C>G (p.His63Asp) mutacijų dažniai pavaizduoti 1.11.1 lentelėje.

1.11.1 lentelė. Centrinės ir Pietų Amerikos šalių c.845G>A (p.Cys282Tyr) ir c.187C>G (p. His63Asp) alelių dažniai

Šalis	Šaltinis	c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis	c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos dažnis
Brazilija (indėnai)	Agosthinko et al. kt. 1999	0 proc.	0 proc.
Brazilija (visa populiacija)	Agosthinko et al. 1999	1,1 proc.	9,8 proc.
Ekvadoras	Leone et al. 2005	0 proc.	3,5 proc.
Venesuela	Vizzi E et al. 2005	3,8 proc.	21,1 proc.
Meksika	Hanzon et al. 2001	0 proc.	13 proc.
Čilė	Wolff C et al. 2006	2,4 proc.	23 proc.
Jamaika	Ropero et al.2006	2,2 proc.	4,4 proc.

Europoje c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija dažniausia Šiaurės Europos šalyse, t.y Airijoje, Didžiojoje Britanijoje ir Skandinavijoje. Didžiojoje Britanijoje *HFE* geno mutacijų paplitimas buvo nustatytas ištirus 10 500 kraujo donorų 2001 metais [48]. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis buvo 8,2 proc., tuo tarpu c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos paplitimas buvo 15,3 proc. [48]. Norvegijoje kelių studijų metu buvo ištirti 2 643 asmenys (kraujo donoriai, ligoninės dirbantieji, ligoniai) ir nustatyta, kad c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija buvo nustatyta 6,8

proc. tirtų chromosomų [27, 105, 64, 28]. Šiek tiek mažesnis dažnis 6,6 proc. buvo nustatytas Farerų salų gyventojų tarpe, tiesa, ištirti buvo 387 asmenys [17, 64].

Danijoje buvo ištirta daugiausia asmenų–19 170 asmenų, siekiant nustatyti c.845G>A (p.Cys282Tyr) ir c.187C>G (p.His63Asp) mutacijų dažnį šios šalies gyventojų populiacijose [63]. Danijoje c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis buvo 5,6 proc., šiek tiek mažesnis už Švedijos 5,8 proc. (ištirti 869 asmenys) ir didesnis už Islandijos, kurioje buvo nustatytas 5,1 proc. alelio dažnis. Rečiausiai c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija buvo nustatyta Suomijoje – 4,1 proc. Mutacija retesnė vokiškai kalbančiose šalyse: Vokietijoje c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija nustatyta 4,5 proc., Austrijoje 4,6 proc. ir Šveicarijoje šios mutacijos dažnis buvo tiksliai 2,5 proc. [87, 49]. Rytų ir Centrinės Europos šalių populiacijose c.845G>A (p.Cys282Tyr) nustatytas mutacijos dažnis buvo panašus. Katovicų regione ištyrus 871 asmenį buvo nustatytas 3,1 proc. c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis [67].

Čekijoje dažnis buvo 3,4 proc., Estijoje bei vakarinėje Rusijos dalyje buvo nustatytas 3,5 proc. mutavusio *HFE* geno c.845G>A (p.Cys282Tyr) alelis tiriamųjų genotipuose [84]. Pietinėse slavų respublikose mutacijos c.845G>A (p.Cys282Tyr) dažnis taip pat panašus – Slovėnijoje 3,6 proc., Kroatijoje 3,3 proc. ir didesnis dažnis nustatytas tik Bosnijoje ir Hercegovinoje 4 proc. Šios mutacijos dažnis yra mažiausias Pietų Europos šalių tarpe. Ispanijoje c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos nustatytas dažnis buvo 2,9 proc. Rumunijoje mutacijos dažnis - 1,75 proc., nedidelis jis buvo ir pietinėje slavų respublikoje–Serbijoje ir Juodkalnijoje (1,6 proc.). Kai kuriose šalyse mutacija nebuvo nustatyta. Bulgarijoje ištyrus 100 asmenų nerasta nei homozigotinio, nei heterozigotinio asmens. Graikijoje c.845G>A (p.Cys282Tyr) alelio dažnis buvo nustatytas 0,3 proc, kito tyrimo metu nebuvo nustatyta nei vieno asmens, kuris būtų homozigotas ar sudėtinis heterozigotas.

HFE geno mutacijos c.187C>G (p.His63Asp) tyrimai įrodė, kad didžiausias šios mutacijos dažnis yra Baskų ir Katalonų tautose. Rytų ir Centrinės Europos tautų tarpe c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos dažnis - Slovėnijoje buvo 12,8 proc., Kroatijoje 14,5 proc., Čekijoje 15 proc., Serbijoje ir Juodkalnijoje 15,7 proc. ir dažniausiai mutacija nustatyta Lenkijoje 16,2 proc. Pietų Europos šalyse didžiausias c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos dažnis 23 proc. buvo nustatytas Bulgarijoje, retesnė ši mutacija buvo Graikijoje ir Rumunijoje. Graikijoje Papazoglu ir kt. 2003 metais nustatė, kad c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos dažnis yra 8,85 proc., Papanikolau duomenimis dažnis buvo 14,6 proc. Iš Pietų Europos šalių rečiausiai c.187C>G (p.His63Asp) mutacija buvo nustatyta Rumunijoje–13,3 proc. atvejų. Europos šalyse rečiausiai mutacija buvo nustatoma Skandinavijos šalyse. Mažiausias dažnis c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos buvo Suomijoje 10,1 proc., dažniau

mutacija buvo sutinkama Islandijoje (10,9 proc.), Norvegijoje (11,4 proc.), Švedijoje (12,1 proc.) bei Danijoje (12,8 proc.). Vienintelėse Farerų salose c.187C>G (p.His63Asp) dažnis buvo didesnis negu 15 proc. (15,2 proc.).

c.193A>T (p.Ser65Cys) alelio dažnis buvo nustatytas ne visose Skandinavijos šalyse. Tirtose šalyse p.S65C alelio dažnis buvo panašus išskyrus Suomiją (2,2 proc.), tuo tarpu Danijoje c.193A>T (p.Ser65Cys) alelio dažnis buvo 1,8 proc., Švedijoje 1,4 proc. ir Farerų salose 1,0 proc.

1.12. HFE – hemochromatozės formos

Yra trys HFE-hemochromatozės formos:

- a) klinikinė HFE-hemochromatozė (dėl padidėjusio geležies kaupimo atsiranda vidaus organų pažeidimas);
- b) biocheminė HFE-hemochromatozė (vidaus organų pažeidimo nėra, bet yra biocheminiai geležies kaupimosi sukelti pokyčiai ir genotipas, lemiantis ligos išsivystymą – padidėjusi transferino saturacija ≥ 45 proc. ir padidėjusi feritino koncentracija – vyrams >300 ng/ml ir moterims >200 ng/ml);
- c) asimptominė (latentinė) HFE-hemochromatozė (nėra klinikinių ir biocheminių požymių, bet asmuo turi genotipą, kuris gali lemti ligos išsivystymą – c. [3207C>A]; [3207C>A] p. [His1069Gln]; [His1069Gln] arba c. [845G>A]; [187C>G] p. [Cys282Tyr]; [His63Asp].

Klinikinė HFE-hemochromatozės diagnozė patvirtinama remiantis klinikiniais požymiais, biocheminiais rodikliais (padidėjusiu transferino įsisotinimo geležimi laipsniu bei padidėjusia feritino koncentracija serume) ir molekuliniiais genetiniais tyrimais. Ligos pradžia pasireiškia nespecifiniais požymiais: pilvo skausmu, bendru silpnumu, letargija ir svorio kritimu. Sergant klinicine HFE-hemochromatoze pažeidžiamos kepenys, kasa, širdis, sąnariai, sėklidės ir oda. Kepenų pažeidimas ligos pradžioje gali pasireikšti kepenų fermentų koncentracijos padidėjimu ir (ar) nespecifiniais simptomais. Be šių pakitimų, progresuojant ligai, atsiranda hepatomegalija, kepenų cirozė, hepatoceliulinė karcinoma. Pažeidžiami ir kiti organai: kasa (atsiranda cukrinis diabetas), širdis (kardiomiopatija), sėklidės (hipogonadizmas), sąnariai (artritas) ir padidėja odos pigmentacija. Dažniau klinicine HFE-hemochromatozės forma serga vyrai, rečiau moterys (moterims pasireiškia 40–60 gyvenimo metais, po menopauzės). Klinikinė HFE-hemochromatozė nustatoma retai, dažnesnė yra biocheminė forma, kuriai būdingi transferino saturacijos ir feritino koncentracijos pokyčiai. Esant klinikiniams požymiams ar transferino saturacijai ≥ 45 proc. ir padidėjus feritino koncentracijai – vyrams >300 ng/ml ir moterims >200 ng/ml ši liga gydoma flebotomija. Flebotomija lėmė pagerėjusį išgyvenamumą, kepenų biocheminių rodiklių sunormalėjimą, sumažėjusią odos pigmentaciją ir hepato-

megalią bei diabeto eigos pagerėjimą. Jei gydymas nepradedamas laiku, mirties priežastimi dažniausiai būna su ciroze susijusi hepatoceliulinė karcinoma. Klinikinė eiga siejama su nevysišku geno penetrantiškumu ir yra nustatyta, kad penetrantiškumas yra skirtingas homozigotinių ir sudėtinių heterozigotinių asmenų. Padidėjusi transferino saturacija ir feritino koncentracija yra nustatoma daugeliui asmenų, bet ne visiems. Didžiausios studijos metu atliktas penetrantiškumo tyrimas įrodė, kad asmenims, kurių genotipas yra c. [3207C>A]; [3207C>A] p. [Cys282Tyr]; [Cys282Tyr] tikimybė, kad susirgs klinicine HFE-hemochromatoze yra 28 proc. [1]. Įvairių autorių duomenys skiriasi, kadangi įtakos turi skirtinga pacientų sekimo trukmė ir klinikinių kriterijų vertinimo parinkimas. Prancūzijoje ištyrus 9 396 asmenis nustatyta, kad 0,5 proc. populiacijos buvo c. 3207C>A (p. Cys282Tyr) mutacijos atžvilgiu homozigotiniai individai. 90 proc. homozigotinių individų turėjo nors nors vieną klinikinį požymį ir tikrai 60 proc. moterų buvo nors vienas simptomas. Dažniausi simptomai buvo geležies perteklius ir lėtinis nuovargis. Dvidešimt procentų pacientų sirgo artritu ir 5–10 proc. sirgo diabetu arba jiems buvo padidėjusi alanininės transaminazės koncentracija [12].

Asmenų, kurių genotipas buvo c. [845G>A]; [187C>G] p. [Cys282Tyr]; [His63Asp] penetrantiškumas yra mažas: 0,5–2 proc. Dauguma tokių žmonių turi turėti ir kitus faktorius (alkoholizmas, virusinis hepatitas), kurie nulemtų geležies pertekliaus atsiradimą [42].

1.13. HFE-hemochromatozės laboratoriniai pakitimai

Transferino saturacija (TS) yra ankstyvas HFE-hemochromatozės biocheminis požymis, kuris nekoreliuoja su klinikinių požymių pasireiškimu. Siekiant nustatyti transferino saturacijos ir feritino koncentracijos padidėjimo specifiškumą ir jautrumą diagnozuojant HFE-hemochromatozę buvo įrodyta, kad 80 proc. asmenų, turinčių genotipą, lemiantį HFE-hemochromatozę, yra padidėjusi TS.

Danijoje ištyrus daugiau negu 6000 vyrų nustatyta, kad 89 proc. vyrų, kurių genotipas buvo c. [3207C>A]; [3207C>A] p. [Cys282Tyr]; [Cys282Tyr] TS buvo didesnė negu 50 proc. [63].

Hemochromatozės ir padidėjusios geležies absorbcijos studijos metu (toliau – HEIRS hemochromatosis and iron-overload screening) ištyrus 100 000 JAV ir Kanados gyventojų TS 84 proc. vyrų, kurių genotipas c. [3207C>A]; [3207C>A] p. [Cys282Tyr]; [Cys282Tyr] buvo padidėjusi. 73 proc. moterų, kurių genotipas buvo c. [3207C>A]; [3207C>A] p. [Cys282Tyr]; [Cys282Tyr] TS >45 proc. ir daugiau [1]. Serumo feritino koncentracija taip pat padidėja sergant HFE-hemochromatoze. Ji didėja, jei negydoma HFE-hemochromatozė, bet jos padidėjimas nėra specifinis rodiklis (feritino koncentracija padidėja uždegimų ir neoplastinių ligų metu).

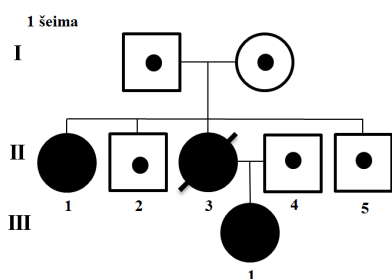
2. METODIKA

2.1. Tiriamieji

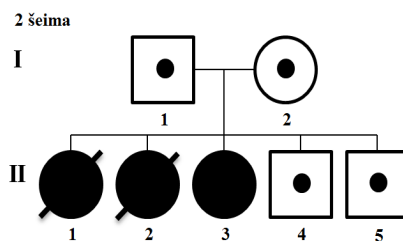
2.1.1. Vilsono liga sergantieji ir jų giminaičiai

1999–2012 metais Lietuvos Sveikatos Mokslų Universiteto ligoninės Kauno klinikų gastroenterologijos, neurologijos ir vaikų ligų klinikose buvo ištirti 27 Vilsono liga sergantieji iš 22 negiminingų šeimų. Vilsono liga sirgo devyniolika moterų ir aštuoni vyrai. Liga buvo patvirtinta remiantis klinikiniais ir laboratoriniais Vilsono ligos kriterijais (aštuntas tarptautinis Vilsono ligos susitikimas (2001 metai Leipcigas)) [34]. Genotipas ištirtas ir 20 Vilsono ligos pirmos eilės giminaičių. Pirmosioms keturioms šeimoms (3.2.1 lentelė) *ATP7B* geno visų egzonų tyrimas atliktas Berlyno „Charite“ klinikoje, prof.H.J.Schmidto vadovaujamoje laboratorijoje. Kitų pacientų tirta tik c. 3207C>A (p.His1069Gln) mutacija.

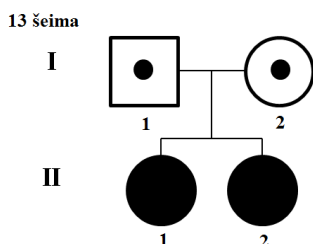
Iš dvidešimt dviejų šeimų aštuoniolikoje šeimų buvo tik vienas sergantis. Keturiuose šeimose buvo du ar daugiau sergančiųjų. Šeimų, kuriose buvo daugiau negu vienas sergantis genealoginės schemos pateiktos 2.1.1.1–2.1.1.4 paveiksluose.



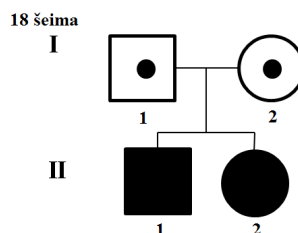
2.1.1.1 pav. 1 šeimos genealoginė schema



2.1.1.2 pav. 2 šeimos genealoginė schema



2.1.1.3 pav. 13 šeimos genealoginė schema



2.1.1.4 pav. 18 šeimos genealoginė schema

2.1.2. Savanoriai kraujo donorai

HFE-hemochromatozės alelių c. 845G>A (p. Cys282Tyr), c. 187C>G (p.His63Asp) ir c. 193A>T (p. Ser65Cys) dažnis buvo nustatytas ištyrus 1 011 savanorių kraujo donorų – 583 vyrus ir 428 moteris. Savanorių kraujo donorų bandiniai buvo renkami Nacionaliniame kraujo centre bei Kraujo donorystės centruose. Tiriamųjų amžiaus vidurkis buvo 37,1 metai (amžiaus ribos 18-65 metai). Tyrimui atlikti gautas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto etikos komiteto leidimas (Protokolo Nr.2/2008 m.). Pagal gyvenamąją vietą visi tiriamieji savanoriai kraujo donorai buvo suskirstyti į keturis Lietuvos etnokultūrinius regionus. Regionų ribos buvo nustatytos remiantis Lietuvos respublikos etninės kultūros valstybinės globos pagrindų įstatymu. Genotipai nustatyti Dzūkijos etnokultūriniame regione 383 asmenų, Aukštaitijos–378, Suvalkijos–148 ir Žemaitijos–102.

2.2. DNR išskyrimas iš periferinio kraujo leukocitų

Tiriamųjų DNR buvo gauta iš periferinio kraujo leukocitų branduolių. Suardžius eritrocitus, leukocitus ir leukocitų branduolių membranas gaunamas DNR – baltymų kompleksas, kuris druskų išsodinimo metodu yra suardomas ir išskiriama švari ir koncentruota DNR.

Įranga:

1. Temperatūros maišytuvas „Eppendorf Thermomixer Comfort“ (Eppendorf AG, Vokietija)
2. Šildoma vandens vonelė su purtymo funkcija „GFL 1083“ (GFL, Vokietija)
3. Reguliuojamo greičio purtyklė su lietimo funkcija „IKA MS 3 basic“ (IKA, JAV)
4. Mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5424“ (Eppendorf AG, Vokietija)
5. Reguliuojamos temperatūros centrifuga „Eppendorf Centrifuge 5810 R“ (Eppendorf AG, Vokietija)
6. Magnetinė maišyklė „BioSan Bio Magnetic Stirrer MMS–3000“ (BioSan, Latvija)
7. Precizinės svarstyklės „KERN 440 – 35N“ (KERN, Vokietija)
8. pH metras „Mettler Toledo Five Easy FE 20“ (Mettler Toledo, Šveicarija)
9. Vertikalaus srauto laminaras „Airstream Class II biohazard Safety Cabinet“ (ESCO, Singapūras)
10. Automatinės pipetės „Eppendorf Research“ 100– 1000 µl, 10–100 µl, 0,5–10 µl (Eppendorf AG, Vokietija)

11. Antgaliai automatinėms pipetėms 100–1000 µl, 10–100 µl, 0,1–10 µl (Star Lab, Vokietija)
12. Dozatorius „Eppendorf Multipipette plus” (Eppendorf AG, Vokietija)
13. 50 ml kūginiai mėgintuvėliai centrifugavimui
14. 2 ml mėgintuvėliai
15. Šaldiklis–20 °C, 4 °C (Tritec, Hannover, Vokietija)

Reagentai:

1. Tris–EDTA (TE) buferis „Roti stock 100xTE ready to use“ (Carl Roth GmbH+Co KG, Vokietija)
2. Proteinazė K (UAB „Fermentas“)
3. Natrio chlorido kristalai „MERCK Sodium chloride GR for analysis” (Merck KGaA, Vokietija)
4. Tris–hidrochloridas (Tris HCl) milteliai (Carl Roth GmbH+Co, KG, Vokietija)
5. EDTA milteliai (Carl Roth GmbH+Co, KG, Vokietija)
6. Amonio chloridas (Carl Roth GmbH+Co, KG, Vokietija)
7. Natrio dodecilsulfato milteliai (Applichem GmbH, Vokietija)
8. KHCO₃ milteliai (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Vokietija)
9. 99,9 proc. chloroformas
10. 96 proc. (AB Stumbras, Lietuva)
11. Sterilus distiliuotas vanduo

DNR išskyrimo protokolas:

1. Tiriamųjų kraujas (10 ml) buvo paimtas į plastikinius mėgintuvėlius, padengtus su EDTA antikoaguliantu. Kraujas iki DNR išskyrimo laikytas –80°C šaldiklyje.
2. Kraujas atšaldytas, stengiantis palaikyti kaip galima žemesnę temperatūrą (4°C). Atšalęs kraujas buvo perpiltas į 50 ml tūrio centrifuginį mėgintuvėlį su dangteliu.
3. Į kraują buvo įpilta 20 ml Lizės I buferio (sudėtis – 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA, pH 7,4) ir kraujas buvo inkubuotas 4°C temperatūroje 30 min.
4. Bandinys buvo centrifuguotas 3000 g jėga 15 min. 4°C temperatūroje.
5. Atsargiai buvo nupilamas viršutinis sluoksnis nesumaišant nuosėdų. Ant likusių nuosėdų buvo užpilama 20 – 30 ml šalto Lizės I buferio ir vėl buvo centrifuguojama. Plovimas buvo kartotas 2 – 3 kartus arba tiek, kiek reikia, kad nuosėdos ir viršutinis sluoksnis nebūtų raudonos spalvos.
6. Ant nuosėdų (sudarytų daugiausia iš baltųjų kraujo kūnelių ir ląstelių membranų) buvo užpilama 6 ml Lizės II buferio ir labai gerai sumaišoma (sudėtis - 10 mM Tris HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA,

- pH 8.2), 400 µl 10 proc. SDS tirpalo bei 30 µl proteinazės K tirpalo (10mg/ml).
7. Mėgintuvėlis buvo uždengiamas, gerai sumaišomas ir inkubuojamas judančioje vandens vonelėje 37°C temperatūroje 16 val., po to dar 1 val. 55 °C temperatūroje.
 8. Buvo įpilama 2 ml 6 M NaCl tirpalo, gerai išmaišoma.
 9. Vertikalaus oro srauto laminare į mėginį įpilama 2 ml chloroformo, išmaišoma. Mėginys centrifuguojamas 3000 g greičiu 20 min. 16 °C temperatūros centrifugoje.
 10. Į švarų 50 ml centrifuginį mėgintuvėlį atsargiai pipete nusiurbiamas viršutinis sluoksnis, stengiantis nesudrumsti nuosėdų. Viršutinis sluoksnis vėl centrifuguojamas 3000 g greičiu 15 min. 16 °C temperatūros centrifugoje.
 11. Supernatantas buvo dar kartą buvo nupilamas į kitą centrifuginį mėgintuvėlį, sumaišomas su 20 ml šaltu 96 proc. etanolio tirpalu. Mėgintuvėlis buvo vartomas, kol išryškėdavo DNR siūlai.
 12. Precipituota DNR buvo paimama su antgaliu ir perkeliama į 1,5 ml talpos mėgintuvėlį.
 13. DNR praplovimui įpilama 1 ml 70 proc. etanolio tirpalo, atsargiai supurtoma ir centrifuguojama mikrocentrifugoje.
 14. Etanolis atsargiai nupilamas. Mėgintuvėlis su DNR nuosėdomis apverčiamas, nusausinamas ir dedamas į inkubatorių.
 15. DNR nuosėdos ištirpinamos užpilant 300 µl 1xTE buferyje.
 16. Gautas DNR mėginys laikomas 4 C temperatūros šaldytuve; ilgesniam laikymui užšaldomas –20 °C šaldiklyje.

2.3. DNR koncentracijos ir grynumo įvertinimas spektrofotometru

DNR koncentracijos matavimas ir mėginio grynumo įvertinimas yra svarbus tolimesnei jos analizei. Nukleino rūgštys sugeria 260 nm ilgio ultravioletinius spindulius. Dvigrandės DNR koncentracija (C) yra buvo skaičiuojama pagal formulę: $C_{DNR} (\mu\text{g/ml}) = D_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{praskiedimas}$.

Įranga:

1. Automatinės pipetės „Eppendorf Research“ 10 – 100 µl (Eppendorf AG, Vokietija)
2. Antgaliai automatinėms pipetėms 10 – 100 µl (Star Lab, Vokietija)
3. Eppendorf tipo 1,5 – 2 ml mėgintuvėliai (Eppendorf AG, Vokietija)
4. UV mikrokuietės „WIN LAB UV-Cuvette micro“ (Brand GmbH+Co, Vokietija)
5. Spektrofotometras „Eppendorf Biophotometer“ (Eppendorf AG, Vokietija)
6. Maišyklė „IKA MS 3 basic“ (IKA, JAV)

Reagentai:

1. 1×TE buferis (Carl Roth GmbH+Co, Vokietija)

Metodas:

1. Į švarų Eppendorf tipo mėgintuvėlį buvo įpilama 90 µl 1×TE buferio ir užrašomas mėgintuvėlio kodas.
2. Į paruoštą mėgintuvėlį su 90 µl 1×TE buferio įpilama 10 µl tiriamojo DNR tirpalo (praskiedimas 1:10).
3. Įjungiams spektrofotometras „*Eppendorf Biophotometer*“ (Eppendorf AG, Vokietija), įpilama į švarią UV kiuvetę 100 µl 1×TE (be burbulų), teisinga kryptimi įdedama kiuvetė į aparatą ir spaudžiamas mygtukas BLANK. Tokiu būdu nustatomas nulinis taškas.
4. Matuojant DNR mėginius buvo įvedimas skiedimas spektrofotometre.
5. Išmatavus absorbciją esant 260 nm bangų ilgio „*Eppendorf Biophotometer*“ automatiškai buvo apskaičiuojama DNR koncentracija ir buvo pateikiamas absorbcijų 260 nm/280 nm santykis tiriamajame mėginyje.

2.4. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Polimerazės grandininė rakcija yra naudojama DNR gausinimui. Reakciją sudaro šešios stadijos, iš kurių kartojantis trims pirmosioms cikliškai vyksta DNR gausinimas. Pakartojus 2 – 4 PGR reakcijas DNR fragmentai dvigubėja. Po 35 reakcijų susidaro pakankamas kiekis PGR produkto, kurį galima tirti. PGR reakcijos stadijos:

1. Iniacija arba pradinė denatūracija. Jos metu PGR reakcijos tirpalas, kurį sudaro PGR pradmenys, DNR polimerazė, nukleotidai, 10x reakcijos buferis, tiriamoji DNR įkaitinami iki 94 – 96 °C. Šios reakcijos trukmė 5 minutės, per kurias įvyksta tiriamosios DNR denatūracija.
2. Denatūracija. Jos metu PGR reakcijos tirpalas trumpai 20–45 s įkaitinamas iki 94 – 96 °C. Šios reakcijos metu įvyksta DNR denatūracija, t.y nutrūksta vandeniliniai ryšiai.
3. Hibridizacija. Temperatūrai nukritus iki 50 – 65 °C 20 – 40 sekundėms pradmenys jungiasi prie tiriamosios DNR.
4. Ilginimas. Temperatūra pakeliama iki 72 °C ir laikoma 1 – 2 minutėms, kurių metu vyksta nukleotidų prijungimas naujai sintetinamose DNR vijose.
5. Galutinis ilginimas. Paskutinio PGR ciklo metu mėginiai yra laikomi 70–74 °C temperatūroje 5–15 min., tam, kad mėginiuose neliktų viengrandžių DNR fragmentų.
6. Gautas produktas laikomas 4–15 °C temperatūroje neribotą laiką.

2.5. *ATP7B* geno sekoskaita

Pirmųjų keturių šeimų (septyni individai), kurių genotipai nurodyti 3.2.1 lentelėje tirti visi *ATP7B* geno egzonai. 21 *ATP7B* geno egzonas PGR reakcija pagausintas naudojant Biometros T3 amplifikatorių (Biometra T3 Thermocycler, Göttingen, Vokietija) [108]. PGR ir sekoskaitos reakcijos pradmenys nurodytos priede.

Reagentai:

1. Sterilus vanduo
2. 10×PGR reakcijos buferis
3. Magnio chloridas ($MgCl_2$) 25 mM
4. 2 mM nukleotidų: A, G, T, C tirpalas „*dNTP Mix*“ (po 2 mM kiekvieno nukleotido)
5. Termostabili rekombinantinė DNR polimerazė
6. 10 μ M *ATP7B* geno vienam iš egzonų priešakinis pradmuo
7. 10 μ M *ATP7B* geno vienam iš egzonų atvirkštinis pradmuo:

Įranga:

1. Automatinės pipetės „*Eppendorf research*“ 0,5–10 μ l (Eppendorf AG, Vokietija)
2. Eppendorf tipo mėgintuvėliai 1,5–2 ml (Eppendorf AG, Vokietija)
3. 0,2 ml PGR mėgintuvėliai „*8-Strip PCR tubes*“ (Star lab GmbH, Vokietija)
4. Ledo termoblokas skirtas 0,2 ml PGR mėgintuvėliams sudėti (Eppendorf AG, Vokietija)
5. Antgaliai 0,5–10 μ l; 10–100 μ l

PGR reakcijos produktų sekos nustatymas atliktas fluorescenciniu automatinio sekvenatoriumi (Applied Biosystems, Darmstadt, Vokietija). Mutacijos aprašytos remiantis žmogaus genomo variacijų draugijos tinklapyje <http://www.HGVS.org/mutnomen/> pateiktomis rekomendacijomis, naudojantis referentine genų banko seka, kurios numeris NM_000053.1.

2.6. *ATP7B* geno c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos nustatymas

Sergantiesiems Vilsono liga ir jų giminėms c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacija *ATP7B* gene buvo nustatyta naudojant pusiau lizdinę polimerazės grandininę reakciją ir po jos sekusia restrikcijos reakcija naudojant *BsiHKA I* restriktazę.

c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos nustatymą sudarė trys etapai:

- 1) *ATP7B* geno 14 egzonas pagausintas naudojant specifinius *ATP7B* ex14 dir ir *ATP7B* ex14 rev pradmenis;
- 2) Pusiau lizdinė PGR reakcija atlikta naudojant specifinį pradmenį MUT 1070, sukuriantį restrikcijos vietą normaliaame, nemutavusiame *ATP7B* geno alelyje;
- 3) Restrikcija atlikta naudojant *BsiHKA I* restriktazę ir genotipavimo rezultatai vertinti atlikus elektroforezę 4 proc. agarozės gelyje.

ATP7B geno 14 egzono pagausinimas PGR reakcija atliktas 25 mikrolitrų reakcijos tūryje naudojant *Ependorf* kompanijos amplifikatorių. *ATP7B* geno 14 egzono pagausinimo PGR reakcijos sudėtis nurodyta 2.6.1 lentelėje.

2.6.1 lentelė. *ATP7B* geno 14 egzono gausinimo reakcijos sudėtis

Reagentai	Galutinė koncentracija	1x reakcijos sudėtis
10x <i>Taq</i> polimerazės reakcijos buferis	2,5 µl	
<i>Taq</i> polimerazė	2,5 U	0,25 µl
dNTP	0,2 mM	0,25 µl
Pradmuo <i>ATP7B</i> ex14 rev 5'-AGTT CT GCC TCA GGA GTG TGA C-3'	0,2 µM	0,5 µl
Pradmuo <i>ATP7B</i> ex14 dir 5'-CAG CTA GGA GAG AAG GAC ATG G-3'	0,2 µM	0,5 µl
Sterilus vanduo	16,5 µl	
DNR tirpalas	100 ng/1µl	1 µl

ATP7B geno gausinimui naudojami pradmenys yra specifiniai geno 13 ir 14 intronuose esančioms sekoms. Po PGR reakcijos susidaręs 337 bp produktas patikrintas 2 proc. agarozės gelyje. Pradmenų prisitvirtinimo vietos ir susidariusio produkto seka parodyta 2.6.1 paveiksle.

72121	gggtgaagtt	ctgcctcagg	agtgtgacta	tggaagcccc
tccatctgta	ttgtgggtcag			
72181	tgagttgtgg	ttgttttttg	cagATAAAGA	CTGTGATGTT
TGACAAGACT	GGCACCATTA			
72241	CCCATGGCGT	CCCCAGGGTC	ATGCGGGTGC	TCCTGCTGGG
GGATGTGGCC				
72301	TCAGGAAGGT	TCTGGCTGTG	GTGGGGACTG	CGGAGGCCAG
CAGTGAACAC				
CCCTTGGGCG				
72361	TGGCAGTCAC	CAAATACTGT	AAAGAGgtac	gtggacttgg
gcgtggccct				
gccctccccg				
72421	ccaatgtctt	tttattcctc	accatgtcct	tctctcctag
ctgccctcga	ggagccttct			

2.6.1 pav. ATP7B geno 14 egzono ir pradmenų kibimo vietas (NG_008806.1 GI:209969670)

Pastaba: Pabrauktos ATP7B ex14 rev ir ATP7B ex14 dir pradmenų prisitvirtinimo vietas, ATP7B 14 egzono seka parodyta didžiosiomis raidėmis, 13 ir 14 introno seka–mažosiomis. Rodyklės rodo amplifikacijos kryptį.

Po PGR reakcijos susidaręs 337 bp produktas buvo panaudotas pusiau lizdinėje PGR reakcijoje, naudojant specifinį pradmenį MUT 1070, kurio seka 5 TGC GCA GGC CAG CAG TGA G C3'.

ATP7B geno 14 egzono ir pusiau lizdinės PGR reakcijos buvo atliktos Ependorf firmos amplifikatoriumi. Reakcijos sąlygos nurodytos žemiau:

95°C–5 min. 1 ciklas

95°C–30 s × 35 ciklai

58°C–30 s × 35 ciklai

72°C–45 s × 35 ciklai

72°C–10 min. × 1 ciklas

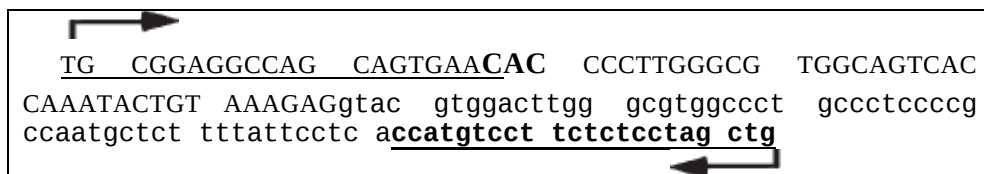
PGR, sukuriančios papildomą kirpimo vietą, reakcijos sudėtis pateikta 2.6.2 lentelėje.

2.6.2 lentelė. Pusiau lizdinės PGR reakcijos sudėtis

Reagentas	Galutinė koncentracija	Kiekis 1x reakcijai
10x Taq polimerazės reakcijos buferis	2,5 µl	
Taq polimerazė	2,5 U	0,25
dNTP	0,2 mM	0,25
Pradmuo MUT 1070	0,2 µM	0,5
Pradmuo ATP7B ex14 dir	0,2 µM	0,5
Sterilus vanduo	16 µl	
PGR reakcijos produktas	5 µl	

Pusiau lizdinės PGR reakcijos metu naudojant specifinį pradmenį MUT 1070 sukuriamą restrikcijos vietą fermentui *BsiHKA I*, kerpančiam nemutavusį geno alelį. *ATP7B* geno mutavusiame alelyje dirbtinė restrikcijos vieta nesukuriama.

Pradmenų prisitvirtinimo vietos ir pusiau lizdinės PGR reakcijos metu susidariusio produkto seka parodyta 2.6.2 paveiksle.



2.6.2 pav. *ATP7B* geno 14 egzono pusiau lizdinės PGR produkto seka ir pradmenų kibimo vietos (NG_008806.1 GI:209969670)

Pastaba: Pabrauktos *ATP7B* ex14 dir ir MUT 1070 pradmenų prisitvirtinimo vietos, *ATP7B* geno 14 egzono seka parodyta didžiosiomis raidėmis, 14 introno seka – mažosiomis. Paryškintas mutavęs CAC kodonas (c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacija). Rodyklės rodo amplifikacijos kryptį.

Po PGR reakcijos atlikta restrikcijos reakcija. Restriktazės *BsiHKA I* kirpimo vietos nurodytos 2.6.3 lentelėje.

2.6.3 lentelė. Restriktazės *BsiHKA I* kirpimo vietos ir tiriama mutacija

Restriktazė	Normali kirpimo seka	<i>ATP7B</i> geno pakitimas	Tiriama mutacija
<i>BsiHKA I</i>	5'-GWGCW [^] C-3' 3'-C [^] WCGWC-5'	Sukuriama papildoma kirpimo vieta	c.3207C>A (p.His1069Gln)

Pastaba: pirimidinas žymimas W raide.

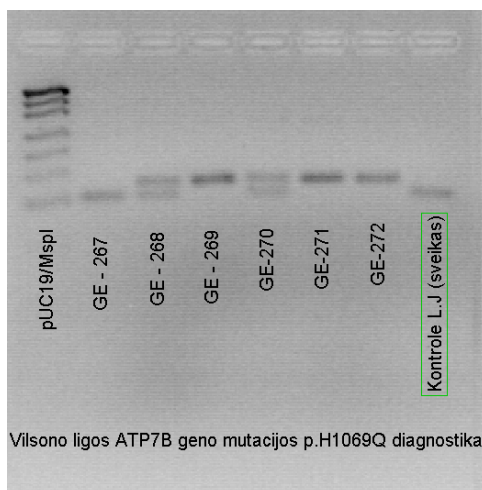
2.6.4 lentelė. Restrikcijos reakcijos naudojant *BsiHKA I* restriktazę sudėtis

Reagentai	Kiekis
<i>BsiHKA I</i>	1 µl (5 U)
Pusiau lizdinės PGR reakcijos produkto	10 µl
10x reakcijos buferio	1,5 µl
Distiliuotas vanduo	2,5 µl vandens

Restrikcijos reakcija vykdyta 37 laipsnių temperatūroje 8 valandas ir vertinta 4 proc. agarozės gelyje. Restrikcijos sąlygos nurodytos 2.6.4 lentelėje. *ATP7B* gene dirbtinai sukurta restrikcijos vieta esant normaliam aleliui kerpama ir susidaro du restrikcijos produktai: 22 bp ir 113 bp. Elektroforezės metu gelyje matomas vienas 113 bp restrikcijos produktas (22 bp produktas

nematomas). Įvykus mutacijai restrikcijos vieta pusiau lizdinės reakcijos metu nesusidaro ir 4 proc. agarozės gelyje matomas tik vienas produktas 135 bp produktas. Heterozigotinio genotipo atveju yra matomi elektroforezės gelyje du – 135 bp ir 113 bp produktai. Elektroforezė vykdyta 4 proc. agarozės gelyje 120 min. 60 V dažniu. Restrikcijos rezultatai vertinti *BioRad* gelio dokumentavimo sistema

2.6.3 paveiksle yra parodyti c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos genotipavimo gelio dokumentavimo rezultatai. Sergančių pacientų GE–269 (8 Vilsono liga sergantis (3.2.1 lentelė)), GE–271 (9 Vilsono liga sergantis (3.2.1 lentelė)) ir GE–272 (10 Vilsono liga sergantis (3.2.1 lentelė)) genotipas buvo c.[3207C>A]; [c.3207C>A] p. [His1069Gln]; [His1069Gln]. GE–268 (8 Vilsono ligos sergančiosios sesuo) ir GE–270 (9 sergančiosios Vilsono ligos mamos) genotipas buvo c.[3207C>A];[N] p. [His1069Gln]; [N]. Tiriamųjų genotipavimo rezultatai nurodyti 2.6.3 paveiksle.



2.6.3 pav. c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos genotipavimo rezultatai

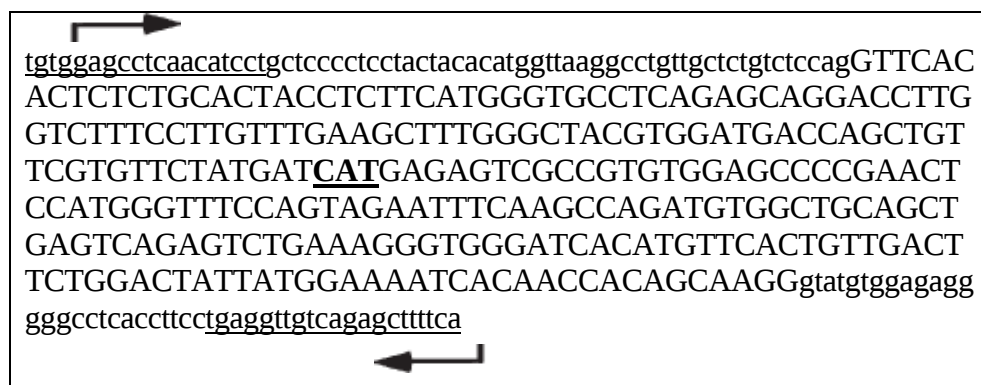
2.7. HFE geno 2 egzono gausinimo PGR reakcija protokolas

HFE 2 ir 4 egzoni pagausinti naudojant polimerazės grandininę reakciją arrašytą Cukjati ir kt. [23]. Pradmenų sekų autentiškumas patvirtintas *in silico* programa. HFE geno 2 ir 4 egzono sekos verifikuotos sekoskaita atlikta UAB „Fermente“.

Reagentai:

1. Sterilus vanduo
2. PGR reakcijos buferis 10x su amonio sulfatu
3. Magnio chloridas ($MgCl_2$) 25 mM („Fermentas“, Lietuva)
4. 2 mM nukleotidų: A, G, T, C tirpalas „dNTP Mix“ (po 2 mM kiekvieno nukleotido) („Fermentas“, Lietuva)
5. Termostabili rekombinantinė DNR polimerazė („Fermentas“, Lietuva)
6. 10 μ M (F)HFE2 fov priešakinis pradmuo: 5'-TGT GGA GCC TCA ACA TCC T-3'
7. 10 μ M (F)HFE2 fov atvirkštinis pradmuo: 5'-TGA AAA GCT CTG ACA ACC TCA-3'

Pradmenų kibimo vietos ir gausinamo fragmento sudėtis nurodyta 2.7.1 paveiksle.



2.7.1 pav. HFE 2 egzono gausinimo seka

Pastaba: HFE geno 2 egzono nukleotidai pažymėti didžiosiomis raidėmis, HFE geno 1 ir 3 intronai pažymėti mažosiomis raidėmis, pradmenų kibimo vietos pabrauktos, PGR gausinimo kryptys nurodytos rodyklėmis

Įranga:

1. Automatinės pipetės „Eppendorf research“ 0,5–10 µl (Eppendorf AG, Vokietija)
2. Elektroninė pipetė „Capp electronic“ 10–200 µl (Capp, Taivanis)
3. Eppendorf tipo mėgintuvėliai 1,5–2 ml (Eppendorf AG, Vokietija)
4. 0,2 ml PGR mėgintuvėliai „8 – Strip PCR tubes“ (Star lab GmbH, Vokietija)
5. Maišyklė „IKA MS 3 basic“ (IKA, JAV)
6. Ledo termoblokas skirtas 0,2 ml PGR mėgintuvėliams sudėti (Eppendorf AG, Vokietija)
7. Termocikleris „Eppendorf Master Cycler gradient S“ (Eppendorf AG, Vokietija)
8. Antgaliai 0,5–10 µl; 10–100 µl

2.7.1 lentelė. HFE geno 2 egzono PGR reakcijos sudėtis

Reagentas	Galutinė koncentracija	Kiekis 17x reakcijai
Sterilus vanduo	-	327,25 µl
25 mM magnio chlorido tirpalas	2,0 mM	17 µl
10xPGR reakcijos buferis su (NH ₄) ₂ SO ₄	1x	42,5 µl
Pradmuo (F)HFE2	0,2 µM	8,5 µl
Pradmuo (R)HFE2	0,2 µM	8,5 µl
dNTP tirpalas 20 mM	0,2 mM kiekvieno nukleotido	17 µl
Taq polimerazė ((MBI Fermentas, Vilnius, Lietuva)	2,5 U	0,25 µl
DNR tirpalas	100 ng/1µl	1 µl

Metodas:

1. Iš PGR reakcijos komponentų pasigaminamas tirpalas pagal 2.7.1 lentelėje pateiktą protokolą.
2. Į ledų termobloką, skirtą 0,2 ml PGR mėgintuvėliams, yra dedamos dvi 0,2 ml 8 PGR mėgintuvėlių juostelės.
3. Gautas tirpalas po 25 µl yra išpilstomas į šiuos sterilius mėgintuvėlius.
4. Tada į kiekvieną mėgintuvėlį įnešama 100 ng tiriamosios genominės DNR, paliekamas tik kas 16 mėgintuvėlis (neigiama kontrolė).
5. PGR reakcija buvo atliekama „Eppendorf Master cycler gradient S“ termociklerį.

6. HFE 2 egzono gausinimo reakcija:
7. 1 PGR reakcijos stadija – 95 °C denatūracija 5 minutes
8. 2 PGR reakcijos stadija – 95 °C temperatūra 30 sekundžių,
9. 3 PGR reakcijos stadija pradmenų prikabinimas – 56°C temperatūroje 30 sekundžių,
10. 4 PGR reakcijos stadija – 72 °C temperatūroje 1 minutės ilgėjimas
11. 2, 3 ir 4 stadijos kartojamos 30 ciklų,
12. 5 PGR reakcijos stadija – 72 °C temperatūroje 10 minučių ilgėjimas
13. 6 PGR reakcijos stadija – 4 °C temperatūroje laikymas neribotam laikui.

2.8. HFE geno 4 egzono gausinimas

Reagentai:

1. Sterilus vanduo
2. PGR reakcijos buferis 10x su amonio sulfatu
3. Magnio chloridas (MgCl₂) 25 mM („Fermentas“, Lietuva)
4. 2 mM nukleotidų: A, G, T, C tirpalas „dNTP Mix“ (po 2 mM kiekvieno nukleotido) („Fermentas“, Lietuva)
5. Termostabili rekombinantinė DNR polimerazė („Fermentas“, Lietuva)
6. 10M (F)HFE4 fov priešakinis pradmuo: 5'-TCC AGT CTT CCT GGC AA-3'
7. 10 μM (R) HFE4 rev atvirkštinis pradmuo: 5'-TTC TAG CTC CTG GCT CTC A-3'

ccagtcttctggcaagggtaaacagatcccctctcctcatccttcttcttctgtcaagTGCCTCCTTT
 GGTGAAGGTGACACATCATGTGACCTCTTCAGTGACCACTCTACG
 GTGTCGGGCCTTGAACACTACTACCCCCAGAACATCACCATGAAGTG
 GCTGAAGGATAAGCAGCCAATGGATGCCAAGGAGTTCGAACCTA
 AAGACGTATTGCCCAATGGGGATGGGACCTACCAGGGCTGGATA
 ACCTTGGCTGTACCCCCTGGGGAAGAGCAGAGATATACGTGCCA
 GGTGGAGCACCCAGGCCTGGATCAGCCCCTCATTGTGATCTGGG
Gtatgtgactgatgagagccaggagctgagaa

2.8.1 pav. HFE 4 egzono gausinimo seka

Pastaba: HFE geno 4 egzono nukleotidai pažymėti didžiosiomis raidėmis, HFE geno 3 ir 5 intronai pažymėti mažosiomis raidėmis, pradmenų kibimo vietos pabrauktos

Įranga:

1. Automatinės pipetės „Eppendorf research“ 0,5–10 µl (Eppendorf AG, Vokietija)
2. Elektroninė pipetė „Capp electronic“ 10–200 µl (Capp, Taivanis)
3. Eppendorf tipo mėgintuvėliai 1,5–2 ml (Eppendorf AG, Vokietija)
4. 0,2 ml PGR mėgintuvėliai „8 – Strip PCR tubes“ (Star lab GmbH, Vokietija)
5. Maišyklė „IKA MS 3 basic“ (IKA, JAV)
6. Ledo termoblokas skirtas 0,2 ml PGR mėgintuvėliams sudėti (Eppendorf AG, Vokietija)
7. Termocikleris „Eppendorf Master Cycler gradient S“ (Eppendorf AG, Vokietija)
8. Antgaliai 0,5–10 µl; 10–100 µl

HFE geno 4 egzono gausinimo PGR reakcijos sudėtis nurodyta 2.8.1 lentelėje.

2.8.1 lentelė. HFE geno 4 egzono PGR reakcijos sudėtis

Reagentas	Galutinė koncentracija	Kiekis 1x reakcijai
Sterilus vanduo	16,5 µl	
25 mM magnio chlorido tirpalas	1,0 mM	0,5 µl
10xPGR reakcijos buferis su (NH ₄) ₂ SO ₄	1x	2,5 µl
Pradmuo (F)HFE4	0,2 µM	0,5 µl
Pradmuo (R)HFE4	0,2 µM	0,5 µl
dNTP tirpalas 20 mM	0,2 mM kiekvieno nukleotido	0,25 µl
Taq polimerazė ((MBI Fermentas, Vilnius, Lietuva)	2,5 U	0,25 µl
DNR tirpalas	100 ng/1µl	1 µl

Metodas:

1. Iš PGR reakcijos komponentų pasigaminamas tirpalas pagal 2.8.1 lentelėje pateiktą protokolą.
2. Į ledų termobloką, skirtą 0,2 ml PGR mėgintuvėliams, yra dedamos dvi 0,2 ml 8 PGR mėgintuvėlių juostelės.
3. Gautas tirpalas po 25 µl yra išpilstomas į šiuos sterilius mėgintuvėlius.
4. Tada į kiekvieną mėgintuvėlį įnešama 100 ng tiriamosios genominės DNR, paliekamas tik kas 16 mėgintuvėlis (neigiama kontrolė).
5. PGR reakcija buvo atliekama „Eppendorf Master cycler gradient S“ termociklerį.

6. *HFE* 2 egzono gausinimo reakcija:
 - 1 PGR reakcijos stadija – 95 °C denatūracija 5 minutes
 - 2 PGR reakcijos stadija – 95 °C temperatūra–30 sekundžių,
 - 3 PGR reakcijos stadija pradmenų prikabinimas–56 °C temperatūroje 30 sekundžių,
 - 4 PGR reakcijos stadija – 72 °C temperatūroje 1 minutės ilgėjimas
 - 2, 3 ir 4 stadijos kartojamos 30 ciklų,
 - 5 PGR reakcijos stadija – 72 °C temperatūroje 10 minučių ilgėjimas
 - 6 PGR reakcijos stadija – 4 °C temperatūroje laikymas neribotam laikui.

2.9. Agarozės gelio elektroforezė

Reagentai:

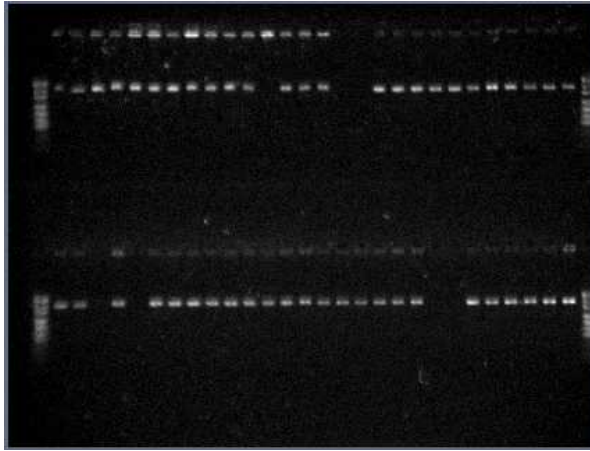
1. Agarozė „*SeaKem LE Agarose*“ (Lonza, JAV)
2. 10x TBE buferis „*Rotiphorese*“ (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija)
3. Etidžio bromidas 10 mg/ml (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija)
4. DNR dažas „*6x DNA Loading Dye*“ (Fermentas, Lietuva)
5. DNR fragmentų žymuo „*pUC 19 DNA MspI (HpaCI)*“ (Fermentas, Lietuva)

Įranga:

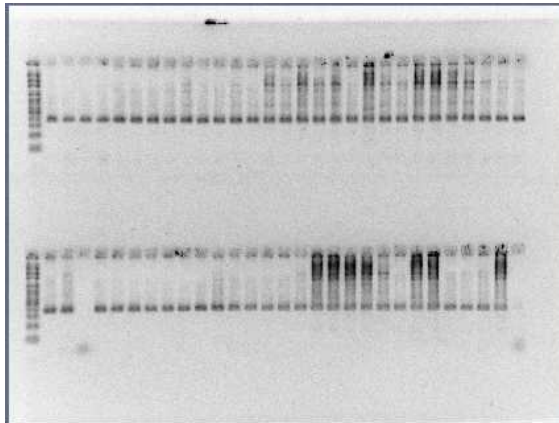
1. Horizontalus gelio elektroforezės aparatas (Bio-Rad, JAV)
2. Gelio liejimo rėmelis (Bio-Rad, JAV)
3. 30 šulinėlių gelio šukutės (Bio-Rad, JAV)
4. Nuolatinės srovės tiekimo aparatas (Bio-Rad, Singapūras)
5. Mikrobangų krosnelė „*Samsung G2712NR*“ (Samsung, Malaizija)
6. Automatinės pipetės „*Eppendorf research*“ 0,5 µl–10 µl. (Eppendorf AG, Vokietija)
7. Gelio dokumentavimo sistema „*Bio-Rad molecular imager*“ (Bio-Rad, JAV)
8. Stiklinė kolba skirta agarozei virti.
9. Parafilm[®] juosta (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija)
10. Antgaliai 0,5 µl–10 µl ; 10 µl–100 µl

Metodas:

1. Tiriamųjų *HFE* geno pagausinto 2 ir 4 egzono įvertinimui buvo gaminamas 1,5 proc. agarozės gelis.
2. Gelis buvo gaminamas pirmiausia elektroninėmis svarstyklėmis pasvėrus 2,25 g agarozės.
3. Agarozė buvo supilama į stiklinę kolbą ir užpilama 150 ml 1x TBE buferiu.
4. Agarozės tirpalas buvo dedamas į mikrobangų krosnelę ir verdamas kol agarozė visiškai ištirpdavo.
5. Ištirpinta agarozė 30 sekundžių buvo vėsinama po šalto vandens srove ir atsargiai (be burbulų) pilama į gelio liejimo rėmelį, kuriame būdavo sudėtos 4 gelio šukutės po 30 šulinėlius (120 šulinėlių).
6. Sustingus agarozės geliui, atsargiai būdavo ištraukiamos šukutės ir gelis dedamas į horizontalaus gelio elektroforezės aparatą, pripildytą 1x TBE buferiu, taip kad buferis apsemtų gelį.
7. Į kiekvienos gelio eilutės pirmąjį šulinėlį būdavo įnešama po 3 µl DNR fragmentų žymens „pUC 19 DNA MspI (HpaCI)“.
8. Ant parafilemo juostelės būdavo sudedama DNR dažo „6x DNA Loading Dye“ lašeliai po 2 µl (lašelių skaičius atitinka mėginių skaičių).
9. 5 µl mėginio (PGR produkto) steriliu antgaliu būdavo sumaišoma su 2 µl DNR dažo „6x DNA Loading Dye“.
10. Sumaišytas tirpalas būdavo pernešamas į agarozės gelio šulinėlį.
11. Sunešus mėginius į agarozės gelio šulinėlius, būdavo uždengiamas horizontalaus gelio aparato dangtis ir įjungiamas nuolatinės srovės tiekimo aparatas.
12. Elektroforezė būdavo vykdoma 110 V 60 min.
13. Po elektroforezės gelis būdavo merkiamas į 10 mg/ml etidžio bromido tirpalą ir paliekamas dažymui 10 minučių.
14. Ištrauktas gelis būdavo nuplaunamas su distiliuotu vandeniu ir dedamas į gelio dokumentavimo sistemą ir nufotografuojamas.
15. Duomenų analizė. Lyginami tiriamieji DNR fragmentai su DNR fragmentų žymens „pUC 19 DNA MspI (HpaCI)“ fragmentais. HFE 2 PGR produkto ilgis turi būti 378 bp. HFE 4 egzono PGR produkto ilgis turi būti 369 bp.



2.9.1 pav. *HFE* geno 4 egzono amplifikacijos rezultatai



2.9.2 pav. *HFE* geno 2 egzono amplifikacijos rezultatai

2.10. Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP) analizė

Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (RFIP) tai DNR žymenų sistema, leidžianti nustatyti nukleotidų sekų skirtumus tarp DNR molekulių sukarpytų specifinėmis restriktazėmis. RFIP veikimas pagrįstas DNR molekulės sukarpymu restriktazėmis. Restriktazės yra fermentai, kurie kerpa DNR grandinę specifinėse vietose. Šių fermentų sukarpyti įvairaus dydžio DNR fragmentai veikiant elektros laukui juda nevienodai, sudarydami specifinius DNR fragmentų profilius. *HFE* geno mutavusių alelių nustatymas atliktas naudojant restriktazes.

HFE geno 2 egzono c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos tyrimas RFIP metodu:

Reagentai:

1. Restriktazė Bcl I 10 u/μl 3000 u („Fermentas“, Lietuva) (2.10.1 lentelė)
2. Restrikcijos buferis „10x Buffer G“ 1ml („Fermentas“, Lietuva)

2.10.1 lentelė. Restriktazės Bcl I kirpimo vieta ir tiriama mutacija

Restriktazė	Normali kirpimo seka	HFE geno pakitimas	Tiriama mutacija
cl I	5'-T [^] G A T C A-3' 3'-A C T A G [^] T-5'	CAT→GAT	c.187C>G (p.His63Asp)

Įranga:

1. Automatinės pipetės „Eppendorf research“ 0,5 μl–10 μl ir 10 μl–100 μl (Eppendorf AG, Vokietija)
2. Eppendorf tipo mėgintuvėliai, 1,5–2 ml (Eppendorf AG, Vokietija)
3. Judanti termomaišyklė „Eppendorf Thermomixer comfort“ (Eppendorf AG, Vokietija)
4. Antgaliai 0,5 μl–10 μl ; 10 μl–100 μl

2.10.2 lentelė. c.187C>G (p.His63Asp) restrikcijos reakcijos protokolas.

Reagentas	Galutinė koncentracija	Kiekis 1x reakcijai		Kiekis 30x reakcijų
Sterilus vanduo	-	3,25 μl		97,5 μl
10x Buffer G with BSA	1x	1,5 μl		45 μl
Bcl I	2,5 U	0,25 μl		7,5 μl
PGR produktas	-	10 μl	Viso: 1x reakcijai	5 μl

Metodas:

1. Į švarų eppendorf tipo mėgintuvėlį iš eilės įpilama 97,5 μl sterilaus vandens, 45 μl 10x Buffer G with BSA ir 7,5 μl Bcl I restriktazės (30 reakcijų).
2. Šis tirpalas išpilstomas į 30 sterilių, sužymėtų eppendorf tipo mėgintuvėlių po 5 μl.
3. Tada į vieną mėgintuvėlį įnešama po 10 μl vieno tiriamojo PGR produkto. Taip sunešama visų tiriamųjų PGR produktai.

- Uždaryti mėgintuvėliai sudedami į judantį termobloką ir 55 °C temperatūroje paliekama mažiausiai 1 valandai.
- Po reakcijos mėginiai gali būti laikomi 4 °C arba -20 °C temperatūroje iki tolimesnės analizės.

HFE geno 2 egzono c.193A>T (p.Ser65Cys) mutacijos tyrimas RFLP metodu:

Reagentai:

- Restriktazė Hinf I 10 u/μl 3000 u („Fermentas“, Lietuva) (2.10.3 lentelė)
- Restrikcijos buferis „10x Buffer R with BSA“ 1ml („Fermentas“, Lietuva)

2.10.3 lentelė. Restriktazės Hinf I kirpimo vieta ir tiriama mutacija

Restriktazė	Normali kirpimo seka	HFE geno pakitimas	Tiriama mutacija
Hinf	5'-G [^] A N T C-3' 3'-C T N A [^] G-5'	GANT→GTNT	c.193A>T (p.Ser65Cys)

Techinės priemonės:

- Automatinės pipetės „Eppendorf research“ 0,5 μl - 10 μl ir 10 μl – 100 μl. (Eppendorf AG, Vokietija)
- Eppendorf tipo mėgintuvėliai, 1,5 – 2 ml (Eppendorf AG, Vokietija)
- Judanti termomaišyklė „Eppendorf Thermomixer comfort“ (Eppendorf AG, Vokietija)
- Antgaliai 0,5–10 μl ; 10–100 μl

2.10.4 lentelė. c.193A>T (p.Ser65Cys) restrikcijos reakcijos protokolas.

Reagentas	Galutinė koncentracija	Kiekis 1x reakcijai		Kiekis 30x reakcijų
Sterilus vanduo	-	3,25 μl		97,5 μl
10x Buffer R with BSA	1x	1,5 μl		45 μl
Hinf I	2,5 U	0,25 μl		7,5 μl
PGR produktas	-	10 μl	Viso: 1x reakcijai	5 μl

Metodas:

1. Į švarų eppendorf tipo mėgintuvėlį iš eilės įpilama 97,5 µl sterilaus vandens, 45 µl
2. 10x Buffer R with BSA ir 7,5 µl Hinf I restriktazės (30 reakcijų).
3. Šis tirpalas išpilstomas į 30 sterilių, sužymėtų eppendorf tipo mėgintuvėlių po 5 µl.
4. Tada į vieną mėgintuvėlį įnešama po 10 µl vieno tiriamojo PGR produkto. Taip sunešama visų tiriamųjų PGR produktai.
5. Uždaryti mėgintuvėliai sudedami į judantį termobloką ir 37 °C temperatūroje paliekama mažiausiai 1 valandai.
6. Po reakcijos mėginiai gali būti laikomi 4 °C arba –20 °C temperatūroje iki tolimesnės analizės.

HFE geno 4 egzono c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos tyrimas RFLP metodu:

Reagentai

1. Restriktazė Rsa I 10 u/µl 3000 u (Fermentas, Lietuva)
2. Restrikcijos buferis „10x Buffer Tango™“ 1ml (Fermentas, Lietuva)

2.10.5 lentelė. Restriktazės Rsa I veikimas.

Restriktazė	Normali kirpimo seka	HFE geno pakitimas	Tiriama mutacija
<i>Rsa I</i>	5'-G T [^] A C-3' 3'-C A [^] T G-5'	Sukuriama papildoma kirpimo vieta GTGC į GTAC	c.845G>A (p.Cys282Tyr)

Įranga:

1. Automatinės pipetės „Eppendorf research“ 0,5–10 µl ir 10–100 µl. (Eppendorf AG, Vokietija)
2. Eppendorf tipo mėgintuvėliai, 1,5–2 ml (Eppendorf AG, Vokietija)
3. Judanti termomaišyklė „Eppendorf Thermomixer comfort“ (Eppendorf AG, Vokietija)
4. Antgaliai 0,5–10 µl ; 10–100 µl

2.10.6 lentelė. c.845G>A(p.Cys282Tyr) restrikcijos reakcijos protokolas

Reagentas	Galutinė koncentracija	Kiekis 1x reakcijai		Kiekis 30x reakcijų
Sterilus vanduo	-	3,25 µl		97,5 µl
10x Buffer Tango™	1x	1,5 µl		45 µl
Rsa I	2,5 U	0,25 µl		7,5 µl
PGR produktas	-	10 µl	Viso: 1x reakcijai	5 µl

Metodas:

1. Į švarų eppendorf tipo mėgintuvėlį iš eilės įpilama 97,5 µl sterilaus vandens, 45 µl 10x Buffer Tango™ ir 7,5 µl Rsa I restriktazės (30 reakcijų).
2. Šis tirpalas išpilstomas į 30 sterilių, sužymėtų eppendorf tipo mėgintuvėlių po 5 µl.
3. Tada į vieną mėgintuvėlį įnešama po 10 µl vieno tiriamojo PGR produkto. Taip sunašama visų tiriamųjų PGR produktai.
4. Uždaryti mėgintuvėliai sudedami į judantį termobloką ir 37 °C temperatūroje paliekama mažiausiai 1 valandai.
5. Po reakcijos mėginiai gali būti laikomi 4 °C arba -20 °C temperatūroje iki tolimesnės analizės.

2.11. Genotipo vertinimas

Reagentai:

1. Agarozė „SeaKem LE Agarose“ (Lonza, JAV)
2. 10x TBE buferis „Rotiphorese“ (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija)
3. Etidžio bromidas 10 mg/ml (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija)
4. DNR dažas „6x DNA Loading Dye“ (Fermentas, Lietuva)
5. DNR fragmentų žymuo „O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use“ (Fermentas, Lietuva)
6. Antgaliai 0,5–10 µl ; 10–100 µl

Įranga:

1. Horizontalus gelio elektroforezės aparatas (Bio-Rad, JAV)
2. Gelio liejimo rėmelis (Bio-Rad, JAV)
3. 20 šulinėlių gelio šukutės (Bio-Rad, JAV)
4. Nuolatinės srovės tiekimo aparatas (Bio-Rad, Singapūras)
5. Mikrobangų krosnelė „Samsung G2712NR“ (Samsung, Malaizija)
6. Automatinės pipetės „Eppendorf research“ 0,5–10 µl. (Eppendorf AG, Vokietija)

7. Gelio dokumentavimo sistema „Bio-Rad molecular imager“ (Bio-Rad, JAV)
8. Stiklinė kolba skirta agarozei virti.
9. Mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5810R“ (Eppendorf AG, Vokietija)

Metodas:

1. HFE geno 2 egzono p.Ser65Cys bei p.His63Asp ir 4 egzono p.Cys282Tyr mutacijų analizei reikalingas 4 proc. agarozės gelis.
2. Elektroninėmis svarstyklėmis pasverama 6 g agarozės.
3. Agarozė supilama į stiklinę kolbą, užpilama 150 ml 1x TBE buferiu ir 50 ml distiliuoto vandens.
4. Agarozės tirpalas dedamas į mikrobangų krosnelę ir verdamas kol tirpalo tūris bus 150 ml.
5. Ištirpinta agarozė 30 sekundžių atvėsinama po šalto vandens srove ir atsargiai (be burbulų) pilama į gelio liejimo rėmelį, kuriame yra sudėtos 3 gelio šukutės po 20 šulinėlių (60 šulinėlių). Laukiama kol agarozės gelis sustings.
6. Sustingus agarozės geliui, atsargiai ištraukiamos šukutės ir gelis dedamas į horizontalaus gelio elektroforezės aparatą, pripildytą 1x TBE buferiu, taip kad buferis apsemtų gelį.
7. Į kiekvienos eilės pirmąjį šulinėlį įnešame po 3 µl DNR fragmentų žymens „O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“.
8. Į kiekvieną tiriamąjį mėginį su RFLP produktu įpilama po 2 µl DNR dažo „6x DNA Loading Dye“.
9. Mėginiai uždaromi ir nucentrifuguojami.
10. Sumaišytas visas mėginys pernešamas į vieną agarozės gelio šulinėlį. Taip pat daroma su kitais mėginiais.
11. Sunešus mėginius į agarozės gelio šulinėlius, uždengiamas horizontalaus gelio elektroforezės aparato dangtis ir įjungiamas nuolatinės srovės tiekimo aparatas.
12. Elektroforezė vykdoma 110 V 120 min.
13. Po elektroforezės gelis merkiamas į 10 mg/ml etidžio bromido tirpalą ir paliekamas 10 minučių, merkiant būtina naudoti pirštines.
14. Ištrauktas gelis nuplaunamas su distiliuotu vandeniu, dedamas į gelio dokumentavimo sistemą ir nufotografuojamas.
15. Duomenų analizė. Lyginami tiriamieji DNR fragmentai su DNR fragmentų žymens „O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“ fragmentais.

Bcl I restriktazės produktai vertinti tiriant p.His63Asp mutacijos buvimą.

Homozigotinis normalus individas – [N];[N] (205 bp ir 173bp).

Heterozigotinis individas – p. [His63Asp];[N] (378 bp, 205 bp ir 173 bp).

Homozigotinis individas – p.[His63Asp];[His63Asp] (378 bp).

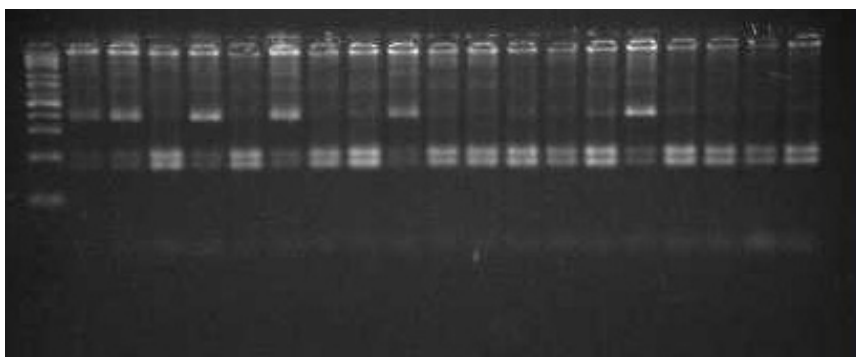
Žemiau esančiame 2.11.1 paveiksle yra parodyta HFE geno 2 egzono (ENST00000309234 HFE human) seka. p.H63D mutacija panaikina kirpimo vietą, kadangi keičiasi CAT→GAT.

```
tgaggagcctcaacatcctgctccctcctactacacatgggtaaggcctgtgctctgtctccagGTTTAC
ACTCTCTGCACTACCTCTTCATGGGTGCCTCAGAGCAGGACCTTG
GTCTTTCCTTGTTTGAAGCTTTGGGCTACGTGGATGACCAGCTGT
TCGTGTTCTATGATCATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCGAATC
CATGGGTTTCCAGTAGAATTTCAAGCCAGATGTGGCTGCAGCTG
AGTCAGAGTCTGAAAGGGTGGGATCACATGTTCACTGTTGACTT
CTGGACTATTATGGAAAATCACAACCACAGCAAGGgtatgtggagagg
ggcctcaccttcctgaggtgtcagagctttca
```

2.11.1 pav. HFE geno seka
(genų banko Nr. ENST00000309234 HFE human).

Pastaba: pradmenų jungimosi vietos pabrauktos, intronų seka pažymėtama mažosiomis, egzonų didžiosiomis raidėmis, Bcl I veikimo vieta pabraukta ir paryškinta.

Genotipavimo Bcl I restriktaze rezultatai parodyti 2.11.2 paveiksle.



2.11.2 pav. 19 Lietuvos savanorių kraujo donorų p.His63Asp alelio genotipavimo rezultatai

Pastaba: 100 bp markeris, 19 tiriamųjų – 13 homozigotų, 6 heterozigotai

Hinf I restriktazės produktai vertinti tiriant p.S65C mutacijos buvimą.
 Homozigotinis normalus individas – [N];[N] (182 bp, 121 bp, 69 bp, 6 bp).
 Heterozigotinis individas – p.[Ser65Cys];[N] (251 bp, 182 bp, 121 bp, 69 bp, 6 bp).

Homozigotinis individas – p.[Ser65Cys];[Ser65Cys] (251 bp, 121 bp, 6 bp).

Žemiau (2.11.3 pav.) nurodoma fermento *Hinf I* kirpimo vieta:

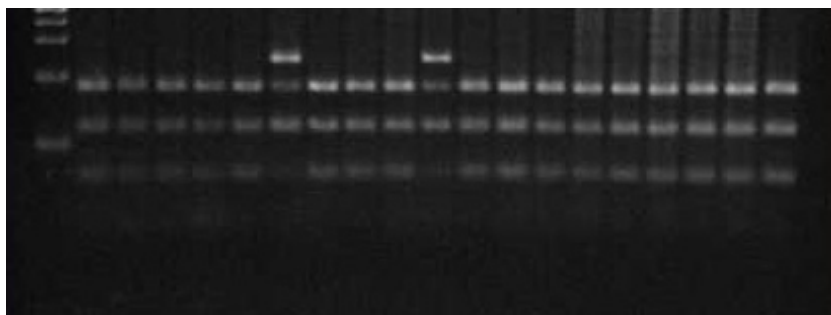
```

tggtgtggagcctcaacatcctgctccctcctactacacatgggtaaggcctgtgtgctctgtctccagGTTCA
CACTCTCTGCACTACCTCTTCATGGGTGCCTCAGAGCAGGACCTT
GGTCTTTTCCTTGTTTGAAGCTTTGGGCTACGTGGATGACCAGCTG
TTCGTGTTCTATGATCATGAGGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCGAAC
TCCATGGGTTTCCAGTAGAATTTCAAGCCAGATGTGGCTGCAGCT
GAGTCAGAGTCTGAAAGGGTGGGATCACATGTTCACTGTTGACT
TCTGGACTATTATGGAAAATCACAACCACAGCAAGGgtatgtggagagg
gggcctcaccttcctgaggttgtcagagctttca
  
```

2.11.3 pav. *geno seka (genų banko Nr. ENST00000309234 HFE human).*

Pastaba: pradmenų jungimosi vietos pabrauktos, intronų seka pažymėta mažosiomis, egzonų didžiosiomis raidėmis, Hinf I veikimo vieta pabraukta ir paryškinta.

Genotipavimo *Hinf I* restriktaze rezultatai parodyti 2.11.4 paveiksle.



2.11.4 pav. *19 savanorių kraujo donorų p. Ser65Cys alelio genotipavimo rezultatai*

Pastaba: 100 bp markeris, 19 tiriamųjų – 17 homozigotų (abu normalūs aleliai), 2 heterozigotai

Rsa I restriktazės restrikcijos produktai veritnti tiriant p.Cys282Tyr mutacijos buvimą.

Homozigotinis normalus individas - [N];[N] (261 bp ir 108 bp).

Heterozigotinis individas – p.[Cys282Tyr];[N] (261 bp, 108 bp, 80 bp, 29 bp).

Homozigotinis individas – p.[p.Cys282Tyr];[p.Cys282Tyr] (261 bp, 80 bp, 29 bp).

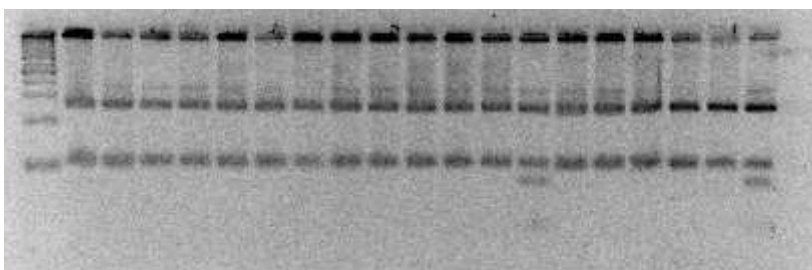
Žemiau esančiame 2.11.5 paveiksle yra parodyta HFE geno 4 egzono nukleotidų seka ir restriktazės *Rsa I* veikimo vietos.

```
tccagtcttcctggcaagggtaaacagatcccctctctcatccttctcttttctgtcaagTGCCTCCTT
TGGTGAAGGTGACACATCATGTGACCTCTTCAGTGACCACTCTAC
GGTGTGCGGGCCTTGAACACTACCCCCAGAACATCACCATGAAG
TGGCTGAAGGATAAGCAGCCAATGGATGCCAAGGAGTTCGAACC
TAAAGACGTATTGCCCAATGGGGATGGGACCTACCAGGGGCTGGA
TAACCTTGGCTGTACCCCCTGGGGAAGAGCAGAGATATACGTGC
CAGGTGGAGCACCCAGGCCTGGATCAGCCCCTCATTGTGATCTG
GGGtatgtgactgatgagagccaggagctgagaa
```

2.11.5 pav. HFE geno seka (genų banko Nr. ENST00000309234 HFE human).

Pastaba: pradmenų jungimosi vietos pabrauktos, intronų seka pažymėta mėlyna, egzonų – juoda spalva, Rsa I veikimo vieta pabraukta, paryškinta, o mutacijos vieta-pabraukta, paryškinta ir pasvirusi.

Genotipavimo *Rsa I* restriktaze rezultatai parodyti 2.11.6 paveiksle.



2.11.6 pav. Lietuvos savanorių kraujo donorų p.Cys282Tyr alelio tyrimo rezultatai

Pastaba: 100 bp markeris, 19 tiriamųjų – 17 homozigotų, 2 heterozigotai

2.12. Statistinė duomenų analizė

Pagal gautus genotipavimo rezultatus, alelių bei genotipų dažnių 95 proc. pasikliautinių intervalų (95 proc. PI) apskaičiavimui buvo naudojama skaičiuoklė, randama internetiniu adresu:

(http://www.dimensionresearch.com/resources/calculators/conf_prop.html).

Hardžio-Vainbergo pusiausvyros modelis bei Pirsono (Pearson) χ^2 kriterijaus įvertinimas

Ištirtos populiacijos genotipų dažnis palygintas su teorinės pagal Hardžio – Vainbergo dėsnius populiacijos dažniu (naudojant Pirsono kriterijų χ^2 , reikšmingumo lygmuo $\alpha=0,05$).

Eksperimentiniai alelių dažniai (p;q) apskaičiuoti pagal formules:

$$p = \frac{2 \times N \left(\frac{N}{N} \right) + N \left(\frac{N}{M} \right)}{2 \times N} ; \quad q = \frac{2 \times N \left(\frac{M}{M} \right) + N \left(\frac{N}{M} \right)}{2 \times N}$$

N (N/N) – tiriamųjų, turinčių laukinio tipo genotipą, skaičius;

N (N/M) – tiriamųjų, turinčių heterozigotinį (normalus alelis/ mutavęs alelis) genotipą, skaičius;

N (M/M) – eksperimentinis tiriamųjų, turinčių homozigotinį mutantį genotipą, skaičius.

N (normalus) alelis, M (mutavęs) alelis.

Teoriniai genotipų dažniai išreiškiami, remiantis formule:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2 \times p \times q + q^2 = 1$$

Naudojant Pearson'o χ^2 kriterijų patikrinama, ar tiriamoji populiacija yra Hardy-Weinberg'o pusiausvyroje:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

O – stebimi (angl. *observed*) genotipų dažniai, išreikšti individų skaičiumi;

E – tikėtini (angl. *expected*) genotipų dažniai, išreikšti individų skaičiumi.

χ^2 kriterijaus įvertinimui naudojama χ^2 kritinių reikšmių lentelė (2.12.1 lentelė).

2.12.1 lentelė. χ^2 kritinių reikšmių lentelė

Laisvės laipsniai	p reikšmės						
	Nulinės hipotezės H_0 atmesti negalime				Nulinė hipotezė H_0 atmetama		
	0,99	0,90	0,5	0,1	0,05	0,01	0,001
	χ^2 Reikšmės						
1	-	0,02	0,45	2,71	3,84	6,64	10,83
2	0,02	0,21	1,39	4,61	5,99	9,21	13,82
3	0,11	0,58	2,37	6,25	7,81	11,35	16,27
4	0,30	1,06	3,36	7,78	9,49	13,28	18,47
5	0,55	1,61	4,35	9,24	11,07	15,09	20,52
Pastaba: χ^2 reikšmės esančios dešiniojoje lentelės pusėje leidžia atmesti nulinę hipotezę H_0 su didesniu nei 95 % patikimumu (mažesne nei $p \leq 0,05$ paklaida).							

Asmenų, turinčių įvairius genotipus pagal *HFE* geno alelius, pasiskirstymas Lietuvos populiacijoje pagal Hardžio-Vainbergo dėsnį tikrintas remiantis Pirsono χ^2 testu, arba didžiausio tikėtinumo metodu.

Alelių ir genotipų dažniai pateikiami 95 proc. pasikliautiniu intervalu apskaičiuotu Vilsono procedūros būdu. Hardžio-Vainbergo dėsnio nulemtas genotipų išsidėstymas buvo tikrinamas χ^2 kriterijumi. Nustačius, kad $p < 0,05$ lygybės hipotezė buvo atmetama. Fišerio skirstinys buvo naudojamas lyginant atskirų Lietuvos etninių regionų alelių dažnio paplitimą.

3. REZULTATAI

3.1. *ATP7B* geno mutavusių alelių dažnis

Ištyrus 27 Vilsono liga sergančiuosius buvo nustatyta, kad dažniausia *ATP7B* geno mutacija buvo c.3207C>A (p.His1069Gln). Jos dažnis Lietuvoje yra 74,1 proc. Kiti *ATP7B* geno aleliai turintys mutacijas buvo reti. Turinčių c.3472_82del11 (p.G1158fs) ir c.3121C>T (p.Arg1041Trp) mutacijas *ATP7B* geno alelių dažniai buvo 3,7 proc., o alelių su c.3402delC (p.Ala1135fs) bei c.2304dupC (p.M769fs) mutacijom dažnis buvo 1,9 proc. Aštuonios *ATP7B* geno alelių (14,8 proc.) mutacijos nebuvo nustatytos. Mutavusių *ATP7B* geno alelių dažnio rezultatai pateikti 3.1.1. lentelėje.

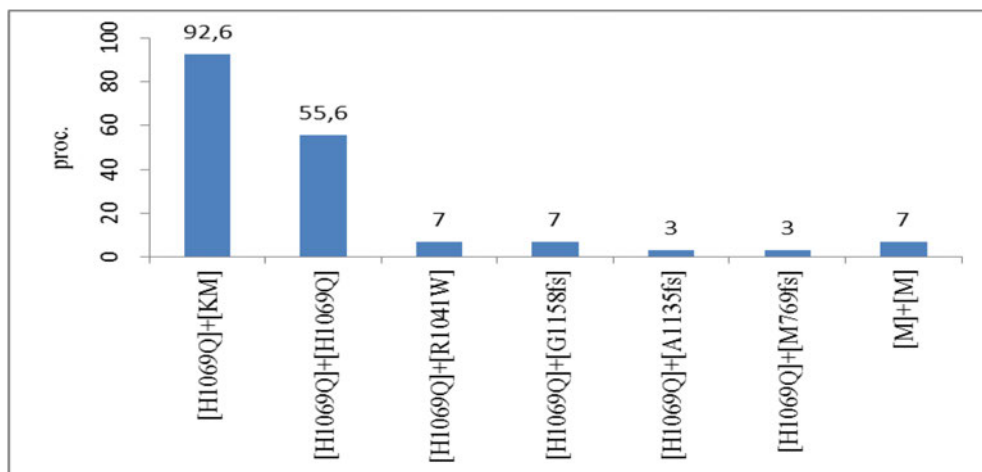
3.1.1 lentelė. *ATP7B* geno mutavusių alelių dažniai

ATP7B geno mutacijos	Dažnis proc. (95 proc. PI)*
c.3207C>A (p.His1069Gln)	74 (62,3 – 85,7)
c.3472-82del11 (p.G1158fs)	3,7 (0 – 8,7)
c.3121C>T (p.Arg1041Trp)	3,7 (0 – 8,7)
c.3402delC (p.Ala1135fs)	1,9 (0 – 5,5)
c.2304dupC (p.M769fs)	1,9 (0 – 5,5)
Nenustatyti aleliai	14,8 (5,3 – 24,3)

Pastaba: Pasikliautinasis intervalas apskaičiuotas remiantis tinklalapio www.mccallum-layton.co.uk skaičiuokle.

3.2. Vilsono liga sergančiųjų genotipavimo rezultatai

Ištyrus 27 Lietuvos Vilsono liga sergančiuosius net dvidešimt penkių pacientų genotipe (92,6 proc.) buvo nustatyta viena ar dvi c.3207C > A (p. His1069Gln) mutacijos *ATP7B* gene. Penkiolikos asmenų (55,6 proc.) genotipas buvo homozigotinis c. [3207C > A]; [3207C > A] p.[His1069Gln]; [His1069Gln]. Retesnė buvo sudėtinė heterozigotija – šešių asmenų (22,2 proc.) genotipe be c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos buvo nustatytas ir kitas *ATP7B* geno mutavęs alelis. Keturių asmenų (14,8 proc.) genotipe patvirtinta tik c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacija, antras *ATP7B* geno mutavęs alelis nenustatytas. Tik dviems asmenims (7,4 proc.) nebuvo rastos abi mutacijos. 3.2.1 paveiksle yra nurodytas Lietuvos VL pacientų genotipų dažnis, kuris statistškai patikimai nesiskyrė nuo pagal Hardžio-Vainbergo dėsni laukiamo genotipų dažnio ($p>0,05$).



3.2.1 pav. VL genotipų paplitimas Lietuvoje

Sergančiųjų Vilsono liga ligonių genotipavimo rezultatai yra pateikti 3.2.1 lentelėje.

3.2.1. lentelė. Vilsono liga sergančiųjų genotipavimo rezultatai

Šeima	VL ligonis	Mutacijos vieta	Mutacijos tipas	Genotipas
1 šeima	1 sergantis	14 egzonus	Kitapasmė	c.[3207C>A];[3121C>T] p.[His1069Gln];[Arg1041Trp]
1 šeima	2 sergantis	14 egzonus	Kitapasmė	c.[3207C>A];[3121C>T] p.[His1069Gln];[Arg1041Trp]
1 šeima	3 sergantis	14 egzonus	Kitapasmė Nežinoma	c.[3207C>A];[M] p.[His1069Gln];[M]
2 šeima	4 sergantis	14 ir 16 egzonus	Kitapasmė „Rėmelio poslinkio“	c.[3207C>A];[3472_82del11] p.[His1069Gln];[Gly1158fs]
2 šeima	5 sergantis	14 ir 16 egzonus	Kitapasmė „Rėmelio poslinkio“	c.[3207C>A];[3472_82del11] p.[His1069Gln];[Gly1158fs]
3 šeima	6 sergantis	14 ir 15 egzonus	Kitapasmė „Rėmelio poslinkio“	c.[3207C>A];[3402delC] p.[His1069Gln];[Ala1135fs]
4 šeima	7 sergantis	nežinomas	Nežinomos	c.[M];[M]
5 šeima	8 sergantis	14 egzonus	Kitapasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
6 šeima	9 sergantis	14 egzonus	Kitapasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]

3.2.1 lentelės tęsinys

Šeima	VL ligonis	Mutacijos vieta	Mutacijos tipas	Genotipas
7 šeima	10 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
8 šeima	11 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
9 šeima	12 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
10 šeima	13 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
11 šeima	14 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė Nežinoma	c.[3207C>A];[M] p.[His1069Gln];[M]
12 šeima	15 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
13 šeima	16 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
13 šeima	17 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
14 šeima	18 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
15 šeima	19 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
16 šeima	20 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė Nežinoma	c.[3207C>A];[M] p.[His1069Gln];[M]
17 šeima	21 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė Nežinoma	c.[3207C>A];[M] p.[His1069Gln];[M]
18 šeima	22 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
18 šeima	23 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
19 šeima	24 sergantysis	nežinomas	Nežinomos	c.[M];[M]
20 šeima	25 sergantysis	8 ir 14 egzonai	Kitaprasmė „Rėmelio poslinkio“	c.[3207C>A];[2304dupC] p.[His1069Gln];[Met769fs]
21 šeima	26 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]
22 šeima	27 sergantysis	14 egzonas	Kitaprasmė	c.[3207C>A];[3207C>A] p.[His1069Gln];[His1069Gln]

3.3. Vilsono liga sergančiųjų giminių genotipavimo rezultatai

Ištirus dvidešimt pirmos eilės giminių iš 10 šeimų, kuriose buvo sergančiųjų VL buvo nustatyta 13 (65 proc.) c.3207C>A (p.His1069Gln)

heterozigotijos atvejų. Keturi asmenys (20 proc.) *ATP7B* geno mutantinių alelių savo genotipe neturėjo. Trys buvo heterozigotai ir jų genotipe buvo viena iš trijų mutacijų: c.3472_82del11 (p.G1158fs), c.3121C>T (p.Arg1041Trp) arba c.2304dupC (p.M769fs). Vilsono liga sergančiųjų pirmos eilės gimininių genotipavimo rezultatai pateikti 3.3.1 lentelėje.

3.3.1 lentelė. *Vilsono liga sergančiųjų pirmos eilės giminaičių genotipavimo rezultatai*

Šeima	Giminystė	Genotipas
1 šeima	1 ir 2 individų brolis. 3 individo dėdė	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
1 šeima	1 ir 2 individų brolis. 3 individo dėdė	c.[3121C>T];[N] p.[Arg1041Trp];[N]
2 šeima	4 ir 5 VL sergančiojo tėvas	c.[3472_82del11];[N] p.[G1158fs];[N]
2 šeima	4 ir 5 VL sergančiojo mama	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
2 šeima	4 ir 5 VL sergančiojo brolis	c.[N];[N]
2 šeima	4 ir 5 VL sergančiojo brolis	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
3 šeima	6 VL sergančiojo brolis	c.[N];[N]
5 šeima	8 VL sergančiojo sesuo	c.[N];[N]
5 šeima	8 VL sergančiojo sesuo	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
5 šeima	8 VL sergančiojo duktė	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
5 šeima	8 VL sergančiojo duktė	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
6 šeima	9 VL sergančiojo mama	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
8 šeima	11 VL sergančiosios brolis	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
17 šeima	21 VL sergančiojo tėvas	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
17 šeima	21 VL sergančiojo mama	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
21 šeima	23 VL sergančiojo sesuo	c.[N];[N]
21 šeima	23 VL sergančiojo mama	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
21 šeima	23 VL sergančiojo tėvas	c.[2304dupC];[N] p.[M769fs];[N]
22 šeima	22 sergančiojo tėvas	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]
22 šeima	22 sergančiojo motina	c.[3207C>A];[N] p.[His1069Gln];[N]

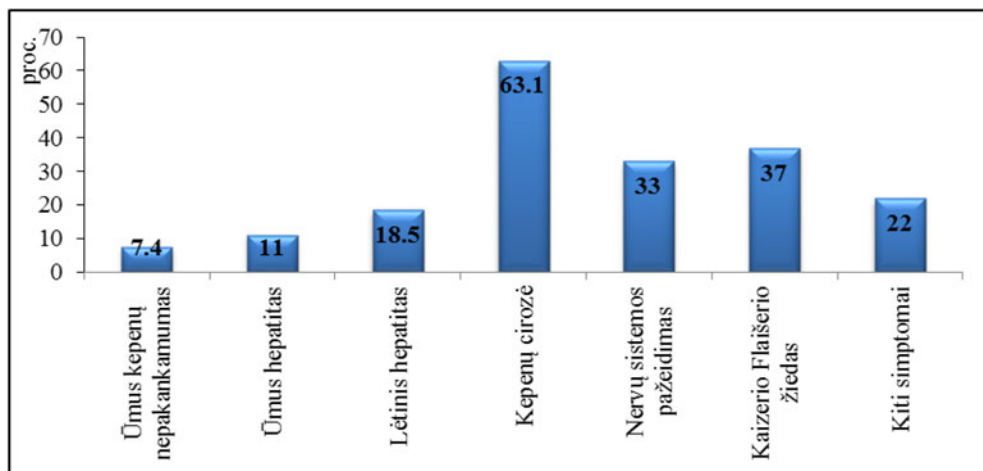
3.4. Vilsono ligonių klinikinių požymių tyrimų rezultatai

Vidutinis VL ligonių amžius ligos diagnozavimo metu buvo 25,8 m. Dviems jauniausioms ligonėms VL patvirtinta, kai joms buvo 12 metų, vyriausiam ligoniui ligos nustatymo metu buvo 58 m.

Ūmus kepenų pažeidimas (ūmus hepatitas arba ūmus kepenų nepakankamumas) buvo nustatytas penkiems ligoniams (18,5 proc.). Iš penkių ligonių du sirgo ūmiu žaibiniu kepenų nepakankamumu. Lėtine kepenų liga (lėtiniu hepatitu arba kepenų ciroze) sirgo dvidešimt du VL ligoniai (81,5 proc.). Kepenų ciroze sirgo šešiolika Vilsono liga sergančiųjų (63,1 proc.), šešiams pacientams (18,5 proc.) buvo nustatytas lėtinis hepatitas.

Nervų sistemos pažeidimai, pasireiškiantys seilėtekriu, ataksija, dizartrijs ir (ar) Parkinsono ligai būdingiais požymiais, buvo nustatyti aštuoniems (33 proc.) VL pacientams. Kaizerio-Flaišerio žiedas (toliau – KFŽ) ragenoje buvo rastas dešimčiai pacientų (37 proc.). Šešiams iš šių pacientų buvo ir nervų sistemos pažeidimai. Visi dešimt VL pacientų, turinčių KFŽ, sirgo kepenų ciroze.

Kitų organų sistemų pažeidimai buvo nustatyti septyniems (22 proc.) ligoniams. Šešiams ligoniams buvo nustatyta hemolizinė anemija, vienam ligoniui pažeisti inkstai (Fankonio sindromas). Klinikinių požymių pasireiškimo dažnis pateiktas 3.4.1 paveiksle.

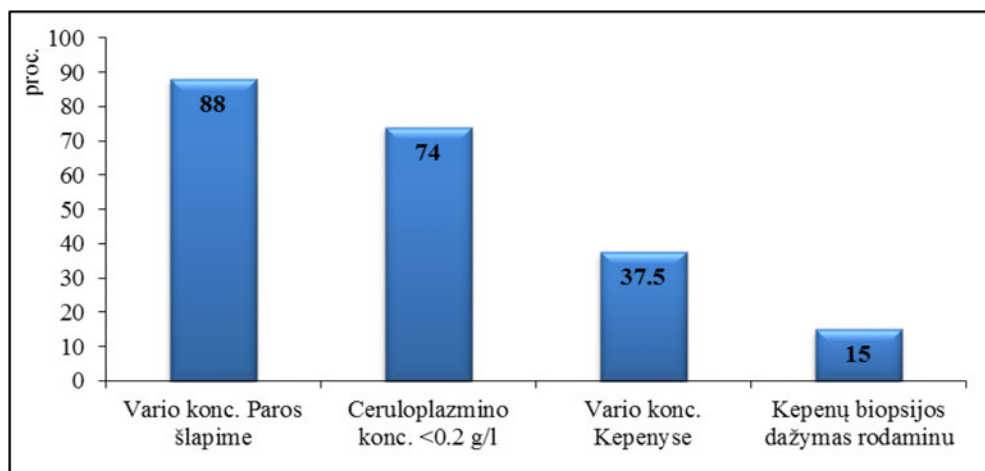


3.4.1 pav. *Sergančiųjų Vilsono liga klinikinių požymių pasireiškimo dažnis*

3.5. Vilsono ligonių biocheminių tyrimų rezultatai

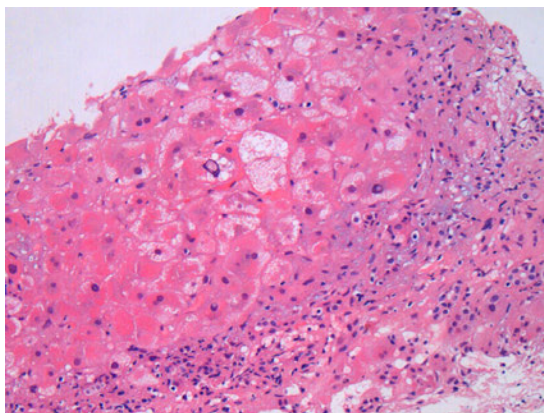
Vilsono ligoniams vertinta ceruloplazmino koncentracija serume, vario koncentracija pros šlapime ir kepenų bioplate. Vario koncentracija kepenyse buvo tirta tik aštuoniems ligoniams ir tik trims (37,5 proc. metodo jautrumas) buvo nustatyta padidėjusi.

Ištyrus 27 asmenis 20 asmenų buvo nustatyta mažesnė negu 0,2 g/l ceruloplazmino koncentracija. Nustatytas ceruloplazmino koncentracijos tyrimo jautrumas buvo 74 proc. Tyrimo metu nustatyta, kad tiksliausias ir jautriausias yra vario koncentracijos paros šlapime tyrimas. Iš 27 pacientų 24 (jautrumas 88 proc.) buvo padidėjusi vario koncentracija paros šlapime. Dviems pacientams iš trijų, kuriems buvo nustatyta normali vario koncentracija paros šlapime (<100 µg/24 val.) ji buvo didesnė negu 90 µg/24 val. Didžiausia nustatyta vario koncentracija VL diagnostikos metu buvo 4521,57 µg/24 val, mažiausia nenormali 116 µg/24 val., vidutiniškai – 640,5 µg/24 val. Vario koncentracijos paros šlapime tyrimo jautrumas – 85 proc. Biocheminių tyrimų sergant VL rezultatai apibendrinti 3.5.1 paveiksle.



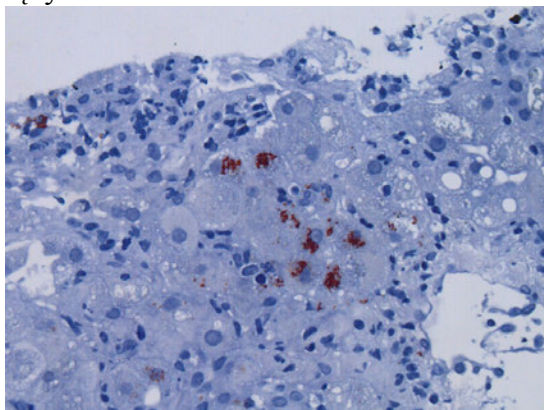
3.5.1 pav. Biocheminių tyrimų jautrumas sergant Vilsono liga

Tiriant VL buvo atliekama kepenų biopsija ir morfologinis tyrimas. Kepenų biopatai buvo dažomi hemetoksilinu – eozinu, trichromu ir rodaminu. Žemiau esančiame paveiksle pavaizduota 11 pacientės kepenų biopato nuotraukos dažytos skirtingais dažymo būdais.



3.5.2 pav. Lietuvos VL pacientės kepenų biopsijos histologinis tyrimas (HE) $\times 200$

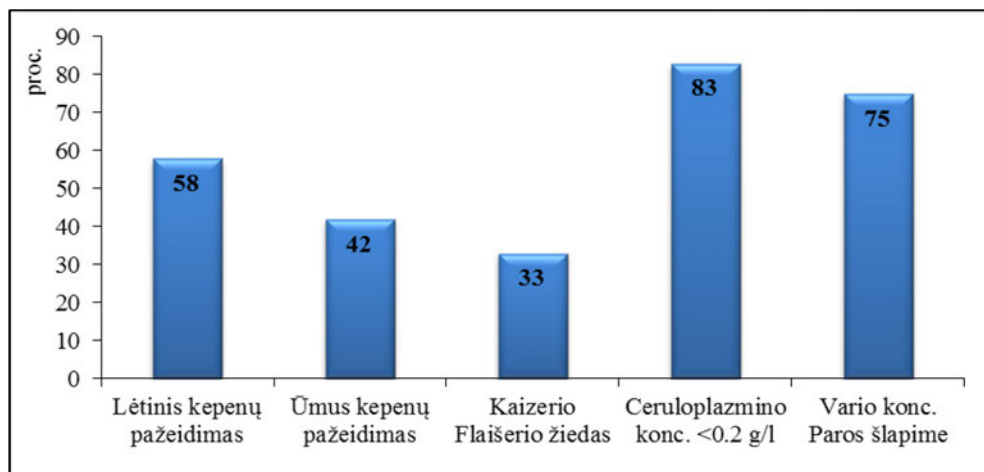
Rodaminas histologinio tyrimo metu buvo naudojamas siekiant nustatyti vario kaupimąsi kepenyse. Žemiau esančiame paveiksle yra pavaizduota histologinio kepenų tyrimo nudažius rodaminu nuotrauka.



3.5.3 pav. Lietuvos VL pacientės kepenų biopsijos histologinis tyrimas (HE) $\times 200$. Dažyta rodaminu.

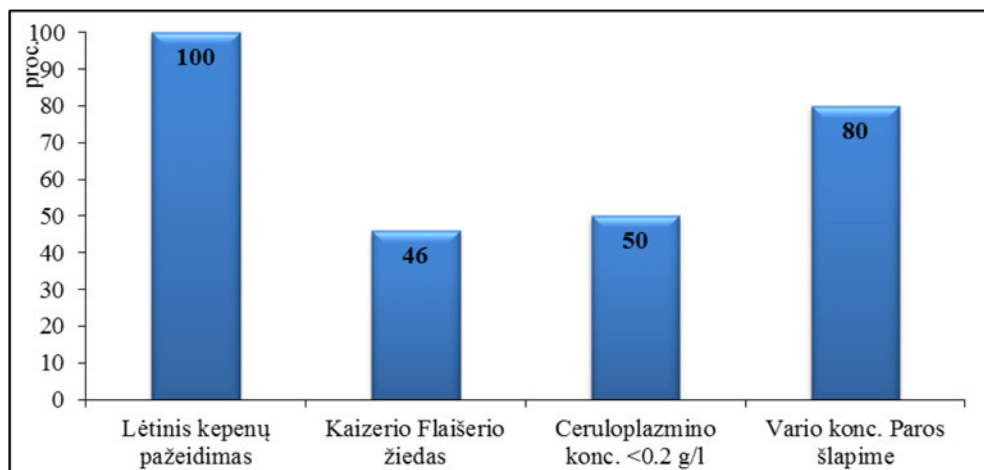
Ištirus 12 asmenis, kurių genotipas buvo sudėtinis heterozigotinis, 10 asmenų buvo nustatyta mažesnė negu 0,2 g/l ceruloplazmino koncentracija. Nustatytas ceruloplazmino koncentracijos tyrimo jautrumas buvo 83 proc. Ceruloplazmino tyrimas buvo jautresnis ir už vario koncentracijos paros šlapime tyrimą, kurio jautrumas buvo 75 proc. Trims pacientams buvo nustatyta normali vario ekskrecija su paros šlapimu. Septyni sudėtiniai heterozigotai turėjo lėtinį kepenų pažeidimą (steatozę, lėtinį hepatitą arba kepenų cirozę), penkiems buvo nustatytas ūmus pažeidimas (fatalinis kepenų nepakankamumas arba ūmus hepatitas). Keturiems ligoniams buvo ir Kaizerio-

Flaišerio žiedas. Sudėtinių heterozigotų kepenų pažeidimai ir biocheminiai pokyčiai apibendrinti 3.5.4 paveiksle.



3.5.4 pav. Sergančiųjų Vilsono liga sudėtinių heterozigotų klinikinių ir biocheminių požymių raiška

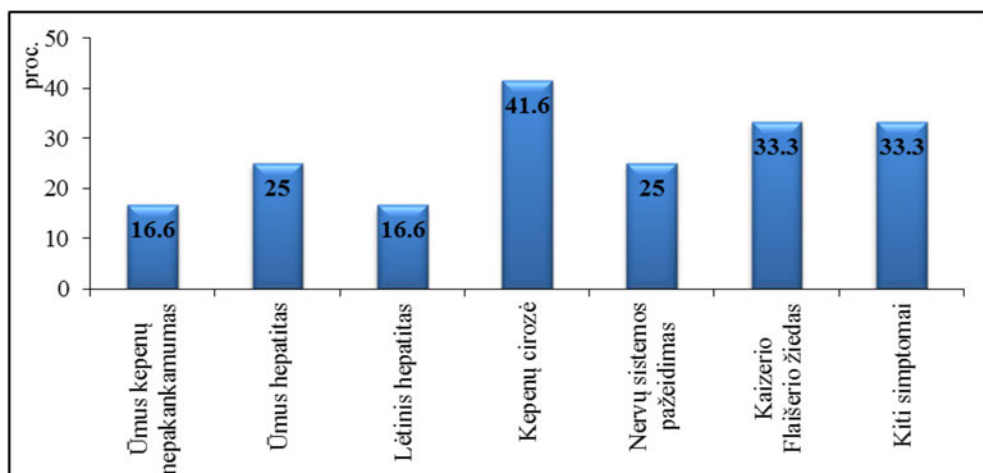
Ištirus 15 asmenų, kurių genotipas buvo c.3207C>A (p.His1069Gln) homozigotinis 10 asmenų buvo nustatyta mažesnė negu 0,2 g/l ceruloplazmino koncentracija. Ceruloplazmino koncentracijos tyrimo jautrumas buvo 50 proc. Ceruloplazmino tyrimas buvo ne toks jautrus palyginus su vario koncentracijos paros šlapime tyrimu, kurio jautrumas buvo 80 proc. Tyrimų rezultatai apibendrinti 3.5.5 lentelėje.



3.5.5 pav. Sergančiųjų Vilsono liga c.3207C>A (p.His1069Gln) homozigotų klinikinių ir biocheminių požymių raiška

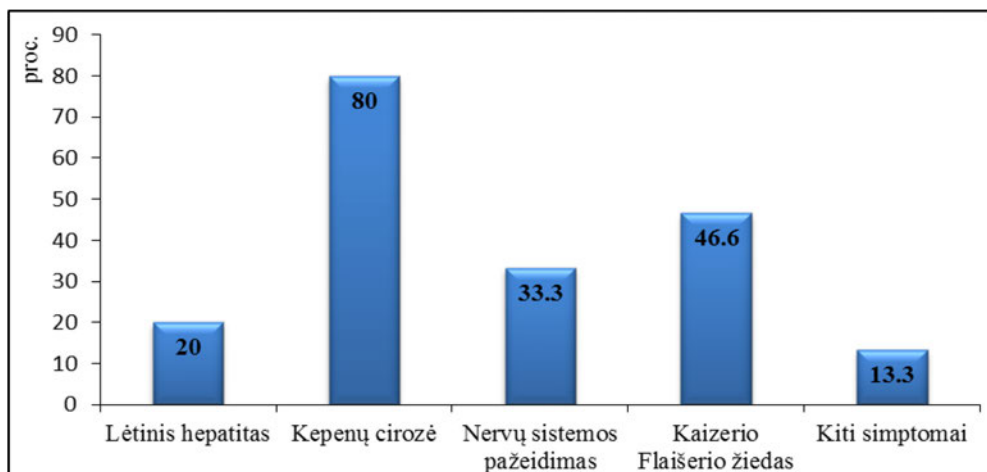
3.6. Vilsono liga sergančiųjų genotipo- fenotipo sąsajos tyrimo rezultatai

Pagal genotipą VL sergantieji buvo išskirti į dvi grupes: į sudėtinius heterozigotus ir c.3207C>A (p.His1069Gln) homozigotinius individus. Sudėtiniai heterozigotai sirgo sunkesnėmis kepenų pažeidimo formomis. Iš dvylikos pacientų net penkiems pacientams buvo ūmus kepenų pakenkimas. Dviems iš penkių pacienčių buvo fatalinis ūmus kepenų nepakankamumas, lėmęs mirtį. Nervų sistemos pažeidimas buvo trims pacientams. KFŽ buvo rastas keturiems pacientams. Sudėtinių heterozigotų klinikinių požymių pasireiškimas apibendrintas 3.6.1 paveiksle.



3.6.1 pav. *Sergančiųjų Vilsono liga sudėtinių heterozigotų klinikinių požymių pasireiškimas*

c.3207C>A (p.His1069Gln) homozigotai sirgo tik lėtinėmis kepenų pažeidimo formomis. Keturi pacientai sirgo lėtiniu hepatitu, vienuolikai pacientų nustatyta kepenų cirozė. Nervų sistemos pažeidimas nustatytas penkiems pacientams. KFŽ nustatytas septyniems pacientams, visi jie sirgo ir kepenų ciroze. Dviems pacientams buvo ir hemolizinė anemija. Klinikinių požymių pasireiškimas apibendrintas 3.6.2 paveiksle.



3.6.2 pav. *Sergančiųjų Vilsono liga c.3207C>A (p.His1069Gln) homozigotų klinikinių požymių pasireiškimas*

3.7. HFE – hemochromatozės alelių c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys) dažnis Lietuvos populiacijoje

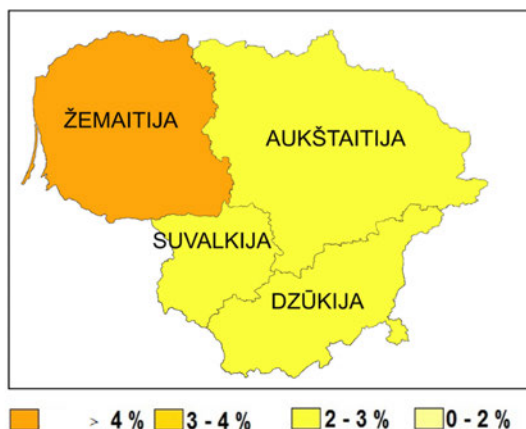
Ištyrus 1011 Lietuvos savanorių kraujo donorų genotipų buvo nustatyta, kad *HFE* geno mutacijos c.845G>A (p.Cys282Tyr) dažnis Lietuvos populiacijoje yra 2,6 proc., c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos – 15,9 proc. ir rečiausios mutacijos c.193A>T (p.S65C) dažnis yra 1,9 proc. *HFE* geno mutavusių alelių dažnis Lietuvos populiacijoje pateiktas 3.7.1 lentelėje.

3.7.1 lentelė. *HFE geno mutavusių alelių c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser 65Cys) dažnis Lietuvoje*

HFE geno mutacijos	Dažnis proc. (95 proc. PI)
c.845G>A (p.Cys282Tyr)	2,6 (1,88-3,26)
c.187C>G (p.His63Asp)	15,9 (14,33-17,51)
c.193A>T (p.Ser65Cys)	1,9 (1,33-2,53)

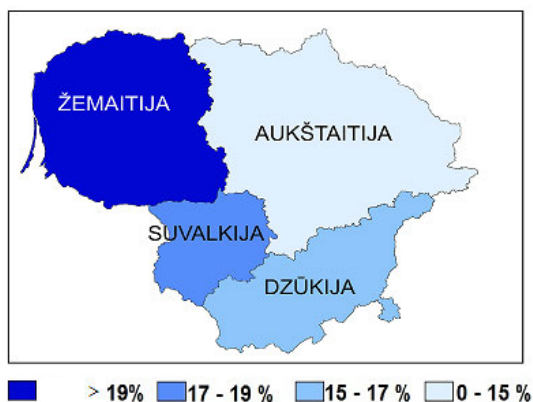
Ištyrus keturiuose Lietuvos etnokultūriniuose regionuose gyvenančių asmenų genotipus nustatytas statistškai patikimas didesnis *HFE* geno alelio c.845G>A (p.Cys282Tyr) dažnis Žemaitijos regione negu kituose Lietuvos regionuose. Šio etnokultūrinio regiono gyventojų mutacijos c.845G>A (p.Cys282Tyr) genotipe dažnis buvo 5,9 proc. ($p < 0,05$). Tiriant kitų etnokultūrinių regionų gyventojų genotipus *HFE* geno mutavusių alelių dažnis buvo mažesnis. Dzūkijoje mutavusio alelio c.845G>A (p.Cys282Tyr) dažnis buvo 2,4 proc., Aukštaitijoje – 2,3 proc., o Suvalkijoje tik 2 proc. Statistiškai

patikimas skirtumas tarp HFE geno alelio, turinčio c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutaciją, dažnių Dzūkijos, Aukštaitijos ir Suvalkijos gyventojų genotipuose, nebuvo nustatytas. c.845G>A (p.Cys282Tyr) alelio dažnis skirtinguose Lietuvos etnokultūriniuose regionuose parodytas 3.7.1 paveiksle.



3.7.1 pav. c.845G>A (p.Cys282Tyr) alelio paplitimo dažnis skirtinguose Lietuvos etnokultūriniuose regionuose

Didžiausias mutacijos c.187C>G (p.His63Asp) dažnis buvo nustatytas Žemaitijoje (19,6 proc.), rečiau nustatoma ši mutacija – Suvalkijoje (17,2 proc.), dar mažesnis dažnis – Dzūkijos (15,7 proc.) ir Aukštaitijos (14,7 proc.) etnokultūriniuose regionuose ($p>0,05$). c.193A>T (p.Ser65Cys) alelio dažnis tai pat Žemaitijoje buvo didžiausias – 3,4 proc., rečiau ši mutacija buvo nustatoma Aukštaitijoje (2,1 proc.), Suvalkijoje (1,7 proc.) bei Dzūkijoje (1,4 proc.). Statistiškai patikimo skirtumo tarp c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys) mutacijų dažnio Lietuvos etnokultūriniuose regionuose nenustatyta ($p>0,05$). c.187C>G (p.His63Asp) mutacijos dažnis skirtinguose Lietuvos etnokultūriniuose regionuose pavaizduotas 3.7.2. paveiksle.



3.7.2 pav. *c.187C>G* (*p.His63Asp*) mutacijos dažnis skirtinguose Lietuvos etnokultūriniuose regionuose

3.8. HFE-hemochromatozės genotipų dažnis Lietuvos populiacijoje

Ištyrus 1011 savanorių kraujo donorų buvo nustatytas vienas *c. [845G>A]*; *[845G>A]* p. *[CysC282Tyr]*; *[CysC282Tyr]* homozigotas (0,1 proc.) ir 51 (5,1 proc.) heterozigotas. Tyrimo metu buvo nustatyta 12 asmenų, kurių genotipas buvo *c. [845G>A]*; *[c.187C>G]* p. *[CysC282Tyr]*; *[His63Asp]*, vieno asmens genotipas buvo sudėtinis heterozigotinis *c. [845G>A]*; *[193A>T]* p. *[CysC282Tyr]*; *[Ser65Cys]*. Iš likusių 40 asmenų genotipe be *c.845G>A* (*p.Cys282Tyr*) mutacijos kitas HFE geno alelis buvo nemutavęs.

Dvidešimt šeši (2,6 proc.) tiriamieji buvo homozigotai, jų genotipas buvo *c.[187C>G]*; *[187C>G]* p.*[His63Asp]*; *[His63Asp]* ir 270 (26,7 proc.) asmenims buvo nustatyta *c.187C>G* (*p.His63Asp*) mutacijos heterozigotija. 39 tiriamieji (3,7 proc.) buvo *c.193A>T* (*p.Ser65Cys*) heterozigotai. Genotipavimo rezultatai pateikti 3.8.1 lentelėje. Statistiškai reikšmingo nukrypimo nuo Hardžio-Vainbergo dėsnio nebuvo nustatyta.

3.8.1 lentelė. Lietuvos populiacijos HFE geno genotipavimo rezultatai.

Genotipas	Dažnis n (proc.) (95 proc. PI)	Teoriškai laukiami rezultatai pagal Hardžio Vainbergo dėsnį (proc.)
c.[845G>A];[845G>A] p.[CysC282Tyr];[CysC282Tyr]	1 (0,1) (0-0,29)	0,68 (0,067)
c.[845G>A];[187C>G] p.[CysC282Tyr];[His63Asp]	12 (1,2) (0,52-1,86)	8,36 (0,83)
c.[845G>A];[193A>T] p.[CysC282Tyr];[Ser65Cys]	1 (0,1) (0-0,29)	1 (0,099)
c.[845G>A];[N] p.[CysC282Tyr];[N]	38 (3,8) (2,59-4,93)	41,85 (4,14)
c.[187C>G];[187C>G] p.[His63Asp];[His63Asp]	26 (2,6) (1,59-3,55)	25,56 (2,53)
c.[187C>G];[193A>T] p.[His63Asp];[Ser65Cys]	4 (0,4) (0,01-0,79)	6,11 (0,6)
c.[193A>T];[193A>T] p.[Ser65Cys];[Ser65Cys]	0	2 (0,2)
c.[187C>G];[N] p.[His63Asp];[N]	254 (25) (22,45-27,79)	255,91 (25,31)
c.[193A>T];[N] p.[Ser65Cys];[N]	34 (3,4) (2,25-4,47)	30,58 (3,03)
c.[N];[N]	641 (63,4) (60,43-66,37)	640,59 (63,36)
Viso	1011 (100)	1011 (100)

3.9. HFE-hemochromatozės genotipų dažnis skirtinguose Lietuvos etnokultūriniuose regionuose

Ištyrus 148 Suvalkijos etnokultūrinio regiono savanorius kraujo donorus buvo rastas 1 (0,7 proc.) c. [845G>A]; [845G>A] p. [CysC282Tyr]; [CysC282Tyr] homozigotas bei nustatyti 5 heterozigotai (3,4 proc.). Asmenų, kurių genotipas yra c. [187C>G];[187C>G] p. [His63Asp]; [His63Asp] buvo 4 (2,7 proc.) ir net 43 tiriamieji (29 proc.) buvo heterozigotai. Suvalkijos regione nebuvo nustatytas nei vienas mutacijos c. 193A>T (p. Ser65Cys) homozigotas ir heterozigotija buvo nustatyta nustatyta 5 (3,4 proc.) asmenims. Suvalkijos etnokultūrinio regiono genotipavimo rezultatai pateikti 3.9.1. lentelėje.

3.9.1 lentelė. Suvalkijos regiono gyventojų HFE geno mutavusių alelių genotipavimo rezultatai

Genotipas	Dažnis n (proc.) (95 proc. PI)	Teoriškai laukiami rezultatai pagal Hardžio Vainbergo dėsnį (proc.)
c.[845G>A];[845G>A] p.[CysC282Tyr];[CysC282Tyr]	1 (0,68) (0-2)	0,05 (0,03)
c.[845G>A];[187C>G] p.[CysC282Tyr];[His63Asp]	2 (1,35) (0-3,21)	1 (0,68)
c.[845G>A];[N] p.[CysC282Tyr];[N]	2 (1,35) (0-3,21)	4,7 (3,2)
c.[187C>G];[187C>G] p.[His63Asp];[His63Asp]	4 (2,7) (0,09-5,31)	4,4 (3)
c.[187C>G];[N] p.[His63Asp];[N]	41 (27,7) (20,49-34,91)	40,3 (27,2)
c.[193A>T];[N] p.[Ser65Cys];[N]	5 (3,38) (0,47-6,29)	3,9 (2,6)
c.[N];[N]	93 (62,84) (55,05-70,63)	92,6 (62,6)
Viso	148 (100)	148 (100)

Aukštaitijoje buvo rasti 17 (4,5 proc.) mutacijos c.845G>A (p.Cys282Tyr) heterozigotiniai individai bei nustatyti 7 (1,85 proc.) pagal mutaciją c.187C>G (p.His63Asp) homozigotai bei 97 (25,7 proc.) heterozigotai. 13 asmenų (3,4 proc.) buvo heterozigotiniai individai pagal c.193A>T (p.Ser65Cys) mutaciją. Genotipavimo rezultatai pateikti 3.9.2 lentelėje.

3.9.2 lentelė. Aukštaitijos regiono gyventojų HFE geno mutavusių alelių genotipavimo rezultatai

Genotipas	Dažnis n (proc.) (95% PI)	Teoriškai laukiami rezultatai pagal Hardžio Vainbergo dėsnį (proc.)
c.[845G>A];[187C>G] p.[CysC282Tyr];[His63Asp]	5 (1,3) (0,16-2,44)	2,6 (0,68)
c.[845G>A];[N] p.[CysC282Tyr];[N]	11 (3) (1,28-4,72)	14 (3,7)
c.[187C>G];[187C>G] p.[His63Asp];[His63Asp]	7 (2) (0,59-3,41)	8,2 (2,2)
c.[187C>G];[N] p.[His63Asp];[N]	90 (24) (19,69-28,31)	90 (23,8)
c.[845G>A];[193A>T] p.[CysC282Tyr];[Ser65Cys]	1 (0,3) (0-0,85)	0,4 (0,11)
c.[187C>G];[193A>T] p.[His63Asp];[Ser65Cys]	2 (0,5) (0-1,21)	2,3 (0,61)
c.[193A>T];[N] p.[Ser65Cys];[N]	13 (3,44) (1,6-5,28)	12,9 (3,4)
c.[N];[N]	249 (65,87) (61,09-70,65)	248 (65,6)
Viso	378 (100)	378 (100)

Dzūkijoje mutacijos c. 845G > A (p. Cys282Tyr) heterozigotiniai asmenys nustatyti 16 atvejų, o mutacijos c. 187C > G (p.His63Asp) homozigotų buvo 11. Tuo tarpu c. 187C > G (p. His63Asp) mutacijos heterozigotinių individų buvo 96. Mutacijos c. 193A>T (p.Ser65Cys) heterozigotiniai individai sudarė 11 tiriamųjų bei buvo nustatyti 2 sudėtiniai heterozigotai c. [845G>A]; [187C>G] p. [CysC282Tyr]; [His63Asp].

3.9.3 lentelė. Dzūkijos regiono gyventojų HFE geno genotipavimo rezultatai.

Genotipas	Dažnis n (proc.) (95 proc.PI)	Teoriškai laukiami rezultatai pagal Hardžio Vainbergo dėsnį (proc.)
c.[845G>A];[187C>G] p.[CysC282Tyr];[His63Asp]	2 (0,52) (0-1,24)	2,9 (0,8)
c.[845G>A];[N] p.[CysC282Tyr];[N]	16 (4,2) (2,19-6,21)	14,8 (3,9)
c.[187C>G];[187C>G] p.[His63Asp];[His63Asp]	11 (2,9) (1,22-4,58)	9,4 (2,5)
c.[187C>G];[N] p.[His63Asp];[N]	96 (25) (20,66-29,34)	96,8 (25,3)
c.[193A>T];[N] p.[Ser65Cys];[N]	11 (2,9) (1,22-4,58)	8,6 (2,25)
c.[N];[N]	247 (64,5) (59,71-69,29)	248 (64,8)
Viso	383 (100)	383 (100)

Žemaitijoje nustatyti 9 mutacijos c. 845G > A (p.Cys282Tyr) heterozigotai, 27 mutacijos c. 187C > G (p.His63Asp) heterozigotiniai asmenys ir 4 mutacijos c. 187C > G (p.His63Asp) homozigotiniai individai. Mutacijos c. 193A > T (p. Ser65Cys) homozigotiniai individai neidentifikuoti, bet buvo nustatyti 5 heterozigotiniai individai bei patvirtinti sudėtinė heterozigotija c. [845G>A]; [187C>G]. p. [CysC282Tyr]; [His63Asp] 3 atvejais ir c. [187C>G]; [193A>T] p. [His63Asp]; [Ser65Cys] 2 atvejais.

3.9.4 lentelė. Žemaitijos regiono gyventojų HFE geno genotipavimo rezultatai

Genotipas	Dažnis n (proc.) (95 proc. PI)	Teoriškai laukiami rezultatai pagal Hardžio Vainbergo dėsnį (proc.)
c.[845G>A];[187C>G] p.[CysC282Tyr];[His63Asp]	3 (2,9) (0-6,16)	2,4 (2,4)
c.[845G>A];[N] p.[CysC282Tyr];[N]	9 (8,8) (3,3-14,3)	8,6 (8,4)
c.[187C>G];[187C>G] p.[His63Asp];[His63Asp]	4 (3,9) (0,14-7,66)	3,9 (3,8)
c.[187C>G];[N] p.[His63Asp];[N]	27 (26,4) (17,85-34,95)	28,4 (27,8)
c.[187C>G];[193A>T] p.[His63Asp];[Ser65Cys]	2 (2) (0-4,72)	1,6 (1,6)
c.[193A>T];[N] p.[Ser65Cys];[N]	5 (5) (0,77-9,23)	4,9 (4,8)
c.[N];[N]	52 (51) (41,3-60,7)	51,5 (51)
Viso	102 (100)	102 (100)

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Vilsono liga ir *HFE*-hemochromatozė yra paveldimos pagal Mendelio dėsnius ligos. Jos sudaro svarbią virškinimo organų sistemos ligomis sergančiųjų dalį. Biocheminiai šių ligų diagnostikai naudojami laboratoriniai tyrimo metodai nėra pakankamai jautrūs ir specifiški. Todėl vis svarbesnė tampa molekulinė genetinė diagnostika. Molekuliniais tyrimo metodais yra patvirtinama liga, kuri buvo įtarta remiantis klinikiniais ir (ar) biocheminiais tyrimais. Vilsono ligos atveju sutrinka vario apykaita ir padidėja vario kaupimasis kepenyse, centrinėje nervų sistemoje ir akies ragenoje. Sergant VL būna mutavęs *ATP7B* genas. Jau aprašyta daugiau negu 300 *ATP7B* geno mutacijų. Įvairiose šalyse dažnesnės yra skirtingos mutacijos ir laboratoriniai diagnostiniai algoritmai dažnai sudaromi atsižvelgiant į vyraujančias toje populiacijoje mutacijas. Lietuvos Vilsono ligonių *ATP7B* geno mutacijos buvo netirtos, todėl vienas iš šio darbo uždavinių buvo ištirti Vilsono liga sergančiuosius Lietuvoje bei nustatyti dažniausias mutacijas. Dažniausia Lietuvoje nustatyta mutacija c.3207C>A (p.His1069Gln), kurios dažnis 74,1 proc., yra taip pat yra pati dažniausia ir kitose Centrinės ir Rytų Europos šalių populiacijose. Lenkijoje nustatytas c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos dažnis buvo 72 proc., Rytų Vokietijoje–63 proc., Čekijoje–57 proc., Latvijoje–52,5 proc., o Rusijoje 49 proc. [25, 107, 16]. Manoma, kad c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacija atsirado Slavų populiacijoje, gyvenusioje tarp Vyslos ir Elbės upių ir buvo išplatinta vakarų ir pietų kryptimis migruojant gyventojams [107].

Keletas migracijos bangų dabartinėje Lenkijos, Čekijos ir Rytų Vokietijos teritorijoje lėmė c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos išplitimą Centrinėje ir Rytų Europoje [107]. c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacija galėjo būti išplatinta Lietuvos teritorijoje poledyniniu laikotarpiu migruojant į dabartinę Lietuvos teritoriją gyventojams iš dabartinės Varšuvos apylinkių. Retesnė ši mutacija germanų tautų populiacijose Austrijoje–44 proc., Olandijoje–34 proc., Švedijoje–38 proc. [78, 68]. Dar retesnė c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacija Pietų ir Šiaurės Europoje. Vengrijoje ir Bulgarijoje mutacijos dažnis yra 47 proc. ir 59 proc., o pietinėse šalyse ši mutacija retesnė Graikijoje–35 proc., kontinentinėje Italijoje 13-17 proc., o Turkijoje tik 9,4 proc. [83, 56, 34].

Kitos mutacijos nustatytos VL sergantiesiems Lietuvoje buvo *ATP7B* geno 8, 15 ir 16 egzonuose: c.3472-82del11, c.3402delC, c.3121C>T (p.Arg1041Trp), c.2304dupC ir c.3402delC mutacija. Kai kurios iš šių mutacijų taip pat dažnai nustatomos ir kitų Centrinės ir Rytų Europos šalių ligonių genotipuose. Pvz., Lenkijos VL pacientų genotipe yra dažna c.3402delC (15 egzone) mutacija [40].

Mutacijos 8, 14, 15, 16 ir 20 egzonuose nustatytos tiriant Šiaurės, Rytų ir Centrinės Europos šalių populiacijas. Šiuose egzonuose mutacijos buvo nustatomos Didžiosios Britanijos, buvusios Jugoslavijos, Bulgarijos bei kontinentinės Italijos pacientų genotipuose [24, 55, 103].

Pietų Europoms šalims nustatomos specifinės, ne Rytų, Centrinės ar Šiaurės Europos šalims būdingos mutacijos. Kai kurioms populiacijoms yra įrodytas ir „protėvio efektas“. Pvz., Sardinijoje dažniausia mutacija VL sergančiųjų genotipe yra -441/-427 del, kuri atsirado prieš 50 kartų [55]. Dažnos mutacijos ir 6 egzone Ispanijos, 13 ir 14 egzonuose Graikijos ir Turkijos pacientų tarpe [61, 62, 55].

Specifiškiausias Vilsono ligos diagnostikos kriterijus yra *ATP7B* geno mutacijų nustatymas. Šis tyrimas turėtų būti derinamas su klinikiniais ir laboratoriniais duomenimis. Remiantis mūsų atliktais tyrimais galima teigti, kad pirmiausia Lietuvos ligoniai turi būti tiriami dėl c. 3207C > A (p. His1069Gln) mutacijos. Jei ligoniai yra heterozigotiniai individai arba mutacijos abiejuose aleliuose nėra nustatomos tuomet reikėtų ištirti bent 8, 14, 15, 16 ir 20 egzonus, jei nėra galimybių DNR sekoskaitos būdu ištirti viso *ATP7B* geno.

VL buvo įtarta ir patvirtinta remiantis klinikiniais ir laboratoriniais tyrimais. Visiems Lietuvos Vilsono liga sergantiesiems pasireiškė kepenų pažeidimu. Dažniausiai Lietuvos VL ligoniams buvo nustatyta kepenų cirozė (63,1 proc.), rečiau buvo ūmus kepenų pažeidimas, pasireiškęs fataliniu kepenų nepakankamumu ar ūmiu hepatitu. Daugumai kitų šalių pacientų taip pat buvo dažniausiai buvo nustatytas kepenų pažeidimas. Latvijoje iš 40 pacientų 33 buvo kepenų pažeidimas (82,5 proc.), 88 proc. Kinijos pacientų, 73 proc. Ispanijos ir Čekijos pacientų buvo nustatytas kepenų pažeidimas [107].

Nervų sistemos pažeidimas Vilsono ligos diagnozavimo metu buvo nustatytas rečiau. Mūsų nustatytas nervų sistemos pažeidimas buvo trečdaliui ligonių (33 proc.). Lenkijos VL pacientams nervų sistemos pažeidimas buvo nustatytas 50 proc. pacientų [40]. Specifinis Vilsono ligos požymis – KFŽ, kuris Lietuvos Vilsono ligoniams buvo rečiau nustatytas – tik 37 proc. atvejų. Steindl ir kt. 1997 metais KFŽ nustatė 55 proc. tirtų ligonių.

Tiriant genotipo fenotipo sąsają nustatyta, kad mutacijos, sukeliančios „rėmelio poslinkį“ arba priešlaikinio terminalinio kodono atsiradimą, lemia ir sunkesnę klinikinę eigą [40]. Lietuvos VL pacientai, kurių genotipe buvo sutrumpėjusį baltymą sukelianti mutacija, taip pat sirgo sunkesne kepenų pažeidimo forma arba kepenų pažeidimu, kuris pasireiškė anksčiau. Fatalinis kepenų pažeidimas buvo nustatytas ligonei, kurios *ATP7B* geno alelyje buvo vienuolikos nukleotidų delecija. Kadangi klinikiniai ir laboratoriniai tyrimai nėra specifiniai, todėl tebelieka svarbus šių tyrimų jautrumo bei specifiškumo nustatymas. Lietuvos VL sergantiesiems buvo tiriama ceruloplazmino

koncentracija kraujo serume, vario išsiskyrimas su šlapimu ir vario kaupimas kepenyse. Nustatyta, kad ceruloplazmino koncentracijos tyrimo jautrumas buvo Lietuvos VL buvo 74 proc. Lyginant ceruloplazmino koncentracijos tyrimo rezultatus tarp dviejų pagal genotipą VL grupių nustatyta, kad ceruloplazmino koncentracijos nustatymas yra jautresnis metodas sudėtiniais VL heterozigotiniams asmenims. Tuo tarpu vario koncentracijos tyrimo specifiškumas 88 proc. sutapo su kai kurių anksčiau atliktų tyrimų duomenimis. Steindl ir kt. 1997 nurodo, kad ceruloplazmino koncentracijos tyrimo jautrumas buvo 40 proc., o vario koncentracijos specifiškumas 60 proc.

Kitos paveldimos metabolinės kepenų ligos HFE - hemochromatozės molekulinė genetinė diagnostika paremta dviejų c. 845G > A (p.Cys282Tyr) ir c. 187C > G (p. His63Asp) mutacijų nustatymu.

Jau 1975 metais Simon ir bendraautoriai nustatė, kad „*idiopatinės*“ hemochromatozės paveldėjimas yra susijęs su HLA-A3, HLA-B ir HLA-DR genų grupės tam tikro haplotipo paveldėjimu [94]. Simon ir kt. atliktas tyrimas patvirtino autosominį recesyvinį ligos paveldėjimo mechanizmą bei įrodė, kad genas lemiantis pirminės hemochromatozės atsiradimą yra 6 autosomos trumpajame petyje [94]. 1980 metais Simon su bendraautoriais paskelbė hipotezę, remdamiesi pirminės hemochromatozės tyrimais, kurioje teigė, kad c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija turėjo atsirasti 1000 metų prieš Kristaus gimimą keltų tarpe. Keltų tauta susiformavo prieš 3000 metų Šiaurės Alpėse ir vėliau išplito Centrinėje ir Pietų Europoje išplatindami ir HFE – hemochromatozę lemiantį geną [94, 95].

Alternatyvi hipotezė aiškinanti c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnį skirtingose populiacijose buvo pasiūlyta 1981 ir 1983 metais [80, 62, 63]. Ji teigė, kad c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija atsirado Skandinavijoje ir buvo išplitinta vikingų. Šiuo metu neabejojama, kad c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutaciją išplatino asmuo, kuris gyveno Airijoje arba Skandinavijos šalyje ir turėjo HLA-A3-B7 arba HLA-A3-B14 haplogrupę [80]. Abiems hipotezėms neprieštarauja ir c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnio tyrimai skirtingose Europos šalių populiacijose. Dažniausiai c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija nustatoma Europos šalyse - Airijoje (11,4 proc.), Didžiojoje Britanijoje (8,2 proc.), Britanėje, esančioje Prancūzijos provincijoje ir Skandinavijos šalyse. Skandinavijos šalių c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažniai yra skirtingi, bet skirtumai yra nedideli – 6,8 proc. Norvegijoje, 5,8 proc. Švedijoje, 5,6 proc. Danijoje ir 5,1 proc. Islandijoje [63].

Visose Rytų ir Centrinės Europos šalių populiacijose c.845G > A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis buvo panašus: 3,4 proc. Čekijoje ir Vengrijoje, 3,5 proc. Estijoje ir Rusijoje (Maskvos regionas), 4,04 proc. Slovakijoje ir tik šiek tiek ši mutacija buvo dažnesnė Šiaurės Lenkijoje – 4,73 proc. [5, 84, 86,]. Lietuvos populiacijos gyventojų tarpe c.845G > A (p.Cys282Tyr) mutacijos

dažnis buvo 2,6 proc. Šis dažnis yra artimiausias mutacijos dažniui nustatytam Pietų Lenkijoje–3,1 proc. [67]. Buvusiose Jugoslavijos respublikose c.845G > A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis panašus - 3,6 proc. Slovėnijoje, 3,3 proc. Kroatijoje, 4 proc. Bosnijoje ir Hercegovinoje. Mažiausias dažnis buvo nustatytas Serbijoje ir Juodkalnijoje – 1,6 proc. Austrijoje mutacijos dažnis 3,7 proc., Vokietijoje 3,8 proc. c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijai yra būdinga, kad jos dažnis Europoje mažėja Šiaurės - Pietų ir Vakarų – Rytų kryptimi.

Pietų Europos šalyse c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija buvo rečiausiai sutinkama: Rumunijoje–1,75 proc., Graikijoje c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis buvo 0,3 proc. o Bulgarijos populiacijoje mutacija nenustatyta (0 proc.) [82, 81].

Šio darbo metu c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis buvo tirtas ir skirtinguose Lietuvos etnokultūriniuose regionuose. c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis buvo panašus trijuose Lietuvos etnokultūriniuose regionuose ir statistškai patikimai nesiskyrė Dzūkijoje (2,4 proc.), Aukštaitijoje - 2,3 proc. ir Suvalkijoje - 2 proc. Didžiausias c.845G>A (p.Cys282Tyr) *HFE* geno alelio dažnis statistiškai patikimai buvo didesnis Žemaitijoje. Jos teritorijoje didesnę c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos paplitimą gal būt galėjo lemti vikingų imigracija. Vikingai dabartinėje Lietuvos teritorijoje pasirodė 800 – 1000 metų po Kristaus gimimo. Vykstant asimiliacijai su žemaičiais pakito populiacijos genų sudėtis ir buvo išplitinta c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacija Žemaitijos etnokultūriniame regione.

HFE – hemochromatozės mutavusių alelių heterozigotiniai nešiotojai yra 5 – 14 proc. Vakarų ir Šiaurės Europos šalių gyventojų ir vienas asmuo iš 200 – 400 bendros populiacijos asmenų yra c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos homozigotas. 85 – 90 proc. pacientų, sergančių *HFE* – hemochromatoze yra homozigotai ir tik 5 proc. yra sudėtiniai heterozigotai. Natūralu, kad ši mutacija gali turėti evoliucinę prasmę. Manoma, kad ji apsaugojo nuo mažakraujystės, atsirandančios dėl dažno kraujo netekimo.

Didesnis *HFE* geno mutavusių alelių dažnis lemia ir didesnę homozigotinių individų, kurie gali susirgti *HFE* – hemochromatoze, dažnį. Europoje daugiausia homozigotų, kurių genotipas yra c.[845G>A];[845G>A] p.[Cys282Tyr];[Cys282Tyr], yra Airijoje bei Didžiojoje Britanijoje. Rečiau nustatomi homozigotiniai individai Danijoje (0,4 proc.) ir kitose Skandinavijos šalyse. Ištyrus Lietuvos populiaciją buvo nustatytas vienas individas (0,1 proc.), kurio genotipas p. [Cys282Tyr]; [Cys282Tyr] ir 51 tiriamasis (5,1 proc.), kuriam buvo būdinga sudėtinė heterozigotija p. [Cys282Tyr];[His63Asp]. Europoje atliktų tyrimų duomenimis labai panašus homozigotinių individų dažnis buvo ir pietų Lenkijoje – tikrai vienas homozigotinis individas buvo nustatytas ištyrus 871 tiriamąjį ir buvo patvirtinti 6 proc. heterozigotijos atvejai [67]. Šiaurės Lenkijos gyventojų tarpe c.845G>A (p.Cys282Tyr) alelio dažnis

nedaug skyrėsi – tarp 2008 metais ištirtų 1517 asmenų du buvo c.845G>A (p.Cys282Tyr) homozigotiniai individai (0,2 proc.) ir 117 c.845G>A (p.Cys282Tyr) heterozigotiniai individai. Europinės dalies Rusijoje homozigotinių individų buvo 0,2 proc., tuo tarpu heterozigotiniai individai sudarė 6,4 proc. Estijoje c.845G>A (p.Cys282Tyr) homozigotinių individų buvo 0,2 proc. ir 6,6 proc. buvo heterozigotinių individų. Negalime *HFE* geno alelio c.845G>A (p.Cys282Tyr) dažnio Lietuvoje palyginti su Latvijos duomenimis, kadangi *HFE* - hemochromatozės geno alelių dažnio tyrimai neatlikti. c.845G>A (p.Cys282Tyr) homozigotinių ir heterozigotinių individų dažnio kitimai atspindi ir gradiento Šiaurės–Pietų kryptimi kitimus. Mažiau homozigotinių ir heterozigotinių individų nustatyta Slovėnijoje (0,16 proc. ir 6,9 proc.) bei Kroatijoje (0,5 proc. ir 7 proc.). Dar mažesnis buvo *HFE* alelio dažnis Bulgarijos, Graikijos ir Rumunijos populiacijose.

c.187C>G (p.His63Asp) mutacija atsirado baskų populiacijoje Paleolite laikotarpyje ir išplito kitose Europos šalyse [20]. Todėl šio alelio didesnis dažnis yra Pietų Europos šalyse - Portugalijoje (20,4 proc.), Prancūzijoje (17 proc.) ir Ispanijoje (16,4 proc.) [17]. Lietuvoje nustatytas alelio dažnis 15,8 proc. nesiskyrė nuo kitų Rytų ir Centrinės Europos šalių. Lenkijoje c.187C>G (p.His63Asp) alelio dažnis buvo 16,2 proc., Čekijoje 15 proc., Rusijoje (Maskvos regionas) 15,2 proc. [67,86]. Rečiau mutacija buvo nustatyta Estijoje (13,6 proc.). Alelis retesnis buvo Skandinavijos šalyse. Danijoje mutacijos dažnis buvo 12,8 proc., Švedijoje 12,1 proc., Norvegijoje 11,4 proc., Suomijoje 10,1 proc. Retas alelis buvo ir vokiškai kalbančiose šalyse - Vokietijoje c.187C>G (p.His63Asp) dažnis buvo (10,8 proc.) ir Austrijoje (11,1 proc.).

1999 Mura ir kt. nustatė mutavusį *HFE* geno c.193A>T (p.Ser65Cys) alelį. Ligi šiol šio alelio reikšmė *HFE*-hemochromatozės klinicinei raiškai nėra galutinai aiški. Nors ištirta nedaug populiacijų, bet visose populiacijose c.193A>T (p.Ser65Cys) alelio dažnis statistiškai patikimai nesiskyrė. Lietuvos gyventojų c.193A>T (p.Ser65Cys) alelio dažnis 1,9 proc. buvo panašus į Prancūzijoje nustatytą (1,95 proc.), nesiskyrė nuo Slovėnijos (1,8 proc.) ir Kroatijos (1,8 proc.). Mažesnis c.193A>T (p.Ser65Cys) alelio dažnis buvo nustatytas Čekijoje (1,25 proc.), Serbijoje (1,6 proc.). Didesnis c.193A>T (p.Ser65Cys) alelio dažnis buvo nustatytas Pietų Europos šalyse – Ispanijoje bei Portugalijoje. Ispanijoje c.193A>T (p.Ser65Cys) buvo 2 proc., Portugalijoje (Madeiros salose) 1 proc. Skandinavijos šalyse c.193A>T (p.Ser65Cys) alelio dažnis buvo skirtingas – didžiausias dažnis buvo nustatytas Suomijoje (2,2 proc.), retesnis buvo Danijoje (1,8 proc.), Švedijoje (1,4 proc.) ir rečiausiai aptinkamas c.193A>T (p.Ser65Cys) alelis Farerų salose (1 proc.).

Kitos, ne *HFE* hemochromatozės formos pasireiškia 2 – 4 gyvenimo dešimtmetį. *HFE* hemochromatozei būdinga švelnesnė ligos eiga, kuri pasireiškia penktą vyrų gyvenimo dešimtmetį ar šeštą moterų gyvenimo

dešimtmetį. Daugelis pacientų, turinčių HFE hemochromatozės predispoziciją, šia liga nesuserga. Ištyrus Lietuvos savanorių kraujo donorų populiaciją nustatyta, kad 0,1 proc. savanorių kraujo donorų buvo c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos homozigotai. 1,2 proc. savanorių buvo sudėtiniai heterozigotai. Lietuvoje turėtų būti 3000 c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos homozigotinių individų ir apie 30 000 sudėtinių heterozigotų. Didžiausio tyrimo Australijoje metu nustatant *HFE* geno penetrantiškumą buvo ištirtas 31 000 žmonių ir nustatyta, kad tikrai 28 proc. vyrų ir 1 proc. moterų turėjo klinikinius HFE-hemochromatozės požymius (Allen ir kt. 2008). Nors Lietuvoje nėra vieningos HFE hemochromatozės sistemos šia liga sergančiųjų turėtų būti 500 asmenų.

Apibendrinant galima teigti, kad VL ir HFE hemochromatozė yra retos paveldimos ligos, kurias svarbu tiksliai diagnozuoti ir gydyti. VL sergančiųjų genotipavimo rezultatai įrodė, kad dažniausia Lietuvos VL pacientų mutacija buvo c.3207C>A (p.His1069Gln), dažniausia ir kitose Rytų ir Centrinės Europos šalių populiacijose. Kitos nustatytos VL ligonių *ATP7B* geno alelio mutacijos buvo retos. Nors molekulinė genetinė diagnostika yra labai svarbus diagnostinis metodas, bet kiti laboratoriniai metodai taip pat svarbūs kasdieninėje diagnostikoje. Lietuvos VL pacientų tyrimų analizė parodė, kad jautriausias biocheminis tyrimas – vario koncentracijos šlapime tyrimas.

Kitos paveldimos metabolinės kepenų ligos HFE-hemochromatozės genetinių tyrimų rezultatai parodė, kad mutavusių alelių c.845G>A (p.Cys282Tyr) ir c.187C>G (p.His63Asp) dažniai nesiskyrė nuo kitų Rytų ir Centrinės Europos šalių nustatytų. Atlikus savanorių kraujo donorų genotipavimo rezultatų analizę pagal gyvenamąją vietą statistiškai patikimai buvo įrodyta, kad alelio c.845G>A (p.Cys282Tyr) dažnis buvo didesnis Žemaitijoje etnokultūriniame regione. Savanorių kraujo donorų genotipavimo rezultatai leido nustatyti ir asimptominės HFE – hemochromatozės dažnį bei apskaičiuoti galimų HFE–hemochromatozės ligonių skaičių.

IŠVADOS

1. Dažniausia Lietuvos VL pacientų mutacija yra c.3207C>A (p.His1069Gln), kuri yra būdinga Rytų ir Centrinės Europos šalims. Kitos *ATP7B* gene nustatytos mutacijos c.3472-82delGGTTTAACCAT, c.3121C>T, c.3402delC, c.2304dupC buvo retos.
2. Molekulinis genetinis metodas diagnozuojant Vilsoną ligą yra labai svarbus – 92,6 proc. ligonių nustatomos *ATP7B* geno mutacijos. Šis metodas leidžia patvirtinti ligos klinikinę diagnozę ir nustatyti asimptominės ligos formas. Kitiems klinikiniams-laboratoriniams tyrimams būdingas mažesnis jautrumas. Iš klinikinių-laboratorinių tyrimų Vilsono ligai nustatyti jautriausias buvo vario koncentracijos šlapime tyrimas, mažiau jautresni buvo ceruloplazmino koncentracijos kraujo serume tyrimas ir Kaizerio-Flaišerio žiedo ragenoje nustatymas.
3. Ištirus Lietuvos savanorius kraujo donorus buvo nustatyta, kad HFE–hemochromatozės geno c.845G>A (p.Cys282Tyr) ir c.187C>G (p.His63Asp) mutacijų dažnis yra panašus kaip ir kitose Rytų ir Centrinės Europos šalyse ir artimiausias Lenkijai.
4. Tarp Lietuvos savanorių kraujo donorų 1,3 proc. asmenų turi kliniškai išreikštos HFE-hemochromatozės išsivystymo riziką. Didesniu penetrantiškumu pasižymintis genotipas c.[845G>A]; [845G>A] p.[CysC282Tyr]; [CysC282Tyr] buvo nustatytas 0,1 proc., o mažesniu penetrantiškumu pasižymintis genotipas c.[845G>A];[187C>G] p.[CysC282Tyr]; [His63Asp] – 1,2 proc. tiriamųjų.
5. *HFE* geno c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutacijos dažnis statistiškai patikimai buvo didesnis Žemaitijoje negu kituose Lietuvos etnokultūrinuose regionuose.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Atliekant Vilsono ligos molekulinę diagnostiką Lietuvos pacientams tikslinga pirmiausia nustatyti c.3207C>A (p.His1069Gln) alelį ir nustatčius vieną arba neradus abiejų mutavusių c.3207C>A (p.His1069Gln) alelių tirti *ATP7B* geno 8, 14, 15, 16 ir 20 egzonus, kuriuose dažniausiai būna Lietuvos populiacijai būdingos *ATP7B* geno mutacijos. Dažniausios c.3207C>A (p.His1069Gln) mutacijos nustatymas buvo įdiegtas LSMU ligoninės „Kauno klinikos“ laboratorinės medicinos klinikoje.
2. HFE-hemochromatozės alelių c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp) ir c.193A>T (p.Ser65Cys) dažnis Lietuvoje yra nedidelis ir artimas Rytų ir Centrinės Europos šalims. Ikisimptominės HFE hemochromatozės dažnis Lietuvos populiacijoje yra 1,3 proc. todėl klinikinėje praktikoje įtariant šią ligą, turėtų būti atliekamas molekulinis genetinis tyrimas, kuris leistų patvirtinti diagnozę.
3. Genetiniai tyrimai klinikinėje praktikoje turėtų būti atliekami diferencinės diagnostikos tikslu ligoniams, kuriems įtariamas neišskios etiologijos kepenų ligos. Sergančių Vilsono ir HFE-hemochromatoze asmenų siblingams (broliams ir seserims) turėtų būti atliekami šių ligų genetiniai tyrimai, siekiant laiku nustatyti latentines ir asimptomines ligos formas ir pradėti jų gydymą.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, et al. Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study Research Investigators; Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 2005; 352:1769–78.
2. Agostinho M, Arruda V, Basseres D, Bordin S, Soares M, Menezes R, et al. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25:324–327.
3. Al Jumah M, Majumdar R, AlRajeh S, Awada A, Al Zaben A, Al Traif I, et al. Clinical and genetic study of 56 Saudi Wilson disease patients: identification of Saudi-specific mutations. *Eur J Neurol* 2004;11:121e4.
4. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet* 2007; 369(9559):397e408.
5. Andrikovics H, L. Kalmar, A. Bors, et al., Genotype screening for hereditary hemochromatosis among voluntary blood donors in Hungary. *Blood Cells Mol. Dis.* 27 (2001) 334–341.
6. Asberg A, Hveem K, Thorstensen K, Ellekiter E, Kannelonning K, Fjosne U, et al. Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1108–1115.
7. Bachmann H, Lossner J, Kuhn HJ, Siegemund. Occurrence, genetics and epidemiology of Wilson's disease in East Germany. In: Czlonkowska A, van der Hamer CJA (eds) *Proceedings of the 5th international symposium on Wilson's disease*. 1991; Technical University Delft, pp 121–128.
8. Bomford A, Williams R. Long-term results of venesection therapy in idiopathic haemochromatosis. *Q J Med* 1976;45:611–623.
9. Bassett ML, Doran TJ, Halliday JW, Bashir HV, Powell LW. Idiopathic hemochromatosis: demonstration of homozygous-heterozygous mating by HLA typing of families. *Hum Genet* 1982; 60:352–356.
10. Beckman LE, Sjoberg K, Eriksson S, Beckman L. Haemochromatosis gene mutations in Finns, Swedes and Swedish Saamis. *Hum Hered* 2001;52:110–112.
11. Bothwell TH, Cohen I, Abrahams OL, Perold SM. A familial study in idiopathic hemochromatosis. *Am J Med* 1959; 27:730–738.
12. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002;359:211–8.

13. Brewer GJ. Wilson's disease: a clinician's guide to recognition, diagnosis, and management. Kluwer Academic Publishers. 2001
14. 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.
15. Byrnes V, Ryan E, Barrett S, Kenny P, Mayne P, Crowe J. Genetic hemochromatosis, a Celtic disease: is it now time for population screening? *Genet Test* 2001;5:127–130.
16. Caca K. High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype–genotype analysis
17. Cardoso EM, Stal P, Hagen K, Cabeda JM, Esin S, de Sousa M, et al. HFE mutations in patients with hereditary haemochromatosis in Sweden. *J Intern Med* 1998;243:203–208.
18. Carla S Cardoso, Pedro Oliveira, Graca Porto. Comparative study of the two more frequent HFE mutations (C282Y and H63D): significant different allelic frequencies between the North and South of Portugal, E. *J. Human Genetics* 9 (2001) 843-848.
19. Cassanelli S, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, Mariano M, Campioli D, et al. Frequency and biochemical expression of C282Y/H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations in the healthy adult population in Italy. *J of Hepat* 2001; 34 (4): 523-528.
20. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A (1994) The history and geography of human genes, Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey
21. Cox DW, Roberts EA. Wilson Disease. In: M Feldman, B Scharschmidt, MH Sleisenger (eds) Sleisenger and Fordtrans Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management, 8 ed. Vol 3. WB Saunders, Philadelphia: 72, in press 2005.
22. Cumings, J.N. The copper and iron content of brain and liver in the normal and in hepato-lenticular degeneration. *Brain* 1948;71:410-415.
23. Cukjati M, Vaupotic T, Ruprecht R, Curin-Serbec V. Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high-throughput genotyping assay. *BMC Med Genet* 2007; 8:69-72.
24. Curtis D, Durkie M, Balac P, Sheard D, Goodeve A, Peake I, et al. A study of Wilson disease mutations in Britain. *Hum Mutat* 1999; 14:304-11.

25. Czlonkowska A, Rodo M, Gajda J, Ploosvan Amstel HK, Juyn J, Houwen RH. Very high frequency of the His1069Gln mutation in Polish Wilson disease patients. *J Neurol* 1997;244:591–592.
26. Dadone MM, KushnerJP, Edwards CQ, Bishop DT, Skolnick MH. Hereditary hemochromatosis. Analysis of laboratory expression of the disease by genotype in 18 pedigrees. *Am J Clin Pathol* 1982;78:196–207.
27. Distant S, Berg JP, Lande K, Haug E, Bell H. HFE gene mutation (C282Y) and phenotypic expression among a hospitalised population in a high prevalence of haemochromatosis. *Gut* 2000; 47:575–579.
28. Distant S, Berg JP, Lande K, Haug E, Bell H. High prevalence of the hemochromatosis-associated Cys282Tyr HFE gene mutation in a healthy Norwegian population in the city of Oslo, and its phenotypic expression. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34:529–534.
29. Danks DM. Disorders of copper transport. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., eds. *Metabolic basis of inherited diseases*, 1989 6th edn, Vol.1. New York: McGraw-Hill, pp.1411–1431.
30. Delatycki MB, Allen KJ, Nisselle AE, Collins V, Metcalfe S, du Sart D, et al. Use of community genetics screening to prevent HFE-associated hereditary haemochromatosis. *The Lancet* 2005;366:314–316.
31. Deguti MM, Genschel J, Cancado EL, Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, et al. Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat* 2004; 398:1e8.
32. Etninės kultūros valstybinės globos pagrindų įstatymas: http://www3.lrs.lt/pls/inter2/dokpaieska.showdoc_l?p_id=245935;
33. http://www3.lrs.lt/pls/inter/w5show?p_r=7039&p_d=28967&p_k=1
34. Finch SC, Finch CA. Idiopathic hemochromatosis, an iron storage disease. *A.Iron metabolism in hemochromatosis Medicine (Baltimore)* 1955, 34:381–430.
35. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. Final report of the proceedings of the working party at the 8th international meeting on Wilson disease and Menkes disease, Leipzig/Germany, 2001. *Liver Int* 2003;23:139–142.
36. Ferenci P, Merle U, FolhoVer A, Evstatiev R, Yurdaydin C, Bruha R et al (2005b) Phenotype–genotype correlations in Wilson Disease (WD)—results of a multinational study.
37. *Hepatology* 42(Suppl 1):258A
38. FerenciP. Wilson’s disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3(8) 726–33.

39. Folhoffer A, Ferenci P, Csak T, Horvath A, Hegedus D, Firneisz G, et al. Novel mutations of the ATP7B gene among 109 Hungarian Patients with Wilson's disease. *Wjgastroenterology* 2007;19(2):105-111.
40. Garcia-Villareal L, Daniels S, Shaw SH, Cotton D, Galvin M, Geskes J, et al. High prevalence of the very rare Wilson disease gene mutation Leu708Pro in the Island of Gran Canaria (Canary Islands, Spain): a genetic and clinical study. *Hepatology* 2000; 32:1329e36.
41. Goswami T, Nancy C, Andrews. Hereditary hemochromatosis protein HFE. Interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *The journal of biological chemistry* 2006; 28494-28498.
42. Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, Bochow B, Rodo M, Tarnacka B, 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(6):524-32.
43. 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;64:479e84.
44. Gurrin LC, Bertalli NA, Dalton GW, Osborne NJ, Constantine CC, McLaren CE and others. Healthron Study Investigators. HFE C282Y/H63D compound heterozygotes are at low risk of hemochromatosis – related morbidity. *Hepatology*. 2009; 50:94 – 101.
45. Hanson E, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2001;154:193–206.
46. Hoogenraad, T.U. Wilson's Disease. In: Warlow C.P, Van Gijn J., eds. *Major Problems in Neurology*. 1996 Vol.30. London: W.B.Saunders Company.
47. Houwen RH, Juyn J, Hoogenraad TU, Ploosvan Amstel JK, Berger R. H714Q mutation in Wilson disease is associated with late, neurological presentation. *J Med Genet* 1995;32:480–482.
48. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. , Andrews, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117, 285-297 (2004).
49. Ivanova-Smolenskaya IA, Ovchinnikov IV, Karabanov AV, Deineko NL, Poleshchuk VV, Markova ED, et al. The His1069Gln mutation in the ATP7B gene in Russian patients with Wilson disease. *J Med Genet* 1999; 36:174.

50. Jackson HA, Carter K, Darke C, Guttridge MG, Ravine D, Hutton RD, et al. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *Br J Haematol* 2001; 114(2):474-484.
51. Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T, Kaserer K, Hackl F, Polli C, et al. The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 116 1999; 127-134.
52. Kim EK, Yoo OJ, Song KY, Yoo HW, Choi SY, Cho SW, et al. Identification of three novel mutations and a high frequency of the Arg778Leu mutation in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat* 1998; 11 (4):275e8.
53. King AD, Walshe JM, Kendall BE, et al. Cranial MR imaging in Wilson's disease. *AJR Am J Roentgenol* 1996; 167: 1579-84.
54. Leggett BA, Halliday JW, Brown NN, Bryant S, Powell LW. Prevalence of haemochromatosis amongst asymptomatic Australians. *Br J Haematol* 1990;74:525-530.
55. Leone P, Giménez P, Collantes J, Paz-y-Miño C. Analysis of HFE gene mutations (C282Y, H63D, and S65C) in the Ecuadorian population. *Ann Hematol* 2005;84:103-105.
56. Liu XQ, Zhang YF, Liu TT, Hsiao KJ, Zhang JM, Gu XF, et al. Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. *World J Gastroenterol* 2004;10(4):590e3.
57. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Nurchi A, Sturniolo GC, et al. Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the Mediterranean population. *Hum Mutat* 1998;12:89 e94.
58. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Altuntas B, Giacchino R, et al. Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease: identification of 19 novel mutations. *J Med Genet* 1999; 36:833 e6.
59. Loudianos G, Kostic V, Solinas P, Lovicu M, Dessi V, Svetel M, Major T, Cao A (2003) Characterization of the molecular defect in the ATP7B gene in Wilson disease patients from Yugoslavia. *Genet Test* 7:107-112
60. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Figus AL, Lilliu F et al (1999b) Molecular characterization of Wilson disease in the Sardinian population—evidence of a founder effect. *Hum Mutat* 14:294-303
61. Lin A, Yan WH, Xu HH, Zhu M, Zhou Y. Analysis of the *HFE* gene (C282Y, H63D and S65C) mutations in a general Chinese Han population. *Tissue Antigens* 2007;70(3):252-5.
62. Macomber L, Imlay JA. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. 2009; 19;106(20):8344-9

63. Margarit E, Bach V, Gomez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, et al. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clin Genet* 2005;68:61e8.
64. Milman N, Pedersen P. Evidence that the Cys282Tyr mutation of the HFE gene originated from a population in Southern Scandinavia and spread with the Vikings. *Clin Genet* 2003;64:36
65. Milman N, Pedersen P, Ovesen L, Melsen GV, Fenger K. Frequency of the C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in 2501 ethnic Danes. *Ann Hem* 2004;83:654–657.
66. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997;34:275–278.
67. Merryweather-Clarke AT, Simonsen H, Shearman JD, Pointon JJ, Norgaard-Pedersen B, Robson KJ. A retrospective anonymous pilot study in screening newborns for HFE mutations in Scandinavian populations. *Hum Mutat* 1999;13:154–159.
68. Milne DB. Copper uptake and assessment of copper status. *Am J Clin Nutr* 1998;67:1041S–1045S.
69. Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B. Frequency of the hemochromatosis C282Y and H63D mutations in a Polish population of Slavic origin. *Med Sci Monit* 2001; 7(3):441–443.
70. Møller LB, Horn N, Jeppesen TD, Vissing J, Wibrand F, Jennum P, Ott P. Clinical presentation and mutations in Danish patients with Wilson disease. *European Journal of Human Genetics* (2011) 19, 935–941.
71. Milman N, Sorensen SA (1983) Idiopathic haemochromatosis. Was the ancestor a Danish Viking? *Ugeskr Laeger* 145:832–833
72. Nanji MS, Nguyen VT, Kawasoe JH, Inui K, Endo F, Nakajima T, et al. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease. *Am J Hum Genet* 1997;60 (6):1423e9.
73. Niederau C, Fischer R, Purschel A, et al.: Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1996, 110:1107–1119.
74. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, et al.: Survival and causes of death in cirrhotic and in non cirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985, 313:1256–1262.
75. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 2009; 122: 78–86.

76. Okada T, Shiono Y, Hayashi H, Satoh H, Sawada T, Suzuki A, et al. Mutational analysis of ATP7B and genotype – phenotype correlation in Japanese with Wilson’s disease. *Hum Mutat* 2000; 15 (5):454e62.
77. Olynyk JK, Hagan SE, Cullen DJ, Beilby J, Whittall DE. Evolution of untreated hereditary hemochromatosis in the Busselton population: a 17-year study. *Mayo Clin Proc.* 2004;79:309–13
78. Olivarez L, Caggana M, Pass KA, Ferguson P, Brewer GJ. Estimate of the frequency of Wilson’s disease in the US Caucasian population: a mutation analysis approach. *Ann Hum Genet* 2001;65:459-463.
79. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han HBS, 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.
80. Olsson C, Waldenstrom E, Westermark K, Landegre U, Syvanen AC: Determination of the frequencies of ten allelic variants of the Wilson disease gene (ATP7B), in pooled DNA samples. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 933–938.
81. Olsson KS, Ritter B () Idiopatisk hemokromatose. *Tidsskrift for Den Norske Laegeforen* 1981;29:101
82. Olsson KS, Ritter B, Chowdhury RR. HLA-A3-B14 and the origin of the haemochromatosis C282Y mutation: founder effects and recombination events during 12 generations in a Scandinavian family with major iron overload. *European Journal of Haematology* 84 (145–153)
83. Papazoglu D, Exiara T, Speletas M , Panagopoulos I, Maltezos E. Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greece. *Acta Haematol* 109 2003;137–140.
84. Papanikolaou G, Politou M, Terpos E, Fourlemadis S, Sakellarioupolos N, Loukopoulos D. Hereditary hemochromatosis: HFE mutation analysis in Greeks reveals genetic heterogeneity, *Blood Cells Mol. Dis.* 2000; 26: 163–168.
85. Panagiotakaki E, Tzetis M, Manolaki N, Loudianos G, Papatheodorou A, Manesis E, et al. Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *Am J Med Genet A* 2004;131(2):168e73.
86. Parlist P, Mikelsaar AV, Tasa G, Beckman L. The frequency of C282Y and H63D mutations in hemochromatosis gene in native Estonians. *European Journal of Epidemiology* 2001;17:213-216.
87. Panagiotakaki E, Tzetis M, Manolaki N, Loudianos G, Papatheodorou A, Manesis E et al Genotype–phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *Am J Med Genet* 2004; 131:168–173.

88. Potetchina E et al. Unique genetic profile of hereditary hemochromatosis in Russians: High frequency of C282Y mutation in population, but not in patients. 2005.
89. Raddatz D, Legler T, Lynen R, Addicks N, Ramadori G. HFE genotype and parameters of iron metabolism in German firsttime blood donors - evidence for an increased transferrin saturation in C282Y heterozygotes. *Z Gastroenterol* 2003; 41:1069-1076.
90. Reilly M, Daly L, Hutchinson M. An epidemiological study of Wilson's disease in the Republic of Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1993;56:298-300.
91. Ropero P, Briceño O, Mateo M, Polo M, Mora A, González F, et al. Frequency of the C282Y and H63D mutations of the haemochromatosis gene (HFE) in a cohort of 1,000 neonates in Madrid (Spain). *Ann Hematol* 2006;85:323-326.
92. Raszeja-Wyszomirska, G. Kurzawski, J. Suchy, Zavada I, Lubinski J, Milkiewicz P. Frequency of mutations related to hereditary haemochromatosis in northwestern Poland. *J. Appl. Genet.* 2008;49:105-107.
93. Scheinberg I.H and Scheinberg I. Wilson's disease. In: Smith L.H. Jr, ed. *Major Problems in Internal Medicine.* 1984 Vol.23. Philadelphia: W.B.Saunders Company.
94. Sallie R, Katsiyiannakis L, Baldwin D, Davies S, O'Grady J, Mowat A, Mieli-Vergani G, Williams R. Failure of simple biochemical indexes to reliably differentiate fulminant Wilson's disease from other causes of fulminant liver failure. *Hepatology* 1992;16:1206-11.
95. Sheldon JH. *Hemochromatosis.* London: Oxford University Press; 1935.
96. Simon M, Bourel M, Genetet B, Fauchet R. Idiopathic hemochromatosis. Demonstration of recessive transmission and early detection by family HLA typing. *N Engl J Med* 1977; 297:1017-1021.
97. Simon M, Alexandre JL, Fauchet R, Genetet, M.Bourel. The genetics of hemochromatosis *Prog.Med.Genet.* 1980; 4:135-168.
98. Simon M, Alexandre A, Fauchet R, Genetet B, Bourel M. The genetics of hemochromatosis. In: Steinberg AG, Bearn AG, Motulsky AG, Childs B (eds) *Progress in medical genetics.* 1980 Saunders, Philadelphia, pp 135-168
99. Simon M, Pawlotsky Y, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Hémochromatose idopathique. Maladie associée à l'antigène tissulaire HL-A3? *Nouvelle Presse Med* 1975;4:1432
100. Sinha S, Taly AB, Ravishankar S, et al. Wilson's disease: cranial MRI observations and clinical correlation. *Neuroradiology* 2006; 48:613-21.

101. Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, et al. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet* 1997;61(2):317e28.
102. Svetel M, Kozic D, Stefanova E, Semnic R, Dragasevic N, Kostic VS. Dystonia in Wilson's disease. *Mov Disord* 2001; 16:719-23.
103. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993;5:344-50.
104. 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.
105. Todorov T, Savov A, Jelev H, Panteleeva E, Konstantinova D, Krustev Z, et al. Spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B) in the Bulgarian population. *Clin Genet* 2005; 68:474 e6.
106. 77 Polymorphism of the HFE Gene associated with hereditary hemochromatosis in populations of Russia. *Russian Journal of Genetics*, vol.39.No.7, 2003, pp.828-835.
107. Undlien DE, Bell H, Heier HE, Akselsen HE, Thorsby E. Genetic diagnostic test for hemochromatosis. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1998;118:238-240.
108. Vizzi E, Loureiro C, Gerder M, Garcia-Casal M, Rodríguez-Larralde A, Gerace L et al. Mutation analysis of the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis in a Venezuelan sample. *Ann Hematol* 2005;84:802-806.
109. 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.
110. Waldenstrom E, Lagerkvist A, Dahlman T, Westermarck K, Landegren U. Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing. *Genomics* 1996;37:303-309.
111. Weiss G. Genetic mechanisms and modifying factors in hereditary hemochromatosis. *Nat rev gastroenterol. Hepatol.* 2010;7:50-58.
112. Wilson's disease. In: Bacon B, O'Grady JG, DiBisceglie A, Lake JR (eds) *Comprehensive clinical hepatology*, chap 24. Elsevier, Mosby, pp 351-367
113. Wilson DC, Phillips MJ, Cox DW, Roberts EA. Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children. *J Pediatr* 2000;137:719-22.
114. Wilson SA. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912;34 (1): 295-507.

115. Worwood M. Genetics of haemochromatosis. *Baillieres Clin Haematol* 1994;7:903–18.
116. 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;58:971–6.
117. Wu Z, Wang N, Murong S, LinM. Identification and analysis of mutations of the Wilson disease gene in Chinese population. *Chin Med J (Engl)* 2000; 113:40e3.

PRIEDAI

0–1	–	Vilsono ligos tikimybė maža
1–4	–	galima Vilsono liga
4 ir daugiau	–	Vilsono liga

1 lentelė. Vilsono ligos kriterijai (2001m. 8 tarptautinė Vilsono ir Menkės ligos konferencija Leipcigas)

Simptomai	Balai
K-F žiedas	
nėra	1
yra	2
Neuropsichiatriniai simptomai (ar pakitimai nustatomi BMR tyrimo metu)	0
Yra	2
Nėra	0
Serumo ceruloplazmino koncentracija	
Normali >0.2 g/l	0
0,1-0,2 g/l	1
<0,1g/l	2
Vario koncentracija paros šlapime	
Normali	0
1-2k. didesnė negu norma	1
>2k. didesnė negu norma	2
normalus, bet ↑>5k virš normos po gydymo D penicilaminu 2x0,5 g	2
Cu kepenyse (nesant cholestazės ar hepatito)	
normalus <50µg/g	0
50-250 µg/g	1
>250 µg/g	2
Dažymasis rodaminu (negalint matuoti Cu kepenyse)	
nėra	0
yra	1
Mutacijos	
Nustatytos abi mutacijos	4
Nustatyta viena mutacija	1
nėra ar neatlikta	0
Hemolitinė anemija (Kumbso reakcija neigiama)	
Yra	1
Nėra	0

2 lentelė. ATP7B geno pradmenų sekos

Pradmuo	Egzonas
ATP7B exon 1 fov 5'TTCCCGGACCCCTGTTTGCT3' ATP7B exon 1 rev 5'AATCCTCCTGGTGGGAGTGAGCAC3'	1
ATP7B exon 2 fov 5'AGAAGCTGGGATGTTGTAGAAAATATTAGG3' ATP7B exon 2 rev 5'-CCTATACCAACCATCCAGGAG-3'	2
ATP7B exon 3 fov 5'-GCCCTGAAACCTCTTGTTCTG-3' ATP7B exon 3 rev 5'-CTACTGATAAACACAGTTGCTGGG	3
ATP7B exon 4 fov 5'-CTTTGTTTCGGTTATATTGACTGTGTC-3' ATP7B exon 4 rev 5'-CCGTTACGCACCCACAGTA-3'	4
ATP7B exon 5 fov 5'-TTCCATGGGAAAAGTTGAAGAATT-3' ATP7B exon 5 rev 5'-AGACTCCCTGGACTGGCTTT-3'	5
ATP7B exon 6 fov 5'-AGAGTTGGGCCCAGGTAGAG-3' ATP7B exon 6 rev 5'-AGAGTTGGGCCCAGGTAGAG-	6
ATP7B exon 7 fov 5'-AGGGGAGTGGCTTGTAATCC-3' ATP7B exon 7 rev 5'-CTTAGCGGGCAGAATATCTGAC-3'	7
ATP7B exon 8 fov 5'-CGCTCATTGAACTCTCCTCC-3' ATP7B exon 8 rev 5'-AACATGGTGTTTCAGAGGAAGTGAG-3'	8
ATP7B exon 9 fov 5'-CAGCTGTCTCTAACACCACGC-3' ATP7B exon 9 rev 5'-AAACCACATGGGCATCTGAT-3'	9
ATP7B exon 10 fov CTATTGTAACAGCTGGCCTAGAACC-3' ATP7B exon 10 rev 5'-CTGTCACTTGCTCAGCCCC-3'	10

2 lentelės tęsinys

Pradmuo	Egzonas
<i>ATP7B</i> exon 11 fov GCTGTCAGGTCACATGAGTGC-3' <i>ATP7B</i> exon 11 rev 5'-CTGATTTC CC CAGA ACT CTTCACAT-3'	11
<i>ATP7B</i> exon 12 fov TTCTTCATAGGTTGTAATTTCCCATG-3' <i>ATP7B</i> exon 12 rev 5'-GGATCAATGTCAGTAGATTATTTAAAACAC	12
<i>ATP7B</i> exon 13 fov 5'-CCCTGAAATGTCCTTATCTGATTAG-3' <i>ATP7B</i> exon 13 rev 5'-TCTCAAGGCmiCTCTCAATGTG	13
<i>ATP7B</i> exon 14 fov 5'-CAGCTAGGAGAGAAGGACATGG-3' <i>ATP7B</i> exon 14 rev 5'-AGTTCTGCCTCAGGAGTGTGAC-3'	14
<i>ATP7B</i> exon 15 fov 5'-TCTTGGCTTACAGTTTCCTCTTCC-3' <i>ATP7B</i> exon 15 rev 5'-TCTGTGGTTTGACCCACCTC-3'	15
<i>ATP7B</i> exon 16 fov GACTCTTTTGCCTGATATCTGCA-3' <i>ATP7B</i> exon 16 rev 5'-TGCTGTATAAAGGATTGCATGGT-3'	16
<i>ATP7B</i> exon 17 fov CATTGCAAGTGTGGTATCTTGGT-3' <i>ATP7B</i> exon 17 rev 5'-TACAGCTCAGTGCTGGGCC-3'	17
<i>ATP7B</i> exon 18 fov CAAGGGTAACTTGAGGTTTCTGC-3' <i>ATP7B</i> exon 18 rev 5'-TCATTCTGATGGAGAGGAGCAC-3'	18
<i>ATP7B</i> exon 19 fov TGGGCAGACCCCTTCCTCAC-3' <i>ATP7B</i> exon 19 rev 5'-AAGCCTTTCTGGGCGCAGCT-3'	19
<i>ATP7B</i> exon 20 fov 5'-GACCTAGGTGTGAGTGCGAGTT-3' <i>ATP7B</i> exon 20 rev 5'-GTTTAGCCAGGGCTTCTGAGG-3	20
<i>ATP7B</i> exon 21 fov GGATGAGAGGCCTTCACCAG-3' <i>ATP7B</i> exon 20 rev 5'-CTCTCCAGGTCAGGCTTCTTAT-3	21

MOKSLINIAI STRAIPSNIAI

Leidiniuose, referuojamuose Mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje „ISI Web of Science“ ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. Kučinskas L, Juzenas S, Sventoraityte J, Cedaviciute R, Vitkauskiene A, Kalibatas V, Kondrackiene J, Kupcinskas L. Prevalence of C282Y, H63D, and S65C mutations in hereditary HFE-hemochromatosis gene in Lithuanian population // *Annals of hematology*, Berlin: Springer (Original article). ISSN 0939-5555.2012, vol.91, no.4, p.491-495 (Citav. rod. 2,688 (2010)).
2. Kučinskas L, Jeroch J, Vitkauskiene A, Sakalauskas R, Petrenkiene V, Kucinskas V, Naginiene R, Schmidt H, Kupcinskas L. High frequency of the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation in ATP7B gene of Lithuanian patients with hepatic presentation of Wilson's disease//*World journal of gastroenterology*. Beijing. China: WJG press (Rapid communication) ISSN 1007-9327. 2008, vol.14, iss.38, p.5876-5879 (Citav. rod. 2,081)

Kitos publikacijos

1. Kupčinskas, Limas; Schmidt, Hartmut; Kučinskas, Laimutis. Clinical and genetic characteristics of Lithuanian patients with hepatic presentation of Wilson's disease /L.Kupcinskas, H.Schmidt, L.Kucinskas //5.Kongres Hrvatskog gastroenterološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem=5th Congress of the Croatian Society of Gastroenterology with international participation: Knjiga sažetaka=Abstract book: Dubrovnik, Hrvatska/Croatia, 3.-5. Travnja 2009/April 3th – 5th 2009/Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi i Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske/Ministry of Health and Social Service and Ministry of Science, Education and Sports. Dubrovnik: Croatian Society of Gastroenterology/Hrvatsko Gastroenterologiško Društvo. (O Oralne prezentacije/Oral presentations).p.26.no.04-4.
2. Kupčinskas, Limas; Kučinskas, Laimutis; Jeroch, Jolanta; Vitkauskienė, Astra; Schmidt, Hartmut; Very high frequency of the p.H1069Q mutation in ATP7B gene of Lithuanian patients with hepatic presentation of Wilson's disease/L.Kupcinskas, L.Kucinskas, J.Jeroch, A.Vitkauskiene, H.Schmidt//*Hepatology International: 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver: 13th-16th February 2009: Hong Kong Convention&Exhibition Centre, Hong Kong, China Asia* ISSN 1936-0533.2009, vol.3, p.214, abstr.no.PE527.

RAPID COMMUNICATION

High frequency of the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation in *ATP7B* gene of Lithuanian patients with hepatic presentation of Wilson's disease

Laimutis Kucinskas, Jolanta Jeroch, Astra Vitkauskienė, Raimundas Sakalauskas, Vitalija Petrenkienė, Vaidutis Kucinskas, Rima Naginiene, Hartmut Schmidt, Limas Kupcinskas

Laimutis Kucinskas, Institute of Biology of Kaunas University of Medicine, Mickėvičiaus 9, Kaunas LT-44307, Lithuania
Jolanta Jeroch, Rima Naginiene, Institute of Biomedical Research of Kaunas University of Medicine, Eiveniu 4, Kaunas LT-50009, Lithuania

Astra Vitkauskienė, Laboratory of Immunology and Genetics, Kaunas University of Medicine, Eiveniu 2, Kaunas LT-50009, Lithuania

Raimundas Sakalauskas, Department of Pulmonology and Immunology, Kaunas University of Medicine, Eiveniu 2, Kaunas LT-50009, Lithuania

Vitalija Petrenkienė, Limas Kupcinskas, Department of Gastroenterology, Kaunas University of Medicine, Eiveniu 2, Kaunas LT-50009, Lithuania

Vaidutis Kucinskas, Department of Human and Medical Genetics, Faculty of Medicine, Vilnius University, Santariskiu 2, Vilnius LT-08661, Lithuania

Hartmut Schmidt, Department of Hepatotransplantation, University of Munster, Schlossplatz 2, Munster D-48149, Germany

Author contributions: Kucinskas L and Kupcinskas L contributed equally to this work; Kucinskas L designed research/performed research/wrote paper; Jeroch J wrote paper; Vitkauskienė A wrote paper/contributed new reagents/analytic tools; Sakalauskas R designed research; Petrenkienė V analysed data; Kucinskas V designed research; Naginiene R performed research; Kupcinskas L designed research/wrote paper; Schmidt H performed research/wrote paper.

Supported by The National Science and Education Foundation of Lithuania, No. M-06005

Correspondence to: Dr. Limas Kupcinskas, PhD, Professor, Department of Gastroenterology, Kaunas University of Medicine, Eiveniu 2, Kaunas LT-50009, Lithuania. likup@takas.lt

Telephone: +370-68-640575 Fax: +370-37-3361458

Received: May 30, 2008 Revised: July 19, 2008

Accepted: July 26, 2008

Published online: October 14, 2008

whole venous blood using a salt precipitation method. Firstly, the semi-nested polymerase chain reaction (PCR) technique was used to detect the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation. Patients not homozygous for the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation were further analyzed. The 21 exons of the WD gene were amplified in a thermal cycler (Biometra T3 Thermocycler, Göttingen, Germany). Direct sequencing of the amplified PCR products was performed by cycle sequencing using fluorescent dye terminators in an automatic sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

RESULTS: Total of 13 WD patients (mean age 26.4 years; range 17-40; male/female 3/10) presented with hepatic disorders and 16 their first degree relatives (including 12 siblings) were studied. Some of WD patients, in addition to hepatic symptoms, have had extrahepatic disorders (hemolytic anemia 3; Fanconi syndrome 1; neuropsychiatric and behavioural disorder 2). Liver biopsy specimens were available in all of 13 WD patients (8 had cirrhosis; 1-chronic hepatitis; 3-acute liver failure, 1-liver steatosis). Twelve of 13 (92.3%) WD patients had the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation, 6 of them in both chromosomes, 6 were presented as compound heterozygotes with additional c.3472-82delGGTTTAACCAT, c.3402delC, c.3121C>T (p.R1041W) or unknown mutations. For one patient with liver cirrhosis and psychiatric disorder (Leipzig score 6), no mutations were found. Out of 16 first degree WD relatives, 11 (68.7%) were heterozygous for the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation. Two patients with fulminant WD died from acute liver failure and 11 are in full remission under penicillamine or zinc acetate treatment. Three women with WD successfully delivered healthy babies.

CONCLUSION: The c.3207C>A (p.H1069Q) missense mutation is the most characteristic mutation for Lithuanian patients with WD. Even 92.3% of WD patients with hepatic presentation of the disease are homozygous or compound heterozygotes for the p.H1069Q mutation.

© 2008 The WJG Press. All rights reserved.

Key words: Wilson disease; *ATP7B* gene; c.3207C>A (p.H1069Q) mutation; Cirrhosis; Urine copper; Copper in liver biopsies

Abstract

AIM: To investigate the prevalence of the *ATP7B* gene mutation in patients with hepatic presentation of Wilson's disease (WD) in Lithuania.

METHODS: Eleven unrelated Lithuanian families, including 13 WD patients were tested. Clinically WD diagnosis was established in accordance to the Leipzig scoring system. Genomic DNA was extracted from

Peer reviewer: Peter Laszlo Lakatos, Professor, 1st Department of Medicine, Semmelweis University, Budapest H1083, Hungary

Kucinskas L, Jeroch J, Vitkauskienė A, Sakalauskas R, Petrenkienė V, Kucinskas V, Naginiene R, Schmidt H, Kupcinskas L. High frequency of the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation in *ATP7B* gene of Lithuanian patients with hepatic presentation of Wilson's disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14(38): 5876-5879 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/5876.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.5876>

INTRODUCTION

Wilson's disease (WD) is a rare autosomal recessive disorder of copper metabolism with prevalence of 1/30 000 and a carrier frequency of 1/90^[1,2]. The prevalence is as high as one in 10 000 in China, Japan, and Sardinia^[3,4]. The disease is characterized by hepatic, neurological or psychiatric disturbances and decreasing biliary copper excretion with consequent copper accumulation in the liver and extrahepatic tissue^[5]. The gene currently known to be associated with WD is the *ATP7B* gene, which was identified in 1993^[6,7]. The *ATP7B* gene has 21 exons and encodes a copper-transporting *P*-type adenosine triphosphatase. A copper-transporting *P*-type ATPase incorporates copper into the serum ferroxidase, ceruloplasmin, and excretes by biliary tree. More than 360 mutations in the *ATP7B* gene have been identified as summarised in the human gene mutation database of the institute of medical genetics in Cardiff (accession date May 2008; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=ATP7B>). *ATP7B* gene mutations are rare and the majority of patients are compound heterozygotes. Consequently, identification of mutations in WD patients often requires sequencing of a significant proportion of the *ATP7B* gene. It is important to know regional distribution of mutations of the *ATP7B* gene to design appropriate diagnostic strategies for the disease^[8]. As no data exist about WD genetic characteristics in the Lithuanian population, the purpose of the current study was to carry out a mutation analysis of Lithuanian WD patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Lithuanian cohort, drawn from 11 unrelated families, consisted of 29 individuals and was comprised of 13 WD patients (mean age at onset of symptoms 26.4 years; range 17-40; male/female 3/10) and 16 of their first degree relatives. Patients were admitted at the Department of Gastroenterology, Hospital of Kaunas University of Medicine, Lithuania. The diagnosis of WD was established using the scoring system developed at the 8th International Meeting on WD, Leipzig/Germany, 2001. The diagnosis was accepted if the WD Leipzig score was ≥ 4 ^[9].

ATP7B gene mutation analysis

Genomic DNA was extracted from whole venous blood using a salt precipitation method^[10]. Firstly, rapid, semi-nested PCR technique was used to detect the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation as described previously^[11]. Patients not homozygous for c.3207C>A (p.H1069Q) mutation were further analyzed. The 21 exons of the WD gene were amplified in a thermal cycler (Biometra T3 Thermocycler, Göttingen, Germany) as described elsewhere^[12]. Direct sequencing of the amplified polymerase chain reaction (PCR) products was performed by cycle sequencing using fluorescent dye terminators in an automatic sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Mutations were quoted according to the guidelines from <http://www.HGVS.org/mutnomen/>, using the reference sequence with the GenBank accession number NM_00053.1.

RESULTS

Total of 13 WD patients presented with hepatic disorders and 16 their first degree relatives (including 12 siblings) were studied. All WD patients and their relatives were consulted in Department of Gastroenterology of Kaunas University of Medicine during 1999-2008. WD patient's clinical, laboratory data, and mutation type are summarized in Table 1.

Some of WD patients, in addition to hepatic symptoms, have had extrahepatic disorders (hemolytic anemia 3; Fanconi syndrome 1; neuropsychiatric and behavioural disorder 2). Specimens of liver biopsy (either percutaneous or transjugular) were available in all of 13 WD patients (8 case of cirrhosis; chronic hepatitis-1; fulminant hepatitis-3; steatosis-1). Kayser-Fleischer ring was present in 6 out of 13 patients (46%). Hepatic copper content was measured in 7 WD patients and was above 250 $\mu\text{g/g}$ dry weight in 4 cases.

Twelve of 13 (92.3%) WD patients had the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation, 6 of them in both chromosomes, and 6 were presented as compound heterozygotes with additional c.3472-82delGGTTTAACCAT, c.3402delC, c.3121C>T (p.R1041W) or unknown mutation. For 1 patient with liver cirrhosis only mutation (p.H1069Q) in one allele was revealed, and for another patient with cirrhosis and psychiatric disorder, (Leipzig score 6) no mutations were found (Table 1). Out of 16 first degree WD relatives, 11 (68.7%) were heterozygous for the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation. Two patients with fulminant WD died from acute liver failure (ALF), and 11 are in full remission under penicillamine or zinc acetate treatment. Three women with WD successfully delivered healthy baby.

DISCUSSION

WD might be a potentially life threatening disorder; however, with early diagnosis and consequent treatment the prognosis of WD is excellent and usually the need for liver transplantation can be prevented^[13]. None of

Table 1 Clinical and genetic characteristics of Lithuanian WD patients

Patient	Gender	Age (yr)	Clinical presentation at disease diagnosis	Kayser-Fleischer ring	Ceruloplasmin lower than 0.2 g/L	Urine cooper (μg/24 h)	Cooper in liver biopsy (μg/g)	Mutation	Outcome
1	F	27	Cirrhosis	Yes	Yes	120	264	[p.His1069Gln] + [p.His1069Gln]	Alive
2	F	18	ALF	No	Yes	144	ND	[p.His1069Gln] + [p.His1069Gln]	Alive
3	M	35	Cirrhosis	Yes	Yes	84	ND	[p.His1069Gln] + [p.His1069Gln]	Alive
4	F	34	ALF, HA	No	No	280	536	[p.His1069Gln] + [p.Arg1041Trp]	Death
5	F	26	Asymptomatic CH	No	Yes	38	35	[p.His1069Gln] + [p.Arg1041Trp]	Alive
6	F	19	ALF, HA	No	No	324	326	[p.His1069Gln] + [c.3472-82 del-GGTTAAACCAT]	Death
7	F	17	Cirrhosis	No	Yes	120	126	[p.His1069Gln] + [c.3472-82 del-GGTTAAACCAT]	Alive
8	F	18	Cirrhosis, FS, HA	No	Yes	182	258	[p.His1069Gln] + [c.3402delC]	Alive
9	M	24	Cirrhosis, NPD	Yes	Yes	116	188	NK/NK	Alive
10	F	23	Cirrhosis	Yes	Yes	130	ND	[p.His1069Gln] + [p.His1069Gln]	Alive
11	F	27	Cirrhosis	Yes	Yes	145	ND	[p.His1069Gln] + [p.His1069Gln]	Alive
12	M	40	Liver steatosis, NPD	Yes	Yes	350	ND	[p.His1069Gln] + [p.His1069Gln]	Alive
13	F	36	Cirrhosis	No	Yes	126	ND	[p.His1069Gln] + NK	Alive

Mutational analysis was performed only for presence of p.H1069Q. 4th and 5th patients were siblings; 6th and 7th patients were siblings. ALF: Acute liver failure; CH: Chronic hepatitis; HA: Hemolytic anaemia (Coombs-negative); FS: Fanconi syndrome; NPD: Neuropsychiatric disorder; ND: Not determined; NK: Not known.

the commonly used parameters alone allows a certain diagnosis of WD^[14]. In our study, only in 6 (46%) of our patients was Kayser-Fleischer ring present and serum ceruloplasmin levels were even higher than 0.3 g/L in 2 patients with ALF. Urine cooper excretion exceeded 100 μg/24 h in 11 (84.6%) of 13 patients and in one asymptomatic sibling with WD it was even lower than 40 μg/24 h. Therefore, urinary cooper excretion and hepatic copper concentration, because of potential errors in evaluation, should always be assessed in the context of other diagnostic criteria^[9,15].

WD is found worldwide with different geographical distribution of *ATP7B* gene mutations. The c.3207C>A (p.His1069Gln) missense mutation is the most frequent in Northern, Eastern and Central Europe^[2,8,16], the c.3400delC mutation is the most common in Brazil^[17], and c.2333G>T (p.Arg778Leu) in Asia countries^[18-21].

Knowledge of the regional distribution of mutations in the WD gene is important to design appropriate screening strategies^[8]. In Central and Eastern Europe, the frequency of the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation in exon 14 previously has been reported as the highest in Poland and Eastern Germany and decreases in Western and Southern European countries^[8,22]. In Poland 72% of WD patients carry at least one allele with the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation^[23]. Caca *et al*^[23] revealed that in East Germany 39% of WD patients were homozygous and 48% heterozygous for the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation. Our study was the first to analyze genetic mutations of WD patients in Lithuania, a country in Baltic Sea area with 3.4 million inhabitants. The prevalence of the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation in the *ATP7B* gene in WD patients in Lithuania was 92.3% (with 46.2% homozygotes and 46.2% compound heterozygotes). These findings were even higher than in Poland, a neighbour state, and were considerable higher

than in Russia (49%) or Sweden (38%)^[24]. In compound heterozygotes Lithuanian WD patients additional c.3472-82delGGTTAAACCAT, c.3402delC, and never mentioned new c.3121C>T (p.R1041W) mutations were detected. Only patients with hepatic or hepatic-neuropsychiatric presentation of WD were included in our study; however, other authors^[25] have shown that the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation is also associated with a late and neurological presentation of the disease.

In conclusion, the results of our study showed that the c.3207C>A (p.H1069Q) missense mutation is characteristic for Lithuania patients of WD. Even 92.3% of WD patients with hepatic presentation of the disease are homozygous or compound heterozygote for this mutation. Therefore, limited genetic testing of c.3207C>A (p.H1069Q) mutation might be of high value both to confirm WD disease diagnosis and for familial genetic screening in Lithuanian population.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the head Dr. Olegas Abdrachmanovas and all personnel of the Laboratory for Environmental Health Research of the Institute for Biomedical Research for the copper analysis and Birute Sabaniene from Laboratory of Immunology and Genetics of Kaunas University of Medicine for excellent technical support.

COMMENTS

Background

Wilson disease (WD) is a life threatening autosomal recessive genetic disorder with impaired cooper metabolism and associated with hepatic, neurological and psychiatric symptoms. The diagnosis of WD is usually established using clinical signs and biochemical (hepatic copper concentration, ceruloplasmin concentration, copper urine excretion) tests; however, the most sensitive and

specific test is the detection of *ATP7B* gene mutations. The genetic testing is becoming the most important for confirmation of diagnosis and presymptomatic diagnostics in WD patients.

Research frontiers

The research was done to obtain data about the frequency and type of *ATP7B* gene mutations in WD patients in Lithuania.

Innovations and breakthroughs

It is important to know regional distribution of mutations of the *ATP7B* gene to design appropriate diagnostic strategies of WD. We have found an extremely high percentage of Lithuanian WD patients having the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation. This is a new and interesting finding, showing that this mutation is typical for Lithuanian WD patients, similar as was reported in some other Middle-Eastern European countries.

Applications

The present study indicates that due to high frequency of the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation in Lithuania, even limited genetic testing of this mutation might be of high value both to confirm WD diagnosis and for familial genetic screening in Lithuanian population.

Terminology

ATP7B encodes a Cu-transporting P-type ATPase protein common to P-type ATPases. p.H1069Q missense mutations causes an amino acid substitution and disrupts ATP binding.

Peer review

This short report investigates the frequency and type of *ATP7B* gene mutations in Lithuanian patients with WD. The detected frequency (92.3%) of the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation is one of the highest reported from Middle-Eastern European countries. This study is interesting.

REFERENCES

- Scheinberg IH, Sternlieb I. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *Am J Clin Nutr* 1996; **63**: 842S-845S
- Caca K, Ferenci P, Kuhn HJ, Polli C, Willgerodt H, Kunath B, Hermann W, Mossner J, Berr F. High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. *J Hepatol* 2001; **35**: 575-581
- Saito T. An assessment of efficiency in potential screening for Wilson's disease. *J Epidemiol Community Health* 1981; **35**: 274-280
- Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Nurchi A, Sturniolo GC, Marcellini M, Zancan L, Bragetti P, Akar N, Yagci R, Vegnente A, Cao A, Pirastu M. Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the Mediterranean population. *Hum Mutat* 1998; **12**: 89-94
- Ala A, Schilsky ML. Wilson disease: pathophysiology, diagnosis, treatment, and screening. *Clin Liver Dis* 2004; **8**: 787-805, viii
- 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**: 327-337
- Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993; **5**: 344-350
- Ferenci P. Regional distribution of mutations of the *ATP7B* gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet* 2006; **120**: 151-159
- Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, Schilsky M, Cox D, Berr F. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int* 2003; **23**: 139-142
- Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 1991; **11**: 298-300, 302
- Maier-Dobersberger T, Ferenci P, Polli C, Balac P, Dienes HP, Kaserer K, Datz C, Vogel W, Gangl A. Detection of the His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction. *Ann Intern Med* 1997; **127**: 21-26
- Waldenström E, Lagerkvist A, Dahlman T, Westermarck K, Landegren U. Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing. *Genomics* 1996; **37**: 303-309
- Gunther P, Hermann W, Kuhn HJ, Wagner A. [Wilson's disease] *Ther Umsch* 2007; **64**: 57-61
- Ferenci P, Czlonkowska A, Merle U, Ferenc S, Gromadzka G, Yurdaydin C, Vogel W, Bruha R, Schmidt HT, Stremmel W. Late-onset Wilson's disease. *Gastroenterology* 2007; **132**: 1294-1298
- Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology* 2008; **47**: 2089-2111
- Firneisz G, Lakatos PL, Szalay F, Polli C, Glant TT, Ferenci P. Common mutations of *ATP7B* in Wilson disease patients from Hungary. *Am J Med Genet* 2002; **108**: 23-28
- Deguti MM, Genschel J, Cancado EL, Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, Porta G, Lochs H, Carrilho FJ, Schmidt HH. Wilson disease: novel mutations in the *ATP7B* gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat* 2004; **23**: 398
- Nanji MS, Nguyen VT, Kawasoe JH, Inui K, Endo F, Nakajima T, Anezaki T, Cox DW. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 1423-1429
- Okada T, Shiono Y, Hayashi H, Satoh H, Sawada T, Suzuki A, Takeda Y, Yano M, Michitaka K, Onji M, Mabuchi H. Mutational analysis of *ATP7B* and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson's disease. *Hum Mutat* 2000; **15**: 454-462
- Ye S, Gong L, Shui QX, Zhou LF. Wilson disease: identification of two novel mutations and clinical correlation in Eastern Chinese patients. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 5147-5150
- Liu XQ, Zhang YF, Liu TT, Hsiao KJ, Zhang JM, Gu XF, Bao KR, Yu LH, Wang MX. Correlation of *ATP7B* genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 590-593
- Folhoffer A, Ferenci P, Csak T, Horvath A, Hegedus D, Firneisz G, Osztoivits J, Kosa JP, Willheim-Polli C, Szonyi L, Abonyi M, Lakatos PL, Szalay F. Novel mutations of the *ATP7B* gene among 109 Hungarian patients with Wilson's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; **19**: 105-111
- Tarnacka B, Gromadzka G, Rodo M, Mierzejewski P, Czlonkowska A. Frequency of His1069Gln and Gly1267Lys mutations in Polish Wilson's disease population. *Eur J Neurol* 2000; **7**: 495-498
- Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, Parano E, Pavone L, Evgrafov O, Ivanova-Smolenskaya IA, Anneren G, Westermarck K, Urrutia FH, Penchaszadeh GK, Sternlieb I, Scheinberg IH, Gilliam TC, Petrukhin K. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (*ATP7B*): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet* 1997; **61**: 317-328
- Stapelbroek JM, Bollen CW, van Amstel JK, van Erpecum KJ, van Hattum J, van den Berg LH, Klomp LW, Houwen RH. The H1069Q mutation in *ATP7B* is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J Hepatol* 2004; **41**: 758-763

S- Editor Li DL L- Editor Rippe RA E- Editor Yin DH

Prevalence of C282Y, H63D, and S65C mutations in hereditary *HFE*-hemochromatosis gene in Lithuanian population

Laimutis Kucinkas · Simonas Juzenas ·
Jurgita Sventoraityte · Ruta Cedaviciute ·
Astra Vitkauskienė · Vytenis Kalibatas ·
Jurate Kondrackienė · Limas Kupcinkas

Received: 6 June 2011 / Accepted: 2 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract *HFE*-hemochromatosis is a common autosomal recessive disease caused by *HFE* gene mutations and characterized as iron overload and failure of different organs. The aim of this study was to determine the prevalence of C282Y (c.845 G>A), H63D (c.187 C>G), and S65C (c.193A>T) alleles of *HFE* gene in the Lithuanian population. One thousand and eleven healthy blood donors of Lithuanian nationality were examined in four different ethnic Lithuanian regions to determine *HFE* gene alleles and genotype frequencies. The samples of DNA were analyzed for the presence of restriction fragment length polymorphism and validated by DNA sequencing. Among 1,011 blood donors tested, the frequency of C282Y, H63D, and S65C alleles were 2.6%, 15.9%, and 1.9%, respectively. One third of the tested

subjects ($n=336$) had at least one of the C282Y or H63D *HFE* gene mutations. The screening of Lithuanian blood donors has detected 13 (1.3%) subjects with a genotype C282Y/C282Y or C282Y/H63D responsible for the development of *HFE*-hemochromatosis. The prevalence of C282Y mutation was significantly higher among the inhabitants of Zemaitija (Somogitia) at the Baltic Sea area (5.9%) in comparison to the regions of continental part of Lithuania (2.4% in Dzūkija, 2.3% in Aukštaitija, and 2% in Suvalkija, $p<0.05$). These data support the hypothesis that the p.C282Y mutation originated from Scandinavia and spread with the Vikings along the Baltic Sea coast. The first epidemiological investigation of *HFE* gene mutations in ethnic Lithuanians showed that the frequencies of H63D, C282Y, and S65C of *HFE* gene alleles are similar to the other North-Eastern Europeans, especially in the Baltic region (Estonia, Latvia), Poland, and part of Russia (Moscow region).

L. Kucinkas (✉)
Institute of Biological System and Genetic Research, Lithuanian
University of Health Sciences,
Mickėvieciaus 9, Kaunas, LT 44307, Lithuania
e-mail: laimisk@delfi.lt

S. Juzenas · J. Sventoraityte · R. Cedaviciute · L. Kupcinkas
Laboratory of Clinical and Molecular Gastroenterology,
Institute for Digestive Research,
Lithuanian University of Health Sciences,
Eiveniu 2, Kaunas, LT 44001, Lithuania

A. Vitkauskienė
Department of Laboratory Medicine,
Lithuanian University of Health Sciences,
Eiveniu 2, Kaunas, LT 44001, Lithuania

V. Kalibatas · J. Kondrackienė · L. Kupcinkas
Department of Gastroenterology,
Lithuanian University of Health Sciences,
Eiveniu 2, Kaunas, LT 44001, Lithuania

Keywords *HFE*-hemochromatosis · Lithuania · Genotypes
prevalence · Viking hypothesis

Introduction

HFE-hemochromatosis is a genetic disease which causes iron overload. The accumulation of iron in the liver, pancreas, heart, joints, and testicles leads to the damage of organs. The gene of *HFE*-hemochromatosis and the most important mutation C282 was identified in the year 1996 [1]. The C282Y homozygosity or H63D and C282Y compound heterozygosity causes *HFE*-hemochromatosis. It is determined that the third mutation S65C is generally benign. Other *HFE* mutations previously described have no clinical significance. The studies

of frequencies of *HFE* mutant alleles in different European countries showed different distribution. So far, the study of *HFE* mutant alleles was not performed in Lithuania; therefore, the authors of the publication aimed to determine the frequency of *HFE*-hemochromatosis alleles in the Lithuanian population.

Methods

Patients and control subjects

Voluntary, unrelated blood donors were randomly selected for the population study. Blood samples were obtained from 1,011 blood donors (583 male and 428 female of mean age 37.1 years, age range 18–65 years). All participants of the study were grouped according to the Lithuanian region they represented: Dzūkija ($N=383$), Suvalkija ($N=148$), Žemaitija ($N=102$), and Aukštaitija ($N=378$). The study was approved by the Lithuanian Bioethics Committee (Protocol No. 2/2008), and informed consent was obtained from all participants.

Restriction fragment length polymorphism analysis

Genomic DNA was isolated from whole blood containing EDTA by using salting-out procedure with some modifications [2]. We used *HFE*(4) forward primer 5'-TCC AGT CTT CCT GGC AA-3' and *HFE*(4) reverse primer 5'-TTCTAGCTCTGGCTCTCA-3' for the amplification of exon 4 of *HFE* gene and detection of p.C282Y mutation. The exon 2 containing the p.S65C and p.H63D mutations was amplified with primers *HFE*(2) forward 5'-TGTGGAGCCTCAACATCCT-3' and *HFE*(2) reverse 5'-TGAAAAGCTCTGACAACCTCA-3'. PCR amplification was performed in a total volume of 25 μ l, which contained 100 ng genomic DNA, 200 μ M of each dNTP, 200 nM of each primer, 1.0 mM $MgCl_2$, 10 $\times$ PCR buffer solution, and 2.5 U *Taq* polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). PCR amplification consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 56°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s with final extension at 72°C for 10 min.

Table 1 Allele frequencies of H63D, S65C, and C282Y mutation in the *HFE* gene in Lithuanian blood donors

<i>HFE</i> alleles	Allele frequency % (95% CI)
C282Y	2.6 (1.88–3.26)
H63D	15.9 (14.33–17.51)
S65C	1.9 (1.33–2.53)

Table 2 Genotype frequencies of H63D, S65C, and C282Y mutations in *HFE* gene in Lithuanian blood donors

Genotype	Observed frequency <i>n</i> (%) (95% CI)	Expected frequency <i>n</i> (%)
C282Y/C282Y	1 (0.1) (–0.09–0.29)	0.68 (0.067)
C282Y/H63D	12 (1.2) (0.52–1.86)	8.36 (0.83)
C282Y/S65C	1 (0.1) (–0.09–0.29)	1 (0.099)
C282Y/N	38 (3.8) (2.59–4.93)	41.85 (4.14)
H63D/H63D	26 (2.6) (1.59–3.55)	25.56 (2.53)
H63D/S65C	4 (0.4) (0.01–0.79)	6.11 (0.6)
H63D/N	254 (25) (22.45–27.79)	255.91 (25.31)
S65C/S65C	0 (0)	0.37 (0.037)
S65C/N	34 (3.4) (2.25–4.47)	30.58 (3.03)
N/N	641 (63.4) (60.43–66.37)	640.59 (63.36)
Total	1,011 (100)	1,011 (100)

N normal

Restriction reaction was performed with 10 μ l of PCR product, 2.5 U of *BclI* (codon 63), *HinfI* (codon 65), or *RsaI* (codon 282), and corresponding buffers. The samples were incubated for 2 h at 50°C for *BclI* restriction or at 37°C for *HinfI* and *RsaI* restriction. The products were resolved on 4% agarose gel. Results of restriction fragment length polymorphism analysis were confirmed by DNA sequence analysis. PCR products were sequenced with a 3100 ABIPrism Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies are presented by percentage with 95% confidence interval (95% CI) calculated by Wilson procedure with a correction for continuity. Hardy–Weinberg equilibrium in the observed genotype distribution was assessed by using χ^2 goodness-of-fit test. The significance level was set at 0.05. The Fisher exact coefficient and χ^2 test were used to compare *HFE* gene mutations frequencies in different regions of Lithuania.



Fig 1 C282Y allele frequency in Lithuanian regions

Results

Allele frequencies of C282Y, H63D, and S65C were estimated to be as follows: 2.6% (95% CI 1.88–3.26), 15.9% (95% CI=14.33–17.51), and 1.9% (95% CI=1.33–2.53), respectively, in the Lithuanian population (Table 1).

Among 1,011 blood donors tested, there were 51 (5.1%) C282Y heterozygotes and one (0.1%) C282Y homozygote. Twenty-six blood donors (2.6%) were identified as H63D homozygotes and 270 (26.7%) as H63D heterozygotes. We detected 39 blood donors (3.7%) with S65C heterozygotes and not one person was identified as S65C homozygote. One, four, and 12 blood donors were C282Y/S65C, H63D/S65C, and C282Y/H63D compound heterozygotes, respectively. The screening of Lithuanian blood donors has detected one C282Y/C282Y and 12 C282Y/H63D subjects with a genotype responsible for the developing of *HFE*-hemochromatosis. Genotyping results are shown in Table 2. There were no significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium in the blood donor population sample. The C282Y allele frequencies (5.9%) detected in Zemaitija (Somogitia) located in the Baltic Sea area were significantly higher compared to Dzūkija (2.4%), Aukštaitija (2.3%), and Suvalkija (2%) ($p < 0.05$, Fig. 1). H63D and S65 allele frequencies were similar in different Lithuanian regions.

Discussion

The determination of frequencies of *HFE*-hemochromatosis alleles is important for the estimation of expectancy of iron overload disease and the developing of screening programs in different countries. In addition, evaluation of the prevalence of *HFE*-related mutations in different countries might explain the population movements in the past. In the current study, the analysis of frequencies of C282Y, H63D, and S65C has been conducted in Lithuania. Our study has determined a relatively low frequency of C282Y mutation (2.6%) in comparison with previously conducted studies in Ireland, the UK and Scandinavian countries [3, 7]. The highest frequency was observed in Ireland (11.4%) and the United Kingdom (8.2%) [4–6]. A lower prevalence of C282Y mutation was found in Scandinavian countries—6.8% in Norway, 5.8% in Sweden, 5.6% in Denmark, and 5.1% in Iceland [9–14]. In Lithuania, C282Y allele frequency (2.6%) was similar to that in Central and Eastern European countries with population of Slavic origin—3.1% in Poland [15]; 3.4% in the Czech Republic; 3.6% in Slovenia; 3.3% in Croatia [18–20]; and 3.5% in Russia, Moscow region [17]. Estonia (Baltic States) had a similar frequency (3.5%) [16]. The lowest reported frequencies of C282Y (0–1.75%) mutation were observed in Greece, Romania, Spain, and Bulgaria [21–24]. These data support

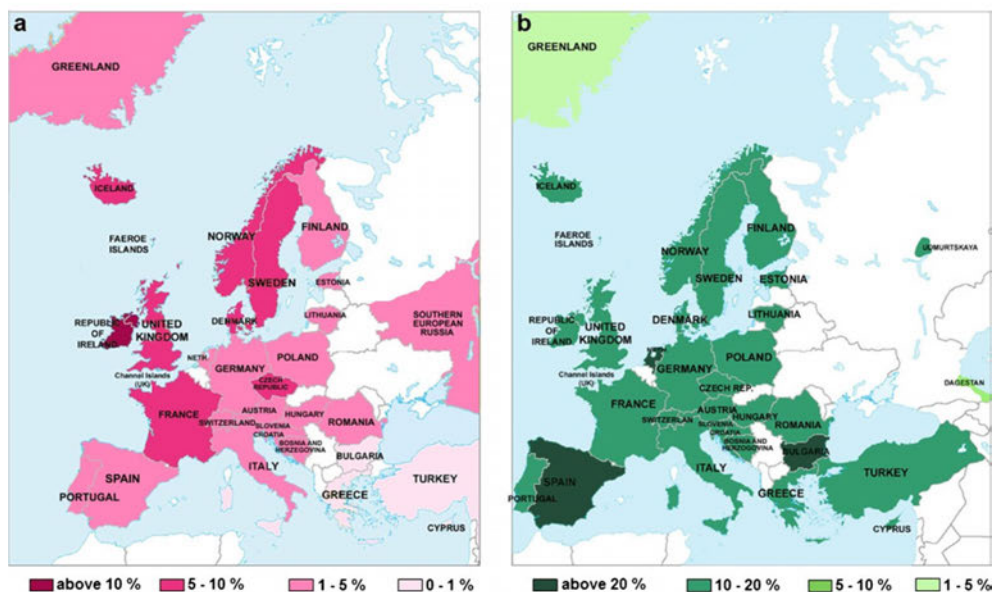


Fig 2 a, b Allele frequencies for p.C282Y (a) and p.H63B (b) *HFE* mutations in European countries. Update reference [26]

the hypothesis of the gene flow from North to South of Europe. The distribution of C282Y allele in a population of different European countries is shown in Fig. 2a.

HFE gene mutation C282Y appeared approximately 60–70 generations ago [25] and originated from the population in Southern Scandinavia or Northern Germany [3, 26]. The hypothesis was formulated that in the period 700–1050 BC, the Vikings spread C282Y mutation to other parts of Northern Europe: Danes to Britain, Normans of Danish origin to the coasts of Northern Germany and in Normandy. Our investigation showed East–West gradient in distribution of C282Y in Lithuania and supports the “Vikings” hypothesis of possible spread of mutation from Scandinavian countries along the coast of the Baltic Sea.

The H63D mutation is more common and equally distributed among European nations (Fig. 2b). The highest frequency of this mutation has been reported in the Basque population (30.4%), and data suggest that this mutation could have an origin in the early West European populations [27]. H63D allele was detected in more than 20% of the population in Spain and in Bulgaria [24, 28]. The frequency of H63D mutation was 16.9% in Portugal and lower in other South Europeans countries [29]. In Lithuania, H63D allele frequency (15.9%) was distributed equally among the population of four ethnic Lithuanian regions and was similar to that in Poland (16.2%), Czech Republic (15.0%), Russia (Moscow region) (15.2%), and Estonia 13.6% [15–18]. The lowest frequency of H63D allele was detected in Northern and Western European countries—Denmark (12.8%), Germany (10.8%), Austria (11.1%), Iceland (10.9%), and Finland (10.6%) [11, 30–32].

The allele frequency of S65C mutation in Lithuanian population was estimated to be 1.9%, which is very close to Croatia (1.8%), Slovenia (1.8%), Denmark (1.8%), Sweden (1.4%), France (1.95%), and Finland (2.3%) [8, 11, 19, 20, 33].

In conclusion, HFE-hemochromatosis genotype frequencies in Lithuanian population agree with the reported frequencies in the other North-Eastern European countries and confirm the hypothesis about the gene flow from the North to the South. The prevalence of C282Y mutation was higher among the inhabitants of Zemaitija (Somogitia) at the Baltic Sea area in comparison to the continental (eastern) part of Lithuania. A possible explanation could be that the mutation was spread from Scandinavia to Zemaitija population by the migratory activities of the Vikings. Therefore, our investigation could support the origin of C282Y mutation from Scandinavia.

Acknowledgments The authors wish to thank all study participants for their cooperation. The study was supported by the Lithuanian State Science and Studies Foundation (No. T-25/09).

Competing interests The author(s) declare that they have no competing interests.

References

- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A et al (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13:399–408. doi:10.1038/ng0896-399, Medline
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
- Milman N, Pedersen P (2003) Evidence that the Cys282Tyr mutation of the HFE gene originated from a population in Southern Scandinavia and spread with the Vikings. *Clin Genet* 64:36–47. doi:10.1034/j.1399-0004.2003.00083.x, Medline
- Byrnes V, Ryan E, Barrett S, Kenny P, Mayne P, Crowe J (2001) Genetic hemochromatosis, a Celtic disease: is it now time for population screening? *Genet Test* 5:127–130. doi:10.1089/10965701753145583, Medline
- Jackson HA, Carter K, Darke C, Guttridge MG, Ravine D, Hutton RD, Napier JA, Worwood M (2001) HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors. *Br J Haematol* 114:474–484. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02949.x, Medline
- Distante S, Berg JP, Lande K, Haug E, Bell H (2000) HFE gene mutation (C282Y) and phenotypic expression among a hospitalized population in a high prevalence area of hemochromatosis. *Gut* 47:575–579. doi:10.1136/gut.47.4.575, Medline
- Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ (1997) Global prevalence of putative hemochromatosis mutations. *J Med Genet* 34:275–278
- Beckman LE, Sjöberg K, Eriksson S, Beckman L (2001) Hemochromatosis gene mutations in Finns, Swedes and Swedish Saamis. *Hum Hered* 52:110–112. doi:10.1159/000053362, Medline
- Holmstrom P, Marmur J, Eggertsen G, Gafvels M, Stal P (2002) Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: a retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls. *Gut* 51:723–730. doi:10.1136/gut.51.5.723, Medline
- Cardoso EM, Stal P, Hagen K, Cabeda JM, Esin S, de Sousa M et al (1998) HFE mutations in patients with hereditary hemochromatosis in Sweden. *J Intern Med* 243:203–208. doi:10.1046/j.1365-2796.1998.00270, Medline
- Pedersen P, Melsen GV, Milman N (2008) Frequencies of the hemochromatosis gene (HFE) variants C282Y, H63D and S65C in 6,020 ethnic Danish men. *Ann Hematol* 87:735–740. doi:10.1007/s00277-008-0506-8, Medline
- Milman N, Pedersen P, Steig T, Byg KE, Graudal N, Fenger K (2001) Clinically overt hereditary hemochromatosis in Denmark 1948–1985: epidemiology, factors of significance for long-term survival, and causes of death in 179 patients. *Ann Hematol* 80:737–744. doi:10.1007/s002770100371, Medline
- Ellervik C, Mandrup-Poulsen T, Nordestgaard BG, Larsen LE, Appleyard M, Frandsen M et al (2001) Prevalence of hereditary hemochromatosis in late-onset type I diabetes mellitus: a retrospective study. *Lancet* 358:1405–1409. doi:10.1016/S0140-6736(01)06526-6, Medline
- Merryweather-Clarke AT, Simonsen H, Shearman JD, Pointon JJ, Norgaard-Pedersen B, Robson KJ (1999) A retrospective anonymous pilot study in screening newborns for HFE mutations in Scandinavian populations. *Hum Mutat* 13:154–159. doi:10.1002/(SICI)1098-1004, (1999) 13:2<154::AID-HUMU8>3.0.CO;2-E
- Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B (2001) Frequency of the hemochromatosis C282Y and H63D mutations in a Polish population of Slavic origin. *Med Sci Monit* 7(3):441–443
- Parlist P, Mikelsaar AV, Tasa G, Beckman L (2001) The frequency of C282Y and H63D mutations in Hemochromatosis gene in

- native Estonians. *Eur J Epidemiol* 17:213–216. doi:10.1023/A:1017951314164, Medline
17. Potekhina ES, Lavrov AV, Samokhodskaya LM et al (2005) Unique genetic profile of hereditary hemochromatosis in Russians: high frequency of C282Y mutation in population, but not in patients. *Blood Cells Mol Dis* 35:182–188. doi:10.1016/j.bcmd.2005.06.012, Medline
 18. Cimburova M, Putova I, Provaznikova H et al (2005) S65C and other mutations in the haemochromatosis gene in the Czech population. *Folia Biol (Praha)* 51:172–176
 19. Cukjati M, Vaupotic T, Ruprecht R, Curin-Serbec V (2007) Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high-throughput genotyping assay. *BMC Med Genet* 8:69. doi:10.1186/1471-2350-8-69, Medline
 20. Ristic S, Makuc J, Starcevic N, Logar N, Brajenovic-Milic B, Stepec S, Plesa I, Kapovic M, Milic S, Stimac D, Crnic-Martinovic M, Peterlin B (2003) Hemochromatosis gene mutations in the Croatian and Slovenian populations. *Clin Genet* 64 (5):444–446. doi:10.1034/j.1399-0004.2003.00169.x, Medline
 21. Papazoglu D, Exiara T, Speletas M et al (2003) Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greece. *Acta Haematol* 109:137–140. doi:10.1159/000069289, Medline
 22. Papanikolaou G, Politou M, Terpos E et al (2006) Hereditary hemochromatosis: HFE mutation analysis in Greeks reveals genetic heterogeneity. *Blood Cells Mol Dis* 26:163–168. doi:10.1006/bcmd.2000.0292, Medline
 23. Vojcu PM, Cojocariu C, Petrescu-Danila E, Covic M, Stanciu C, Rusu M (2009) Prevalence of HFE (hemochromatosis) gene mutations C282Y and H63D in a Romanian population. *Blood Cells Mol Dis* 42. doi:10.1016/j.bcmd.2008.08.004, Medline
 24. Ivanova A, von Ahsen N, Adjonova D et al (1999) C282Y and H63D mutations in the HFE gene are not associated with porphyria cutanea tarda in Bulgaria. *Hepatology* 30:1531–1532. doi:10.1002/hep.510300626, Medline
 25. Ajioka RS, Jorde LB, Gruen JR et al (1997) Haplotype analysis of hemochromatosis: evaluation of different linkage-disequilibrium approaches and evolution of disease chromosomes. *Am J Hum Genet* 60:1439–1447
 26. Distant S, Robson KJH, Graham-Campbell J, Armaiz-Villena A, Brissot P, Worwood M (2004) The origin and spread of the HFE-C282Y haemochromatosis mutation. *Hum Genet* 115:269–279. doi:10.1007/s00439-004-1152-4, Medline
 27. de Juan D, Reta A, Castiella A, Pozueta J, Prada A, Cuadrado E (2001) HFE gene mutations analysis in Basque hereditary haemochromatosis patients and controls. *Eur J Hum Genet* 9 (12):961–964
 28. Sanchez M, Villa M, Ingelmo M et al (2003) Population screening for hemochromatosis: a study in 5370 Spanish blood donors. *J Hepatology* Medline:745–750. doi:10.1016/S0168-8278(03)00123-5, Medline
 29. Cardoso CS, Oliveira P, Graca P (2001) Comparative study of the two more frequent HFE mutations (C282Y and H63D): significant different allelic frequencies between the North and South of Portugal. *Eur J Hum Genet* 9:843–848
 30. Raddatz D, Legler T, Lynen R, Addicks N, Ramadori G (2003) HFE genotype and parameters of iron metabolism in German first time blood donors—evidence for an increased transferrin saturation in C282Y heterozygotes. *J Gastroenterol* 41:1069–1076. doi:10.1055/s-2003-44299, Medline
 31. Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T et al (1999) The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 116:127–134
 32. Syrjakoski K, Fredriksson H, Ikonen T, Kuukasjarvi T, Autio V, Matikainen MP et al (2006) Hemochromatosis gene mutations among Finnish male breast and prostate cancer patients. *In J Cancer* 118:518–520. doi:10.1002/ijc.21331, Medline
 33. Mura C, Raguene O, Ferec C (1999) HFE mutation analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 93(8):2502–2505

Padėka

Pirmiausia noriu padėkoti šeimai. Visada jų palaikymas buvo ir bus man svarbiausias.

Labai dėkingas savo vadovui prof. L. Kupčinskui. Nemaža dalimi tik jo dėka atsirado šis darbas.

Visam LSMU Virskinimo sistemos tyrimo instituto Klinikinės ir molekulinės gastroenterologijos laboratorijos kolektyvui (Jurgitai, Rimai, Linai, Rūtai, Simui) už palaikymą.

Bendradarbiams iš Biologinių sistemų ir genetinių tyrimų instituto, kurie tikėjo, kad vis dėlto galiu apginti savo mokslo darbą.

Ir žinoma, esu labai dėkingas ligoniams, jų artimiesiems ir savanoriams, Lietuvos kraujo donorams.

SUMMARY

1. INTRODUCTION

Wilson's disease (WD) and HFE-hemochromatosis are autosomal recessive disorders of copper and ferrous metabolism. Both diseases cause hepatic disturbances with the involvement of other body systems.

The prevalence of WD is 1/30 000 in Central and Eastern European population with a carrier frequency of 1/90. The prevalence is as high as one in 10 000 in China and Japan. The disease is characterized by hepatic, neurological, or psychiatric disturbances and decreasing biliary copper excretion with consequent copper accumulation in the liver and extrahepatic tissue. The *ATP7B* gene is the only one known gene associated with Wilson's Disease. The WD gene has 21 exons and encodes a copper-transporting *P*-type adenosine triphosphatase which incorporates copper into the serum ferroxidase - ceruloplasmin and copper overproduction excreted by the biliary tree. More than 360 mutations in the *ATP7B* gene have been identified. Mostly, *ATP7B* gene mutations are rare, and most patients have familial mutations and are compound heterozygotes. Consequently, identification of mutations in WD patients often requires sequencing of the *ATP7B* gene. It is important to know the regional distribution of mutations of the *ATP7B* gene to decide about appropriate diagnostic strategies for the disease. As no data exist about the genetic characteristics of WD in the Lithuanian population, the aim of the current study was to carry out a mutation analysis of Lithuanian WD patients.

Another metabolic disease – HFE-hemochromatosis – is a genetic disease that causes iron overload. The accumulation of iron in the liver, pancreas, heart, joints, and testicles leads to organ damage. The gene of HFE-hemochromatosis and the most clinically important c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutation was identified in 1996. HFE-hemochromatosis is caused by c.845G>A (p.Cys282Tyr) homozygosity or c.187C>G (p.His63Asp) and c.193A>T (p.Ser65Cys) compound heterozygosity. The studies on the frequency of HFE mutant alleles in different European countries showed different distributions. So far, no study on HFE mutant alleles has been performed in Lithuania; therefore, the authors of the publication aimed to determine the frequency of HFE-hemochromatosis alleles in the Lithuanian population.

2. AIM AND OBJECTIVES

2.1. The aim of the study

The aim of the study was to identify gene mutations and phenotypic characteristics in patients with metabolic liver diseases – Wilson's disease and HFE-hemochromatosis, and to investigate the frequency of the main mutated alleles of the *HFE* gene among Lithuanian volunteer blood donors.

2.2. Objectives of the study

1. To investigate the prevalence and types of *ATP7B* gene mutations in the genotypes of patients with Wilson's disease and their first-degree relatives.
2. To determine the significance of molecular genetic diagnostics of Wilson's disease.
3. To estimate the frequency of the mutations of the *HFE* gene - c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp), and c.193A>T (p.Ser65Cys)–in the genotypes of healthy Lithuanian voluntary blood donors.
4. To determine the frequency of asymptomatic HFE-hemochromatosis in the genotypes of Lithuanian voluntary blood donors.
5. To investigate the differences in the frequency of *HFE* gene c.845G>A (p.Cys282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp), and c.193A>T (p.Ser65Cys) mutation alleles in the population of blood donors from different ethnic regions of Lithuania.

2.3. Scientific novelty

Molecular genetic analysis for the diagnostics of Wilson's disease was used for the first time in the Lithuania. In the framework of this study, molecular genetic analysis was used to confirm clinical diagnosis and to identify asymptomatic patients. The estimation of the frequency and type of *ATP7B* mutations allows for suggesting the algorithm for laboratory analysis. In addition to that, for the first time we investigated the frequency of HFE-hemochromatosis in the Lithuanian population and in different Lithuanian ethnic groups. Molecular genetic investigation helped to differentiate between primary and secondary forms of hemochromatosis, and to determine asymptomatic disease forms whose progression can be followed by biochemical and clinical investigations.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Patients

The studied cohort, drawn from 22 unrelated families, consisted of 27 WD patients (mean age at the onset of symptoms–26.4 years; range–17–40 years) and 20 of their first-degree relatives. Patients were admitted at the Department of Gastroenterology, Department of Neurology, and Department of Pediatrics, Hospital of Lithuanian University of Health Sciences. The diagnosis of WD was established by applying the scoring system developed at the 8th International Meeting on WD, Leipzig, Germany, in 2001. The diagnosis was confirmed if the WD Leipzig score was ≥ 4 .

Voluntary, unrelated blood donors were randomly selected for the *HFE* gene population study. Blood samples were obtained from 1 011 blood donors (583 males and 428 females, mean age–37.1 years, age range–18–65 years). All participants of the study were grouped according to the Lithuanian region they represented: Dzūkija (N=383), Suvalkija (N=148), Zemaitija (N=102), and Aukštaitija (N=378). The study was approved by the Lithuanian Bioethics Committee (Protocol No. 2/2008), and informed consent was obtained from all participants.

3.2. *ATP7B* gene mutation analysis

Genomic DNA was extracted from whole venous blood by using the salt precipitation method. Firstly, the rapid, semi-nested PCR technique was used to detect the c.3207C>A (p.His1069Gln) mutation as described previously. Patients who were not homozygous for c.3207C>A (p.His1069Gln) mutation were further analyzed. The 21 exons of the WD gene were amplified in a thermal cycler (Biometra T3 Thermocycler, Göttingen, Germany) as described elsewhere. Direct sequencing of the amplified polymerase chain reaction (PCR) products was performed by cycle sequencing, using fluorescent dye terminators in an automatic sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Mutations were quoted according to the guidelines from <http://www.HGVS.org/mutnomen/>, using the reference sequence with the GenBank accession number NM_00053.1.

3.3. Analysis of the restriction fragment length polymorphism

Genomic DNA was isolated from whole blood containing EDTA by using the salting-out procedure with some modifications. We used HFE(4) fow primer 5'-TCC AGT CTT CCT GGC AA-3' and HFE(4) rev primer 5'-TTC TAG CTC CTG GCT CTC A-3' for the amplification of exon 4 of the *HFE* gene and the detection of c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutation. The exon 2 containing c187C>G (p.His63Asp) and c.193A>T (p.Ser65Cys) mutations was amplified

with primers HFE(2) fwd 5' -TGT GGA GCC TCA ACA TCC T-3' and HFE(2) rev 5'- TGA AAA GCT CTG ACA ACC TCA-3'. PCR amplification was performed in a total volume of 25 μ l, which contained 100 ng of genomic DNA, 200 μ M of each dNTP, 200 nM of each primer, 1.0 mM MgCl₂, 10 $\times$ PCR buffer solution, and 2.5 U Taq polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). PCR amplification consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 56°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s with final extension at 72°C for 10 min. The restriction reaction was performed with 10 μ l of the PCR product, 2.5 U of BclI (codon 63), HinfI (codon 65), or Rsa I (codon 282), and corresponding buffers. The samples were incubated for 2 h at 50°C for BclI restriction or at 37°C for HinfI and Rsa I restriction. The products were resolved on 4% agarose gel. The results of the restriction fragment length polymorphism analysis were confirmed by DNA sequence analysis. PCR products were sequenced using a 3100 ABIPrism Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.4. Statistical analysis

Allele and genotype frequencies are presented by percentage with 95% confidence interval (95% CI) calculated by applying Wilson's procedure with a correction for continuity. Hardy-Weinberg equilibrium in the observed genotype distribution was assessed by using the χ^2 goodness-of-fit test. The significance level was set at 0.05. The Fisher exact coefficient and χ^2 test were used to compare HFE gene mutation frequencies in different regions of Lithuania.

4. RESULTS

4.1. *ATP7B* gene allele frequencies

The most frequent mutation was c.3207C>A (p.His1069Gln) with an allele frequency of 74.1 %. Other *ATP7B* gene mutations were rare. The frequency of the alleles c.3472_82del11 (p.G1158fs) and c.3121C>T (p.Arg1041Trp) was 3.7%, and the frequency of mutations c.3402delC (p.Ala1135fs), c.2304dupC (p.M769fs) was 1.9%. Allele type was not identified in 8 cases of *ATP7B* gene investigation. The results of *ATP7B* gene investigation are shown in Table 1.

Table 4.1.1. *The frequency of ATP7B gene alleles*

ATP7B gene mutations	Frequency (95 % CI)
c.3207C>A (p.His1069Gln)	74 (62.3-85.7)
c.3472-82del11 (p.G1158fs)	3.7 (0-8.7)
c.3121C>T (p.Arg1041Trp)	3.7 (0-8.7)
c.3402delC (p.Ala1135fs)	1.9 (0-5.5)
c.2304dupC (p.M769fs)	1.9 (0-5.5)
Unknown alleles	14.8 (5.3-24.3)

4.2. Genotyping characteristics of Lithuanian WD patients

Twenty-five persons (92.6%) were found to have one or two c.3207C > A (p. His1069Gln) mutations in the *ATP7B* gene. Fifteen persons (55.6%) were homozygous individuals with the c. [3207C > A]; [3207C > A] p.[His1069Gln];[His1069Gln] genotype. The compound heterozygosity was rarer – six persons (22.2%) had genotype c.3207C>A (p.His1069Gln) and another mutated *ATP7B* allele. Four persons (14.8%) had mutation in genotype c.3207C>A (p.His1069Gln), and another mutated *ATP7B* allele was unknown. Only two persons (7.4%) had two unknown mutations. The frequency of mutations in Lithuanian WD patients is shown in Figure 4.2.1.

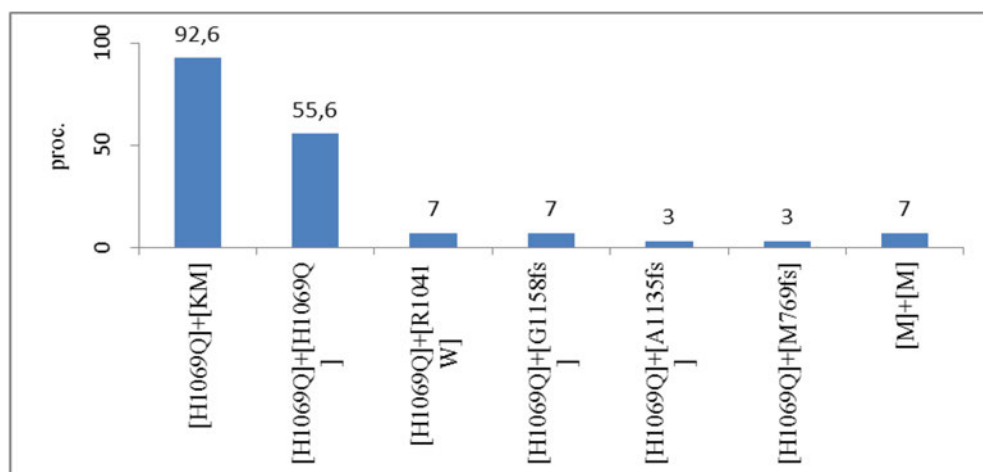


Fig 4.2.1. *The frequency of genotypes in Lithuanian WD patients*

4.3 Results of genotyping among first-degree relatives of Lithuanian WD patients

We performed genotyping of 21 first-degree relatives of WD patients. The c.3207C>A (p.His1069Gln) mutation was detected in heterozygous condition in 13 (65%) of 21 subjects. In four individuals (20%), genotyping did not show any mutation. Three persons were found to have one of the following mutation in their genotype: c.3472_82del11 (p.G1158fs), c.3121C>T (p.Arg1041Trp), or c.2304dupC (p.M769fs).

4.4. Clinical characteristics of patients with Wilson's disease

Acute hepatic disorder (acute hepatitis or fatal hepatic failure) was diagnosed in 5 patients (18.5%). Chronic hepatic disease was detected in 22 out of 27 patients with Wilson's disease (81.5%). Hepatic cirrhosis was found in 16 (63.1%) clinical cases, and 6 (18.5%) patients were diagnosed with chronic hepatitis.

Nervous system damage (ataxia, dysarthria, or Parkinsonism) was detected in 8 cases (33%). Kayser–Flysher ring (KFR) was detected in 10 patients (37%). Six patients with KFR had nervous system damage. All patients with KFR were ill with cirrhosis.

Damage to other body systems was detected in 7 cases (22%). In one case, kidneys were damaged (Fanconi syndrome), and 6 patients had hemolytic anemia.

4.5. Biochemical characteristics of patients with Wilson's disease

Hepatic copper concentration was investigated in eight cases, and only three patients (37.5% sensitivity) had abnormal concentration.

In 20 out of 27 cases, ceruloplasmin concentration was below 0.2 g/L (the sensitivity of the method was 74%). Evaluation of copper excretion with urine was the most sensitive method (88%). Twenty-four patients had abnormal copper concentration ($>100\mu\text{g}/24\text{ h}$) in their daily excretion of urine. Two out of three patients had normal, but still high copper excretion ($>90\mu\text{g}/24\text{ h}$).

Of 12 individuals with compound heterozygous genotype, 10 were found to have ceruloplasmin concentration below 0.2 g/L. The sensitivity of the ceruloplasmin concentration test was 83%. The ceruloplasmin test was more sensitive than the copper concentration in urine test was - the sensitivity of the latter was 75%. Three patients were found to have normal excretion of copper with urine. Seven compound heterozygous patients had chronic liver damage (steatosis, chronic hepatitis, or liver cirrhosis), and five had acute liver damage (fatal liver failure or acute hepatitis). Four patients had Kayser-Fleischer rings (KFR). Generalized data on liver damage and biochemical changes in compound heterozygous patients are presented in Figure 4.5.1.

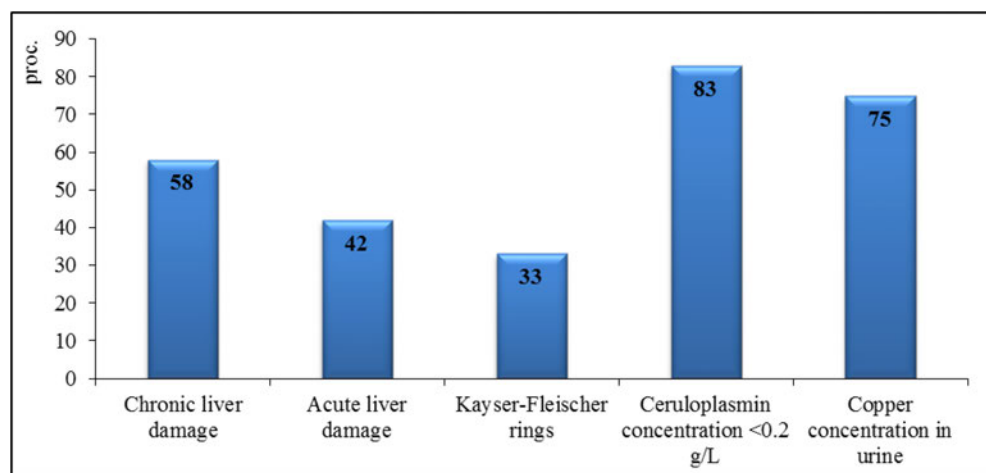


Fig. 4.5.1. Biochemical test results in compound heterozygous patients with Wilson's disease

The examination of 15 homozygous individuals with genotype c.3207C>A (p.His1069Gln) showed that in 10 subjects, ceruloplasmin concentration was below 0.2 g/L. The sensitivity of the ceruloplasmin concentration test was 50%. This test was not as sensitive as the copper concentration in urine test was – the sensitivity of the latter was 80%. Test results are presented in Figure 4.5.2.

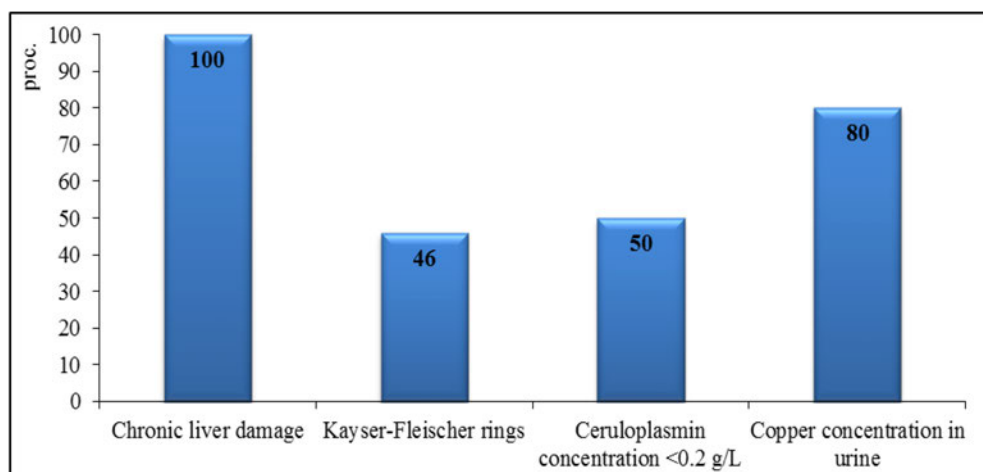


Fig. 4.5.2. Biochemical test results in homozygous *c.3207C>A* (*p.His1069Gln*) patients with Wilson's disease

4.6. Phenotype-genotype associations in patients with Wilson's disease

According to the genotype, WD patients were distributed into two groups: compound heterozygous and *c.3207C>A* (*p.His1069Gln*) homozygous individuals. Compound heterozygous patients had more severe forms of liver damage. Five out of twelve patients had acute liver damage, and two out of five patients had fatal acute liver failure resulting in death. Nerve system damage was detected in three patients, and four patients were found to have KFR. The clinical signs in compound heterozygous patients are summarized in Figure 4.6.1.

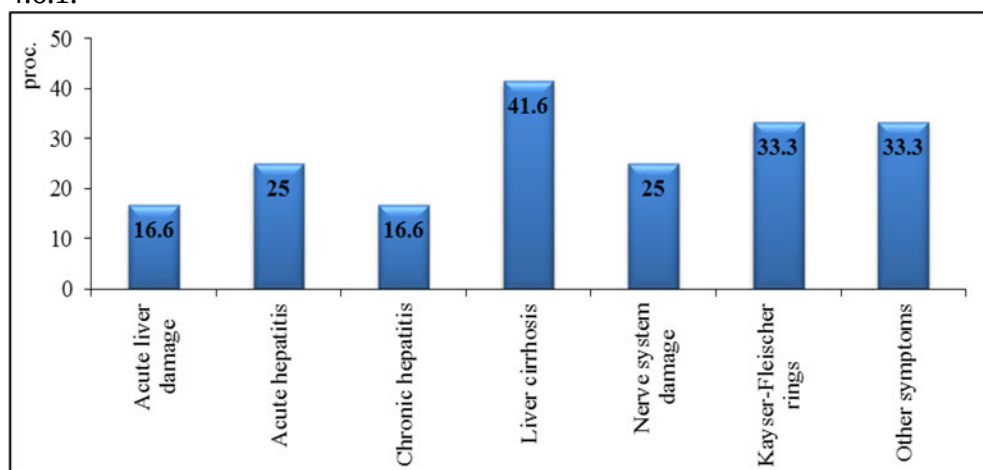


Fig. 4.6.1. Clinical signs in compound heterozygous patients with Wilson's disease

Meanwhile, c.3207C>A (p.His1069Gln) homozygote patients only had chronic forms of liver damage. Four patients had chronic hepatitis, eleven patients had liver cirrhosis, and five patients were found to have nerve system damage. KFR were detected in 7 patients – all of them had liver cirrhosis. Two patients also had hemolytic anemia. Clinical signs in this patient group are presented in Figure 4.6.2.

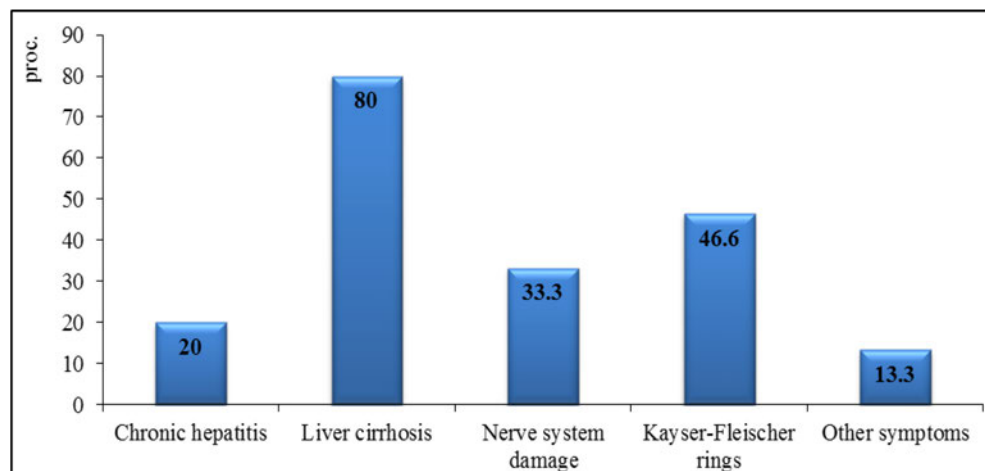


Fig. 4.6.2. *Clinical signs in c.3207C>A (p.His1069Gln) homozygous patients with Wilson's disease*

4.7. The frequency of HFE-hemochromatosis alleles

The frequencies of p.C282Y, p.H63D, and p.S65C alleles in the Lithuanian population was estimated to be, respectively, 2.6% (95% CI 1.88–3.26), 15.9% (95% CI 14.33–17.51), and 1.9% (95% CI 1.33–2.53).

Among 1 011 blood donors tested, 51 (5.1%) were C282Y heterozygotes, and one (0.1 %) was C282Y homozygote. Twenty-six blood donors (2.6%) were identified as H63D homozygotes, and 270 (26.7%) - as H63D heterozygotes. Thirty-nine blood donors (3.7%) were S65C heterozygotes, and no subjects were identified as S65C homozygotes.

One, 4, and 12 blood donors were C282Y/S65C, H63D/S65C, and C282Y/H63D compound heterozygotes, respectively. The screening of Lithuanian blood donors identified one C282Y/C282Y, and 12 C282Y/H63D subjects with a genotype responsible for the developing of HFE-hemochromatosis. The results of genotyping are shown in Table 4.7.1.

Table 4.7.1 Genotype frequencies of H63D, S65C, and C282Y mutations in the HFE gene among Lithuanian blood donors

Genotype	Observed frequency, n (%) (95% CI)	Expected frequency, n (%)
p.C282Y/p.C282Y	1 (0.1) CI (-0.09-0.29)	0.68 (0.067)
p.C282Y/p.H63D	12 (1.2) CI (0.52-1.86)	8.36 (0.83)
p.C282Y/p.S65C	1 (0.1) CI (-0.09-0.29)	1 (0.099)
p.C282Y/N	38 (3.8) CI (2.59-4.93)	41.85 (4.14)
p.H63D/p.H63D	26 (2.6) CI (1.59-3.55)	25.56 (2.53)
p.H63D/p.S65C	4 (0.4) CI (0.01-0.79)	6.11 (0.6)
p.H63D/N	254 (25) CI (22.45-27.79)	255.91 (25.31)
p.S65C/p.S65C	0 (0)	0.37 (0.037)
p.S65C/N	34 (3.4) CI (2.25-4.47)	30.58 (3.03)
N/N	641 (63.4) CI (60.43-66.37)	640.59 (63.36)
Total	1011 (100)	1011 (100)

There were no significant deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium in the blood donor population sample. The frequencies of the p.C282Y allele (5.9%) detected in Žemaitija (Samogitia) located in the coastal part of Lithuania were significantly higher compared to those detected in Dzūkija (2.4%), Aukštaitija (2.3%), or Suvalkija (2%) ($p < 0.05$, Fig. 1). H63D and S65 allele frequencies were similar in different Lithuanian regions in Figure 4.7.1.

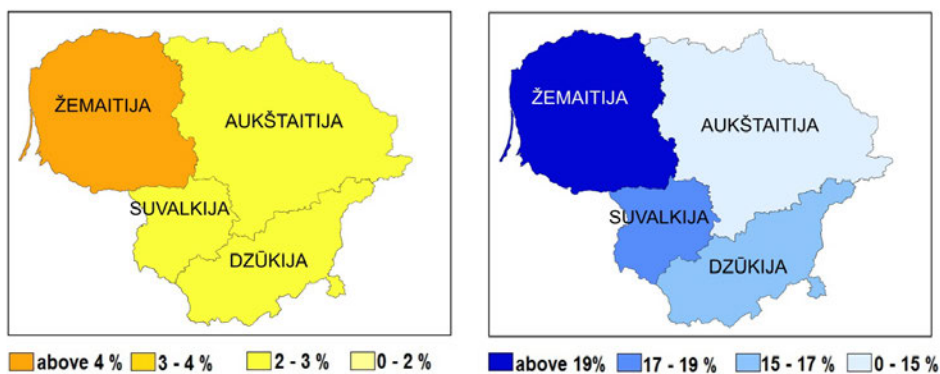


Fig 4.7.1 Allele frequencies of p.C282Y (in a part), and allele frequencies of p.H63D (in b part) in Lithuanian population

5. DISCUSSION

WD might be a potentially life threatening disorder; however, with early diagnosis and consequent treatment, the prognosis of WD is excellent, and usually the need for liver transplantation can be prevented. None of the commonly used parameters alone allow for a certain diagnosis of WD. In our study, Kayser-Fleischer rings were present only in 6 (46%) of our patients, and serum ceruloplasmin levels were even higher than 0.3 g/L in 2 patients with ALF. Urine copper excretion exceeded 100 µg/24 h in 11 (84.6%) of 13 patients, and in one asymptomatic sibling with WD it was even lower than 40 µg/24 h. Therefore, because of potential errors in evaluation, urinary copper excretion and hepatic copper concentration should always be assessed in the context of other diagnostic criteria. WD is found worldwide with different geographical distribution of ATP7B gene mutations. The c.3207C>A (p.His1069Gln) missense mutation is the most frequent in Northern, Eastern and Central Europe, the c3400delC mutation is most common in Brazil, and c.2333G>T (p.Arg778Leu) - in Asian countries. Knowledge of the regional distribution of mutations in the WD gene is important to design appropriate screening strategies. In Central and Eastern Europe, the frequency of the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation in exon 14 has previously been reported to be the highest in Poland and Eastern Germany, and decreasing in Western and Southern European countries. In Poland, 72% of WD patients carry at least one allele with the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation. Studies showed that in East Germany, 39% of WD patients were homozygous, and 48% - heterozygous for the c.3207C>A (p.His1069Gln) mutation. Our study was the first to analyze genetic mutations of WD patients in Lithuania, a country in the Baltic Sea region with 3.4 million inhabitants. The prevalence of the c.3207C>A (p.His1069Gln) mutation in the ATP7B gene in WD patients in Lithuania was 92.3% (with 46.2% homozygotes and 46.2% compound heterozygotes). These findings were even higher than in Poland, a neighbor state, and were considerably higher than in Russia (49%) or Sweden (38%). In compound heterozygote Lithuanian WD patients, additional c.3472-82delGGTTTAA-CCAT, c.3402delC, and never before mentioned new c.3121C>T (p.R1041W) mutations were detected. Only patients with hepatic or hepatic and neuropsychiatric presentations of WD were included in our study; however, other authors have shown that the c.3207C>A (p.H1069Q) mutation is also associated with a late and neurological presentation of the disease. In conclusion, the results of our study showed that the c.3207C>A (p.H1069Q) missense mutation is characteristic of Lithuania patients with WD. As many as 92.3% of WD patients with the hepatic presentation of the disease were homozygous or compound heterozygous for this mutation. Therefore, limited

genetic testing of c.3207C>A (p.H1069Q) mutation might be of high value both to confirm the diagnosis of WD disease and for familial genetic screening in Lithuanian population.

The determination of the frequencies of HFE-hemochromatosis alleles is important for the estimation of the expectancy of iron overload disease and the development of screening programs in different countries. In addition, evaluation of the prevalence of HFE-related mutations in different countries might explain population movements in the past. In the current study, we analyzed the frequencies of C282Y, H63D, and S65C in Lithuania. Our study showed a relatively low frequency of C282Y mutation (2.6%) in comparison with the previously conducted studies in Ireland, the UK, and Scandinavian countries. The highest frequency was observed in Ireland (11.4%) and the United Kingdom (8.2%). A lower prevalence of C282Y mutation was found in Scandinavian countries—6.8% in Norway, 5.8% in Sweden, 5.6% in Denmark, and 5.1% - in Iceland. In Lithuania, the frequency of C282Y allele (2.6%) was similar to that in Central and Eastern European countries with populations of Slavic origin—3.1% in Poland; 3.4% in the Czech Republic; 3.6% in Slovenia; 3.3% in Croatia; and 3.5% - in Russia, Moscow region. Estonia (Baltic States) had a similar frequency (3.5%). The lowest reported frequencies of C282Y (0–1.75%) mutation were observed in Greece, Romania, Spain, and Bulgaria. These data support the hypothesis of the gene flow from North to South of Europe. HFE gene mutation C282Y emerged approximately 60–70 generations ago, and originated from the population in Southern Scandinavia or Northern Germany. A hypothesis was formulated that around 700–1050 BC, the Vikings spread C282Y mutation to other parts of Northern Europe: Danes – to Britain, and Normans of Danish origin – to the coasts of Northern Germany and in Normandy. Our investigation revealed the East–West gradient in the distribution of C282Y in Lithuania, and supported the “Vikings” hypothesis of the possible spread of the mutation from Scandinavian countries along the coast of the Baltic Sea. The H63D mutation is more common and equally distributed among European nations. The highest frequency of this mutation has been reported in the Basque population (30.4%), and data suggest that this mutation could have originated in the early West European populations. The H63D allele was detected in more than 20% of the population in Spain and in Bulgaria. The frequency of H63D mutation was 16.9% in Portugal, and was lower in other South Europeans countries. In Lithuania, the frequency of the H63D allele (15.9%) was distributed equally among the population of four ethnic Lithuanian regions, and was similar to that in Poland (16.2%), the Czech Republic (15.0%), Russia (Moscow region) (15.2 %), and Estonia (13.6%). The lowest frequency of the H63D allele was detected in Northern and Western

European countries—Denmark (12.8%), Germany (10.8%), Austria (11.1%), Iceland (10.9%), and Finland (10.6%).

The allele frequency of S65C mutation in Lithuanian population was estimated to be 1.9%, which is very close to Croatia (1.8%), Slovenia (1.8%), Denmark (1.8%), Sweden (1.4%), France (1.95%), and Finland (2.3%).

In conclusion, HFE-hemochromatosis genotype frequencies in Lithuanian population agree with the reported frequencies in the other North-Eastern European countries and confirm the hypothesis about the gene flow from the North to the South. The prevalence of p.Cys282Tyr mutation was higher among the inhabitants of Žemaitija (Samogitia) in the coastal (western) part of Lithuania, in comparison to the continental (eastern) part of the country. A possible explanation could be that the mutation was spread from Scandinavia to Žemaitija by the migratory activities of the Vikings. Therefore, our investigation could support the origin of the C282Y mutation in Scandinavia.

CONCLUSIONS

1. The most frequent mutation among Lithuanian WD patients was found to be c.3207C>A (p.His1069Gln), which is the most common in Central and Eastern European populations. Other *ATP7B* gene mutations – c.3472_82del11 (p.G1158fs), c.3121C>T (p.Arg1041Trp), c.3402delC (p.Ala1135fs), and c.2304dupC (p.M769fs) - were rare.
2. The molecular genetics investigation is a very important diagnostic technique. The sensitivity of molecular genetic diagnostics is 92.6%. The molecular genetics technique allows for confirming clinical diagnosis and detecting asymptomatic clinical forms. Other clinical laboratory methods are less sensitive. The most sensitive method was urine copper excretion, while such methods as ceruloplasmin concentration in serum or detection of Kayser-Fischer rings in the eyes were less sensitive.
3. The frequency of the *HFE*-hemochromatosis gene mutations – c.845G>A (p.Cys282Tyr) and c.187C>G (p.His63Asp) – was similar to that in other Central and Eastern European countries, with the most similar frequency being in Poland.
4. The frequency of asymptomatic *HFE*-hemochromatosis was 1.3%. The homozygous genotype c.[845G>A];[845G>A] p.[CysC282Tyr];[CysC282Tyr] was detected in 0.1% of the subjects, and the genotype c.[845G>A];[187C>G] p.[CysC282Tyr];[His63Asp] (with less penetrance) was detected in genotyping of 1.2% of the investigated persons.
5. The prevalence of c.845G>A (p.Cys282Tyr) mutation was statistically significantly higher among the inhabitants of Žemaitija (Samogitia) – in the coastal (western) part of Lithuania.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

1. Firstly, in the molecular diagnosis of patients with Wilson's disease, c.3207C> A (p.His1069Gln) mutation has to be determined. In case of one detected allele or no detected alleles, sequencing of *ATP7B* genes of exons 8, 14, 15, 16, and 20 has to be performed. The detection of the most common c.3207C> A (p.His1069Gln) mutation was introduced in the Clinic of Laboratory Medicine, LUHS Hospital.
2. The frequency of *HFE*-hemochromatosis alleles c.845G> A (p.Cys282Tyr), c.187C> G (p.His63Asp), and c.193A> T (p.Ser65Cys) is low in Lithuanian population, and is similar to that in Central and Eastern European countries. The frequency of asymptomatic patients with *HFE*-hemochromatosis was 1.3%; therefore, in clinical practice, patients should undergo a genetic test that would confirm the molecular genetic diagnosis.
3. Genetic testing in clinical practice should be carried out for differential diagnostics in patients suspected of having liver disease of unclear etiology. Siblings (brothers and sisters) of patients with Wilson's disease and *HFE*-hemochromatosis should be investigated for these diseases in order to timely identify latent and asymptomatic forms of the disease, and start the treatment.

CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė: Laimutis Kučinskas
Darbovietės adresas: LSMU Biologinių sistemų ir genetinių tyrimų institutas, Eivenių g. 4, Kaunas, Lietuva
Darbovietė: LSMU Biologinių sistemų ir genetinių tyrimų institutas, pareigos lektorius
El. paštas: laimisk@delfi.lt

Išsilavinimas:

1991–1998	Kauno medicinos akademija, Medicinos fakultetas
1998–1999	Šakių ligoninė, pirminė rezidentūra
1999–2001	Kauno klinikos, vaikų ligų rezidentūra
2001–2002	VU ligoninė Santariškių klinikos, gydytojo genetiko rezidentūra (nebaigta)
2002–2004	Ulmo universitetas, Vokietija stažuotė Žmogaus genetikos skyriuje
Nuo 2004 m. iki dabar	LSMU (iki 2010 m.– KMU) Biologinių sistemų ir genetinių tyrimų institutas, pareigos lektorius