



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Agnese Zariņa

ORCID 0000-0002-0242-5796

Vilsona slimības klīnisko gaitu raksturojošie ģenētiskie faktori

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes,
tai skaitā farmācija

Apakšnozare – medicīniskā ģenētika

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātē

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. med. asociētā profesore **Ieva Tolmane**, Latvijas Universitāte

Dr. med. docente **Zīta Krūmiņa**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Darba zinātniskā konsultante:

Dr. med. **Linda Gailīte**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. biol. profesors **Edvīns Miklaševičs**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. profesors **Limas Kupčinskis**,
Lietuvas Veselības zinātņu universitāte

Dr. med. profesore **Riina Salupere**, Tartu Universitāte, Igaunija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2020. gada 29. septembrī plkst. 15.00 gan Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā, gan attālināti *Zoom* tiešsaistes platformā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļvietnē:
www.rsu.lv

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. sc. soc. docents **Andrejs Ivanovs**

Saturs

Darba aktualitāte	8
Darba novitāte	9
Darba mērķis	9
Darba uzdevumi	9
Darba hipotēze.....	10
1. Materiāls un metodes.....	11
1.1. Pētījuma grupas	11
1.2. Molekulārie izmeklējumi	12
DNS izdalīšana no venozajām asinīm.....	12
<i>ATP7B</i> gēna alēliskā varianta H1069Q noteikšana ar PCR Bi-PASA metodi	13
<i>ATP7B</i> gēna tiešā sekvenēšana	13
Alēlisko variantu patogenitātes analizēšana.....	13
<i>ATOX1</i> gēna tiešā sekvenēšana.....	14
<i>COMMD1</i> gēna tiešā sekvenēšana.....	14
<i>CP</i> gēna tiešā sekvenēšana.....	15
Multipleksa ligācijas atkarīga probes pavairošana (MLPA)	15
Kvantitatīvā <i>PCR</i> (<i>qPCR</i>).....	15
<i>HFE</i> variantu noteikšana.....	16
1.3. Vilsona slimības prevalences aprēķini	17
1.4. Datu statistiskā apstrāde	18
2. Rezultāti.....	19
2.1. Vilsona slimības prevalence jaundzimušo kohortās	19
2.2. Vilsona slimības pacientu raksturojums	19
Vilsona slimības pacientu dzimums un pirmo simptomu parādīšanās vecums	19
VS pacientu pirmo simptomu raksturojums.....	20
2.3. <i>ATP7B</i> gēna analīze.....	23
<i>ATP7B</i> gēna kodējošo daļu (eksonu) analīze	23
<i>ATP7B</i> gēna promotera analīze.....	28
<i>ATP7B</i> gēna pārbaude ar <i>MLPA</i>	28
<i>ATP7B</i> gēna pārbaude ar <i>qPCR</i>	29
<i>ATP7B</i> gēna alēlisko variantu saistība ar VS fenotipu.....	29
2.4. <i>ATOX1</i> gēna analīze	31
2.5. <i>COMMD1</i> gēna analīze	32
2.6. <i>CP</i> gēna analīze	35
2.7. <i>HFE</i> gēna variantu pārbaude.....	38
3. Diskusija	40
Secinājumi	51
Izmantotā literatūra.....	52

Publikācijas par pētījuma tēmu	62
Pateicības.....	65

Darbā izmantotie saīsinājumi

ACMG	Amerikāņu medicīniskās ģenētikas un genomikas koledža
<i>ATOXI</i>	antioksidants 1 – vara šaperons (mazo molekulu korektormolekula)
ATP7A	ATPāze – vara transportētājs alfa
ATP7B	ATPāze – vara transportētājs beta
BKUS	Bērnu klīniskā universitātes slimnīca
<i>BLAST</i>	pamata vietējās meklēšanas rīks
<i>COMMD1</i>	vara metabolisma domēnu saturošais proteīns 1
<i>CP</i>	ceruloplazmīns
del	delēcija
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
<i>HFE</i>	cilvēka homeostatisks regulētājproteīns
HGMD	cilvēka gēna mutāciju datubāze
HGVS	cilvēka genoma variāciju biedrība
<i>IQR</i>	starpkvartiļu amplitūda
<i>KRITI</i>	ankirīna atkārtojumu saturošs
MAF	retāk sastopamās alēles biežums
<i>MLPA</i>	multipleksa ligācijas atkarīga probes pavairošana
mRNS	matricas ribonukleīnskābe
<i>OMIM</i>	tiešaistē pieejamā Mendelējošā iedzimšana starp cilvēkiem
P. Stradiņa KUS	Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca
<i>PAGE</i>	poliakrilamīda gela elektroforēze
PCR	polimerāzes ķēdes reakcija

<i>PCR Bi-PASA</i>	divvirzienu <i>PCR</i> (polimerāzes ķēdes reakcija) specifisku alēļu pavairošanai
qPCR	kvantitatīva polimerāzes ķēdes reakcija
RAKUS	Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca
<i>RFLP</i>	restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu analīze
rs	references <i>SNP</i> (viena nukleotīda polimorfisms)
RSU MĢZL	Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorija
SD	standartnovirze
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>UTR</i>	netranslējamais rajons
VS	Vilsona slimība

Ievads

Vilsona slimība (VS) ir autosomāli recesīva vara vielmaiņas patoloģija ar prevalenci 1: 30 000 Eiropā, kuru izraisa apmēram 800 dažādi alēliskie varianti *ATP7B* gēnā (HGMD, n.d.).

VS klīniskās izpausmes ir ļoti dažādas, biežāk ietverot aknu bojājumu un neiroloģiskos simptomus. Vilsona slimība var izpausties jebkurā vecumā, lai gan lielākā daļā gadījumu pirmie simptomi parādās vecumā no pieciem līdz 35 gadiem (Ferenci et al., 2003). Lai arī slimība ir monogēna (patoģenēzē ir iesaistīts viens gēns), novēro nozīmīgas klīnisko izpausmju un pirmo simptomu parādīšanās vecuma atšķirības pacientiem ar vienādu genotipu, pat vienas ģimenes ietvaros. Lai arī slimību izraisa dažādi *ATP7B* gēna alēliskie varianti, turpinās pētījumi, lai izskaidrotu Vilsona slimības variabilitāti.

Viens no skaidrojumiem ir tāds, ka paša *ATP7B* gēna alēliskajiem variantiem ir dažāda ietekme uz olbaltumvielas ATP7B funkcijām, kas rezultējas atšķirīgā fenotipā. Ir bijuši dažādi pētījumi par genotipa–fenotipa saistību *ATP7B* gēna ietvaros – vieni bijuši ar pozitīvu atradni (Hua et al. 2016; Gromadzka et al., 2005), citi – ar negatīvu (Moller et al., 2011; Mukherjee et al., 2014).

Otrs skaidrojums balstās uz iespējamu citu gēnu ietekmi VS fenotipa modificēšanā. Kā VS klīnisko gaitu ietekmējošie gēni visbiežāk tiek minēti tie, kuru kodētās olbaltumvielas ir iesaistītas vara vielmaiņā, piem., *ATOX1* un *COMMD1*, kā arī gēni, kuru kodētās olbaltumvielas varētu būt iesaistītas aknu šūnu atšķirīgā reakcijā uz iekaisumu, piem., *HFE*. ATOX1 proteīns ir vara šaperons (mazo molekulu korektormolekula), kas nogādā varu pie ATP7A un ATP7B (ATP-āžu) metālu saistošajiem domēniem, savukārt, COMMD1 proteīns ir iesaistīts vara homeostāzes regulācijā, un izmaiņas tajā ir atrastas Bedlingtonas terjeriem, kas cieš no vara toksikozes. Abi minētie gēni ir pētīti

dažādās populācijās starp VS pacientiem, bet iegūtie rezultāti ir pretrunīgi (Stuehler et al., 2004; Lovicu et al., 2006; Weiss et al., 2006; Simon et al., 2008; Czlonkowska et al., 2018).

VS diagnostika balstās uz 2001. gadā pieņemtajām diagnostikas vadlīnijām (EASL, 2012), kur viens no galvenajiem diagnostiskajiem kritērijiem ir samazināts ceruloplazmīna līmenis asinīs. Šo izmaiņu var radīt arī citi iemesli, piem., alēliskie varianti *CP* gēnā, kas kodē ceruloplazmīnu. Vairākos pētījumos ir atrasta saistība starp alēliskajiem variantiem *CP* gēnā, kuri, izmainot ceruloplazmīna līmeni asinīs, var būt saistīti ar pastiprinātu dzelzs uzkrāšanos galvas smadzenēs, ietekmējot tādu multifaktoriālu slimību kā Parkinsona slimība klīnisko norisi (Zhao et al., 2015).

Darba aktualitāte

Vilsons slimība ir viena no retajām ģenētiskām saslimšanām, kuru var veiksmīgi ārstēt. Bieži vien klīniskā diagnostika ir novēlota, varš jau ir uzkrājies audos un neatgriezeniski bojājis tos. DNS diagnostika paver iespējas diagnosticēt VS presimptomātiski (biežāk jau esošo slimnieku radniekiem, veicot ģimenes locekļu secīgu testēšanu / kaskādes skrīningu). Šīs slimības atklāšana un profilaktiskas terapijas uzsākšana pirms aknu vai neiroloģisko funkciju traucējumu parādīšanās var glābt cilvēka dzīvību un pasargāt no invaliditātes. Latvijā Vilsons slimības DNS diagnostika tiek veikta jau kopš 2004. gada, pārsvarā balstoties uz biežākā patogēnā alēliskā varianta – H1069Q noteikšanu, kas VS izraisa 35–45% gadījumu (Hedera, 2017). Lai atklātu citus VS izraisošos alēliskos variantus, nepieciešama gēna *ATP7B* tiešā sekvenēšana. Gēnam *ATP7B* ir 21 eksons (gēna kodējošās daļas), kuru tiešā sekvenēšana ir laikietilpīgs un dārgs process, tieši tāpēc nepieciešama Latvijas Vilsons slimības pacientu molekulārā izpēte, nosakot alēlisko variantu “karstos punktus”, kas palīdzētu izstrādāt Vilsons slimības molekulārās diagnostikas algoritmu, ātrāk un lētāk diagnosticējot VS citiem pacientiem.

Ja izdotos atrast citu gēnu ietekmi uz Vilsona slimības klīnisko gaitu, iespējams, rastos pilnīgāks priekšstats par slimības patogēnēzi, labāka izpratne par slimības attīstības gaitu, paverot ceļu pilnīgākai slimības progresēšanas prognozēšanai, līdz ar to ietekmējot arī ārstēšanas taktiku un iznākumu.

Darba novitāte

Darbā pirmo reizi veikta *CP* gēna alēlisko variantu analīze starp VS pacientiem. Literatūrā aprakstīta šo variantu analīze saistībā ar Parkinsona slimību un priekškambaru fibrilāciju. Darbā pirmo reizi noteikta Vilsona slimības prevalence jaundzimušo kohortās Latvijā.

Darba mērķis

Izpētīt Vilsona slimību raksturojošos ģenētiskos faktorus, kā arī noteikt to asociāciju ar slimības klīniskajām izpausmēm.

Darba uzdevumi

1. Veikt biežākā, Vilsona slimību izraisošā *ATP7B* gēna alēliskā varianta H1069Q noteikšanu ar PCR-BiPASA metodi pacientiem ar klīniski apstiprinātu Vilsona slimību vai ar aizdomām par to, noteikt šī varianta sastopamības biežumu.
2. Veikt *ATP7B* gēna eksonu (kodējošo rajonu), promotera (nekodējošo rajonu) tiešo sekvenēšanu un multipleksa ligācijas atkarīgu proves pavairošanu (*MLPA*) *ATP7B* gēnam pacientiem ar klīniski, bet ne molekulāri apstiprinātu Vilsona slimību vai ar aizdomām par to, nosakot biežāk sastopamos alēliskos variantus.
3. Noteikt Vilsona slimības prevalenci Latvijas jaundzimušo kohortās.
4. Salīdzināt Vilsona slimības pacientu klīniskos datus ar *ATP7B* gēna alēliskajiem variantiem.

5. Molekulāri apstiprinātajiem pacientiem ar Vilsona slimību veikt *ATOX1*, *COMMD1*, *CP* un *HFE* alēlisko variantu noteikšanu, noteikt to iespējamo saistību ar VS fenotipu.

Darba hipotēze

Vilsona slimība ir monogēna ģenētiska slimība, kuru izraisa dažādi *ATP7B* gēna patogēnie alēliskie varianti, bet dažādo klīnisko gaitu ietekmē gan *ATP7B* gēna dažādie patogēnie alēliskie varianti, gan izmaiņas citos gēnos, kas ir saistīti ar vara un dzelzs metabolismu organismā (*ATOX1*, *COMMD1*, *CP* un *HFE*).

1. Materiāls un metodes

1.1. Pētījuma grupas

Pētījums apstiprināts Latvijas Republikas Centrālajā Ētikas komitejā, un tas veikts saskaņā ar starptautiskiem, Latvijas Republikas likumiem, Helsinku un Taipejas deklarāciju. Pirms pētījuma uzsākšanas katrs pacients iepazinies ar “Informāciju pacientam” un rakstiski apliecinājis piekrišanu dalībai pētījumā, parakstot “Piekrišanas apliecinājumu”. Ja indivīds bioloģiskā materiāla savākšanas brīdī bija nepilngadīgs, viens vai abi no bioloģiskajiem vecākiem parakstīja informētas personas piekrišanas formu. Pirms 2016. gada pētījums veikts pētījuma “Ksenobiotiķu metabolismā iesaistīto enzīmu kodējošo gēnu polimorfismi Latvijas populācijā un to nozīme aknās metabolizēto medikamentu terapijas izvēlē” ietvaros.

Pētījumam tika apzināti dati no visiem pacientiem, kuru bioloģiskais paraugs tika nosūtīts RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskajai laboratorijai (MĢZL) uz VS DNS diagnostiku un kuri parakstījuši informēto piekrišanu par dalību pētījumā. Tālākā pētījumā pacienti tika iekļauti, balstoties uz Leipcigas diagnostiskajiem kritērijiem: 64 neradnieciski pacienti ar apstiprinātu VS (četri un vairāk punkti pēc minētajiem kritērijiem); 14 pacienti ar klīniskām aizdomām par VS (2–3 punkti pēc Leipcigas diagnostiskajiem kritērijiem), kā arī astoņi pacienti, kuriem VS atklāta ģimenes skrīningā.

Asins paraugi DNS analīzei tika ņemti no perifērām asinīm dažādās ārstniecības iestādēs: dažādās Bērnu Klīniskās universitātes slimnīcas (BKUS) stacionārajās un ambulatorajās nodaļās, dažādās Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas (RAKUS) stacionārajās un ambulatorajās nodaļās

(galvenokārt stacionārā “Latvijas Infektoloģijas centrs”) laika posmā no 2001. līdz 2018. gadam.

Atklāto jauno *ATP7B* gēna alēlisko variantu pārbaudei tika izmantota kontroles populācija: 93 indivīdi 39–82 gadu vecuma grupā, kuriem nebija klīnisko datu par VS un kuri bija parakstījuši piekrišanu par neierobežotu viņu bioloģiskā materiāla izmantošanu dažādiem pētījumiem, kā arī dati par *ATP7B* gēna variantu biežumiem no 42 indivīdiem dažādā vecumā bez zināmas hepatoloģiskas vai neiroloģiskas saslimšanas no RSU MĢZL iekšējās datubāzes, kas balstās uz klīniskā eksoma datu analīzes (arī šie indivīdi bija parakstījuši piekrišanu par neierobežotu viņu bioloģiskā materiāla izmantošanu dažādiem pētījumiem).

Slimības anamnēze, klīnisko simptomu raksturojums, laboratorisko analīžu un citu diagnostisko izmeklējumu rezultāti tika iegūti no ārstu aizpildītajām ģenētisko izmeklējumu nosūtīšanas veidlapām RSU MĢZL, kā arī no VS pacientu ambulatorajām un stacionārajām kartēm RAKUS stacionārā “Latvijas Infektoloģijas centrs” un BKUS.

1.2. Molekulārie izmeklējumi

Visi molekulārie izmeklējumi veikti RSU MĢZL laika posmā no 2006. līdz 2018. gadam.

DNS izdalīšana no venozajām asinīm

No 2006. līdz 2015. DNS izdalīta, izmantojot fenola–hloroforma metodi. Metode adaptēta MĢZL pēc *John* un kolēģu aprakstītās DNS izdalīšanas metodes (*John et al.*, 1991). No 2015. gada DNS izdalīšana notiek, izmantojot komerciālu kitu *Innu Prep DNA mini kit* (*Analytic Jena*, Vācija), izmantojot ražotāja protokolu.

***ATP7B* gēna alēliskā varianta H1069Q noteikšana ar PCR Bi-PASA metodi**

Metode adaptēta no Polakovas metodes (Polakova et al., 2007).

Visiem pacientiem ar klīniski apstiprinātu VS vai aizdomām par to veikta *PCR Bi-PASA* metode Eiropā biežākā VS izraisošā alēliskā varianta – c.3207C>A (p.H1069Q) noteikšanai.

***ATP7B* gēna tiešā sekvenēšana**

ATP7B gēna eksonu un tiem piegulošo intronu (\pm 20 nukleotīdu) sekvenēšana tika veikta visiem VS pacientiem ar klīniski apstiprinātu VS vai ar aizdomām par to, kuriem biežākais alēliskais variants (p.H1069Q) netika atrasts abās gēna alēlēs. Sekvenēšanai tika izmantoti praimerī, kuri piemeklēti, izmantojot brīvpieejas programmu *Primer 3* (Primer3 Input (Version 0.4.0), n.d.). *ATP7B* gēna eksonu sekvenēšana tika veikta, izmantojot adaptēto ražotāja protokolu (Zarina et al., 2017). Sekvenēšanas elektroferogrammas analizētas, izmantojot programmu *Chromas 2,4* versiju. Iegūtās sekvences salīdzinātas ar *BLAST* datubāzē pieejamo references sekvenci – NG_008806.1; NM_000053.3 un NP_000044.2 (*BLAST*: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

Alēlisko variantu patogenitātes analizēšana

Visi atrastie alēliskie varianti tika pārbaudīti ASV Albertas Universitātes veidotajā “Vilsona slimības mutāciju datubāzē” (aktīva datubāzes papildināšana un uzturēšana tika pārtraukta 2010. gadā) (EASL, 2012.) un Nacionālā Biotehnoloģijas Informācijas centra (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*) datubāzē “ClinVar” (NCBI, n.d.). Iepriekš neaprašītu alēlisko variantu patogenitātes pārbaudei tika izmantotas Amerikāņu medicīniskās ģenētikas un genomikas koledžas (angl. *American Colledge of Medical Genetics and Genomics, ACMG*) jaunu sekvenču variantu interpretācijas vadlīnijas (Richards et al., 2015). Pie PP3 kritērija tika

izmantotas *Polyphen-2*, *SIFT*, *Mutation Taster* un *Panther software* programmas, (Adzhubei et al., 2010) kā arī iepriekš neaprašītie varianti tika pārbaudīti kontroles grupā. Savukārt, *ATP7B* gēna promotera (5'UTR) rajona tiešajai sekvenēšanai tika izmantoti praimerī no iepriekš aprakstīta pētījuma (Cullen, Prat and Cox, 2003). *ATP7B* gēna promoters tika sekvenēts visiem pacientiem ar klīniski apstiprinātu VS ar ar aizdomām par to, kuriem netika identificēti patogēnie alēliskie varianti abās gēna alēlēs, izmantojot *PCR-BiPASA* un *ATP7B* gēna kodējošo daļu sekvenēšanu.

***ATOXI* gēna tiešā sekvenēšana**

Gēna sekvenēšana tika veikta visiem VS pacientiem, kuriem VS tika molekulāri apstiprināta (identificēti divi patogēnie alēliskie varianti *ATP7B* gēnā), lai noteiktu *ATOXI* gēna variantu iespējamo saistību ar dažādu VS fenotipu. Gēna sekvenēšanai tika izmantoti praimerī, kuri piemēlēti, izmantojot brīvpieejas programmu *Primer 3* (Primer3 Input (Version 0.4.0), n.d.). Iegūtās sekvences salīdzinātas ar *BLAST* pieejamo references sekvenci – NC_000005.10, NM_004045.3 un NP_004036.1 (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

***COMMD1* gēna tiešā sekvenēšana**

Gēna sekvenēšana tika veikta visiem VS pacientiem, kuriem VS tika molekulāri apstiprināta (identificēti divi patogēnie alēliskie varianti *ATP7B* gēnā), lai noteiktu *COMMD1* gēna variantu iespējamo saistību ar dažādu VS fenotipu. Gēna sekvenēšanai tika izmantoti praimerī no iepriekš publicētiem datiem (Gupta et al., 2010). Iegūtās sekvences salīdzinātas ar *BLAST* pieejamo references sekvenci – NC_000002.12, NM_152516.3, NP_689729.1 (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

CP gēna tiešā sekvenēšana

Gēna sekvenēšana tika veikta visiem VS pacientiem, kuriem VS tika molekulāri apstiprināta (identificēti divi patogēnie alēliskie varianti *ATP7B* gēnā), lai noteiktu *CP* gēna promotera variantu iespējamo saistību ar VS klīniskajiem simptomiem. Gēna regulatorās daļas (promotera) sekvenēšanai tika izmantoti praimerī, no kuriem divi piemeklēti, izmantojot brīvpiecejas programmu *Primer 3* (Primer3 Input (Version 0.4.0), n.d.), bet pārējie divi izmantoti no iepriekš publicētas informācijas (Zhao et al., 2015). *CP* gēna promotera (ne visa gēna) sekvenēšana tika izvēlēta, pamatojoties uz citos pētījumos iegūto informāciju, secinot, ka izmaiņas *CP* gēna promotera var būt saistītas ar izmainītu seruma ceruloplazmīna līmeni, tāpēc *CP* gēna izmaiņas var izraisīt VS līdzīgus simptomus (Zhao et al., 2015). Analīzē tika izmantoti četri praimerī: ārējie – *PCR* produkta iegūšanai, iekšējie (kopā ar ārējiem) – sekvenēšanas reakcijā. Iegūtās sekvences salīdzinātas ar *BLAST* pieejamo references sekvenci – NC_000003.12 (*BLAST*: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

Multipleksa ligācijas atkarīga proves pavairošana (MLPA)

MLPA tika veikta pacientiem ar klīniski apstiprinātu VS vai ar aizdomām par to, kuriem VS nebija molekulāri apstiprināta pēc *ATP7B* gēna sekvenēšanas. Protokols *MLPA* veikšanai adaptēts no reaģentu ražotāja mājas lapas (MRC-Holland, n.d.).

Kvantitatīvā PCR (qPCR)

Lai validētu iespējamās, *MLPA* atrastās duplikācijas, tika veikta kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija (*qPCR*) un tika izmantota salīdzinošā CT metode (“Delta Delta C(T)” metode) atbilstoši *Livak et al.* (Livak and Schmittgen, 2001), un *Qiagen* rekomendācijām. Praimeru secības intereses rajoniem tika izvēlētas, lai amplificētu rajonu, kurš tika analizēts ar *MLPA* zondēm, savukārt, kā references reģioni tika izmantoti *ATP7B* 2. eksons, kura

kopiju skaita izmaiņas tika izslēgtas, izmantojot *MLPA* un Sangerā sekvenēšanu, un *KRITI* gēna fragmentu (*KRITI* tika izvēlēts kā references, jo tajā ļoti reti sastopamas kopiju skaita izmaiņas). Praimeru secības tika dizainētas, izmantojot brīvpieejas programmu *NCBI Primer BLAST* (*BLAST*: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.). Praimeru secības, piesaistes temperatūru un produkta garumus skat. 1.1. tabulā. Pirms *qPCR* veikšanas visi *PCR* apstākļi tika optimizēti, un amplifikācijas efektivitāte un vienlīdzība tika pārbaudīta, izmantojot *Standart curve*, kura tika iegūta, veicot četrus desmitkārtīgus sērijveida atšķaidījumus. Savukārt, reakcijas specifiskums tika pārbaudīts, izmantojot augstas izšķirtspējas kušanas analīzi (angl. *high resolution melting, HRM*). Veicot *qPCR*, tika iekļauti: 1) paraugi ar aizdomām par kopiju skaita izmaiņām *ATP7B* gēnā no *MLPA* rezultātiem, 2) paraugi no klīniski veselīgiem indivīdiem, kuriem kopiju skaita izmaiņas *ATP7B* gēnā tika izslēgtas ar *MLPA*; 3) paraugi bez pievienotas DNS – negatīvās kontroles paraugi. Visas reakcijas tika veiktas vismaz četras reizes (attiecīgi veikti četrkārtīgi secīgi atkātojumi). Par kontroles paraugiem tika izmantoti trīs indivīdu paraugi Par relatīvā fluorescētā signāla stipruma koeficienta (“Delta Delta C(T)”) normu tika pieņemtas koeficienta robežas no 0,7–1,3, kas atbilst divām kopijām konkrētajā interesējam rajonā.

***HFE* variantu noteikšana**

HFE gēna variantu: C282Y (c. 845G>A; p.Cys282Tyr) un H63D (c.187C>G; p.His63Asp) analīze tika veikta visiem VS pacientiem, kuriem VS tika molekulāri apstiprināta (identificēti divi patogēnie alēliskie varianti *ATP7B* gēnā), izmantojot *PCR-RFLP* (Mura, Raguens and Ferec, 1999; Garry et al., 1997).

**Gēna *ATP7B* eksonu praimeru secības, piesaistes temperatūras un
PCR produktu garumi *qPCR* veikšanai**

Ex. ¹	Praimeris 1 (5'- 3')	Praimeris 2 (5'- 3')	T. ² (°C)	G. ³ (bp)
16.	AGTCCCCCAGACCTTCT CTG	CGTGGTCTGTCATA GCGTCA	60	101
18.	TTTGCAGAGGTGCTGC CTT	CAATGGCCACACCC ATGTCT	63	136
19.	GATTTGCTGGATGTGG TGGC	TGCAATGGGTATCC CAACCA	63	111
2.	GTGGTCACCCTCCAAC TGAG	GAAGTGCCTCGATA GCCCTC	61	190

¹ – eksons; ² – praimeru piesaistes temperatūra; ³ – PCR produkta garums.

1.3. Vilsona slimības prevalences aprēķini

Lai aprēķinātu aptuveno VS prevalenci jaundzimušo kohortās, tika izmantota iepriekš aprakstīta metode (Reilly, Daly and Hutchinson, 1993). Molekulāri apstiprināto VS pacientu skaits (gan simptomātisko, gan asimptomātisko pacientu, kas tika atklāti ģimenes skrīningā) tika izdalīts ar jaundzimušo skaitu konkrētajā laika periodā (dati – no Latvijas Centrālās statistikas pārvaldes) (LCSP, n.d.). Apskatītais laika periods bija no 1964.–2012.gadam. Laika posms pirms 1964.gada netika iekļauts analizē, jo vara noteikšanas diennakts urīnā Latvijā ir pieejama no 1980.gada (dati iegūti, telefoniski sazinoties ar P.Stradiņa KUS apvienotās laboratorijas pārstāvjiem). Tā kā vidējais VS simptomu parādīšanās laiks ir apmēram 16 gadi (Coffey et al., 2013), tad kā pirmais atskaites punkts tika ņemts 1964. gads (1980 – 16 = 1964).

1.4. Datu statistiskā apstrāde

Datu statistiskā apstrāde tika veikta, izmantojot *IBM SPSSv22.0* un *PLINK 1.07* programmas.

Datu normālsadalījums tika pārbaudīts, izmantojot histogrammas un *Shapiro-Wilk* testu. Normāli sadalītu datu centrālās tendences tika raksturotas, izmantojot vidējās vērtības ar standartnovirzēm, savukārt dati, kas neatbilda normālam sadalījumam, tika raksturoti, izmantojot mediānās vērtības ar starpkvartīļu intervālu.

Lai izvērtētu pacientu genotipu saistību ar fenotipu, tika izmantoti *ANOVA* vai *Kruskal-Wallis* un *Chi-square* vai *Fisher's exact* testi nepārtrauktiem un kategoriskiem datiem, atbilstoši. *CP* un *COMMD1* gēnu alēļu izplatība pirms tālākas datu analīzes tik pārbaudīta pēc Hārdija–Veinberga līdzsvara. *CP* un *COMMD1* gēnu variantu asociācija ar Vilsona slimības fenotipu un *ATP7B* gēna genotipu tika analizēta pēc alēliskā, dominantā, recesīvā un genotipiskā iedzimšanas modeļa (tipa). Hipotēžu pārbaudei tika izmantots nozīmīguma līmenis $\alpha = 0,05$.

2. Rezultāti

2.1. Vilsona slimības prevalence jaundzimušo kohortās

Prevalences jaundzimušo kohortās aprēķinos tika iekļauti 59 pacienti, kuriem molekulāri apstiprināta VS, kā arī astoņi pacientu radnieki, kuri sākotnēji bija asimptomātiski. Laika posmā no 1964. līdz 2012. gadam Latvijā kopā bija 1 463 083 dzīvi dzimuši bērni (LCSP, n.d.). Aprēķins: 67 pacienti / 1 463 083 dzīvi dzimušie = 4,58 gadījumi uz 100 000 dzīvi dzimušo jeb 1 : 21 800.

2.2. Vilsona slimības pacientu raksturojums

Pētījumā tika izmantoti klīniskie un ģenētiskie dati no 64 pacientiem, kuriem klīniski un/vai molekulāri bija apstiprināta VS (pēc Leipcigas diagnostiskajiem kritērijiem – vismaz 4 punkti). Pētījumam tika izmantoti dati tikai no pirmā VS gadījuma ģimenē, radnieki pētījumā netika iekļauti. No klīniskajiem un laboratorajiem datiem VS pacientiem tika analizēti: pirmo simptomu veids; pirmo simptomu parādīšanās vecums; ceruloplazmīna daudzums asinīs (g/dl); vara daudzums diennakts urīnā (μg) – pirmais mērījums.

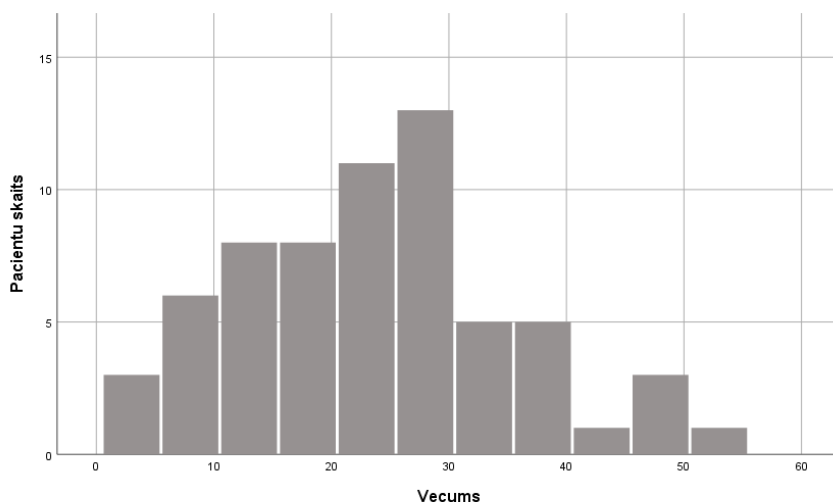
Vilsona slimības pacientu dzimums un pirmo simptomu parādīšanās vecums

Vīriešu: sievietu attiecība starp pētījuma dalībniekiem bija 1,13 : 1 (34 vīrieši : 30 sievietēm). VS pirmo simptomu izpaušanās vecums bija no trīs līdz 54 gadu vecumam, ar vidējo vecumu – 24,00 gadi (SD = 11,55 gadi), bet

visvairāk pacientu bija vecuma grupā no 25 līdz 30 gadiem. VS pacientu sadalījums pa vecumiem parādīts 2.1. attēlā.

VS pacientu pirmo simptomu raksturojums

Pēc pirmo VS klīnisko simptomu veida visi pacienti tika iedalīti trīs grupās: 1) hepatoloģiskie simptomi; 2) neiroloģiskie un/vai psihiatriskie simptomi; 3) jauktie (hepatoloģiski un neiroloģiski) un/vai psihiatriski simptomi. VS raksturīgais simptoms – Kaizera–Flaišera gredzens netika iekļauts analizē datu trūkuma dēļ.



2.1. attēls. Pacientu sadalījums pa vecumiem pirmo VS simptomu parādīšanās brīdī

Aknu slimība kā pirmā VS izpausme starp pacientiem izpaužas kā: hronisks hepatīts, aknu ciroze vai akūta aknu mazspēja (zibensveida hepatīts). Pie aknu slimības biežākās sūdzības bija: neskaidras sāpes vēderā, vēdera uzpūšanās, slikta dūša, dzelte, asiņošana no deguna, vēdera apjoma palielināšanās, pastiprināts nogurums, nespēks un/vai ādas nieze. Neiroloģiskie simptomi izpaužas kā: roku un/vai ķermeņa trīce, ataksija, kognitīvie un runas

traucējumi. Pie jauktajiem simptomiem novēroja hroniska hepatīta vai aknu cirozes kombināciju ar roku un/vai ķermeņa trīci, intelekta traucējumiem, dizartriju un disfāgiju. Diviem no pacientiem anamnēzē bija arī retākas pirmās izpausmes, kas ir aprakstītas literatūrā kā iespējamās VS pazīmes: vienai bija amenoreja, otrai – vēlīna grūtniecības pārtraukšanās, bet VS diagnosticēšanas brīdī abām jau bija vērojama arī aknu ciroze. VS pirmo izpausmju sadalījumu starp pacientiem skat. 2.1. tabulā.

2.1. tabula

Vilsons slimības pirmās izpausmes Latvijas pacientiem

VS pirmās izpausmes	Simptomi un/vai slimības nozoloģiskā forma	Pacientu skaits (absolūtos skaitļos)	Pacientu skaits kopā
Aknu slimība	Hronisks hepatīts	27	42
	Aknu ciroze	13	
	Akūta aknu mazspēja	2	
Neiroloģiskās un/vai psihiatriskās izpausmes	Roku un/vai ķermeņa trīce	12	17
	Dizartrijs + roku un/vai ķermeņa trīce	3	
	Halucinatori paranoīds sindroms	1	
	Ataksija + kognitīvi traucējumi	1	
Jaukti simptomi	Hronisks hepatīts + roku un/vai ķermeņa trīce	1	5
	Aknu ciroze + roku un/vai ķermeņa trīce	2	
	Aknu ciroze + intelekta traucējumi	1	
	Aknu ciroze + dizartrijs, disfāgija	1	

Pacientu pirmie klīniskie simptomi (pa simptomu grupām) tika salīdzināti ar: ceruloplazmīna līmeni asinīs; vara līmeni diennakts urīnā; dzimumu; pirmo simptomu sākšanās vecumu. Rezultātus skat. 2.2. tabulā.

Pirmo VS simptomu saistība ar citiem laboratoriskajiem un klīniskajiem rādītājiem

Klīniskie un bioķīmiskie rādītāji	Hepatoloģiskie (n = 42)	Neiroloģiskie un/vai psihiatriskie (n = 17)	Jauktie (n = 5)	p vērtība
Ceruloplazmīna līmenis asinīs, g/dL; mediāna, (IQR)	0,11 (0,08–0,13)	0,13 (0,08–0,15)	0,08 (0,07–0,15)	0,562
Vara līmenis dn urīnā, µg; mediāna (IQR*)	197 (136–373)	163 (96–268)	374 (365–384)	0,370
Vīrieši : sievietes; absolūtos skaitļos	19 : 23 (p = 0,09)	12 : 5 (p = 0,081)	3 : 2 (p = 0,192)	–
Simptomu parādīšanās vecums – gadi; vidējais (±SD**)	20,21 (± 9,10)	29,82 (± 13,25)	36,00 (± 8,75)	0,066

*IQR – starpkvartīļu amplitūda; **SD – standartnovirze

Pirmo simptomu saistība ar laboratorisko rādītāju izmaiņām netika atrastas. Tika novērots, ka neiroloģiskie simptomi (gan atsevišķi, gan kopā ar hepatoloģiskajiem simptomiem) parādās vēlāk, bet starp datiem nenovēroja statistiski nozīmīgas atšķirības ($p = 0,066$). Salīdzinot klīniskos simptomus starp dzimumiem, tika atrasta tendence, ka vīriešiem biežāk ir neiroloģiskie simptomi, savukārt, sievietēm – biežāk sastopami hepatoloģiskie simptomi, bet datiem nebija statistiski nozīmīgu atšķirību.

2.3. *ATP7B* gēna analīze

ATP7B gēna kodējošo daļu (eksonu) analīze

VS molekulāri tika apstiprināta 51 pacientam, kā arī viņu septiņiem pirmās pakāpes radniekiem, no kuriem 37 alēliskais vaiants bija homozigotiskā stāvoklī, bet 14 – kompaunda heterozigotiskā stāvoklī, pieciem pacientiem patogēns alēliskais variants tika atrasts heterozigotiskā stāvoklī, bet astoņiem pacientiem patogēnu alēlisko variantu identificēt neizdevās. Pacientu un viņu radnieku genotipus skat. 2.3. tabulā.

Vienam pacientam tika atrasts kompaunda heterozigotisks genotips ar diviem *ATP7B* gēna patogēnajiem alēliskajiem variantiem (p.Met769Hisfs*26; Gly869*), no kuriem viens rezultējas ar proteīna aminoskābju rāmja nobīdi, bet otrs ir terminējošs variants, kurš rezultējas ar pāragra stop kodona izveidi. Atrastais genotips ir vienīgais, kas satur divus patogēnos alēliskos variantus, no kuriem viens nav nesinonīma aminoskābju nomaiņa, tāpēc netika izmantots turpmākajā datu statistiskajā analīzē. Bet, analizējot minētā pacienta klīniskos rādītājus, pacientam VS pirmie simptomi parādījušies salīdzinoši vēlu – 32 gadu vecumā, ceruloplazmīna līmenis pirmajā mērījumā ir bijis ļoti zems – 0,043 g/dl (norma > 0,20 g/dl), vara izdale diennakts urīnā pēc D-penicilamīna proves – 2122 μg (norma < 70 μg), pacientam diagnosticēta dekompensēta aknu ciroze.

Kopā starp VS pacientiem tika atrasti 23 alēliskie varianti, no kuriem 15 tika identificēti kā slimību izraisīši. Labdabīgie varianti netika iekļauti tālākajā analīzē, jo netika noteikti pacientiem ar homozigotisku genotipu (p.[His1069Gln];[His1069Gln]. No visām pacientu *ATP7B* gēna alēlēm kā patogēnas vai iespējami patogēnas tika identificētas 83,59 %, bet 16,41 % alēļu palika neidentificētas. Analizējot alēļu sastopamības biežumus, tika atrasts, ka tikai trīs alēliskie varianti bija sastopami vairāk nekā vienam indivīdam:

c.3207C>A (p.His1069Gln); c.2304dupC (p.Met769Hisfs*26) un c.213_214del (p.Val73GlufsX4). Alēļu procentuālo sadalījumu skat. 2.4. tabulā.

2.3. tabula

Latvijas Vilsona slimības pacientu un viņu radnieku *ATP7B* gēna genotipi

Genotips pēc HGVS nomenklatūras*	Pacientu skaits	Radnieku skaits	Kopējais skaits
c.[3207C>A];[3207C>A]; p.[His1069Gln];[His1069Gln]	37	4	41
c.[3207C>A];[c.2304dupC]; p.[His1069Gln];[p.Met769Hisfs*26]	3	1	4
c.[213_214del];[c.1934T>G]; p.[Val73GlufsX4];[p.Met645Arg]	1	0	1
c.[3207C>A];[c.213_214del]; p.[His1069Gln];[p.Val73GlufsX4]	1	0	1
c.[3207C>A];[c.2293G>A]; p.[His1069Gln];[p.Asp765Asn]	1	0	1
c.[3207C>A];[c.2305A>G]; p.[His1069Gln];[p.Met769Val]	1	0	1
c.[3207C>A];[c.3402delC]; p.[His1069Gln];[p.Ala1135GlnfsX13]	1	0	1
c.[3207C>A];[c.3472_3482del]; p.[His1069Gln];[p.Gly1158Phefs*2]	1	2	3
c.[3207C>A];[c.3800A>G]; p.[His1069Gln];[p.Asn1267Gly]	1	0	1
c.[3207C>A];[c.3971A>C]; p.[His1069Gln];[p.Asn1324Thr]	1	0	1
c.[3207C>A]; [c.4106C>T]; p.[His1069Gln];[p.Ser1369Leu]	1	0	1
c.[2304dupC];[2605G>T]; p.[Met769Hisfs*26];[Gly869*]	1	0	0
c.[3649_3654del];[2817G>T]; p.[Val1217_Leu1218del];[p.Trp939Cys]	1	0	0
c.[3106G>A];[=]; p.[Val1036Ile];[=]	1	0	1
c.[3207C>A];[=]; p.[His1069Gln];[=]	4	1	5
c.[=];[=]; p. [=];[=]	8	0	8

*references secības: NM_000053.3 un NP_000044.2.

Alēliskie varianti *ATP7B* gēnā tika atrasti 12 (no 21) eksonos. Visbiežāk alēliskie varianti bija sastopami trīs eksonos: 14., 8. un 2, sastādot 76,56 % no atklātajiem variantiem. Variantam c.3620A>G (p.His1207Arg) 17. eksonā iepriekš aprakstītā patogenitāte tika vērtēta kā pretrunīga – tas ir aprakstīts gan kā patogēns (Abdelghaffar et al., 2008), gan kā labdabīgs (Loudianos et al., 1999), bet pēc *ACMG* kritērijiem minētais variants tiek klasificēts kā labdabīgs (patogēnie pierādījumi – P, labdabīguma pierādījumi – B):

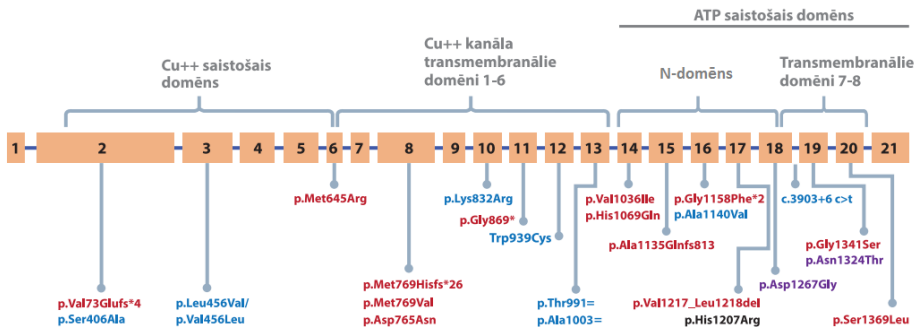
- 1) *PP2* (atbalstošs patogenitātes pierādījums) – nesinonīms variants gēnā, kurā labdabīgi nesinonīmi varianti ir reti sastopami, bet nesinonīmi varianti biežāk ir zināmi kā slimību izraisoši;
- 2) *BA1* (unikāls, lietojams kā atsevišķs labdabīguma pierādījums) – alēliskā varianta biežums populācijā ir > 5%; konkrētā varianta biežums *GnomAD* datubāzē – 0,148 (*GnomAD*, n.d.);
- 3) *BP4* (atbalstošs labdabīguma pierādījums) – vairāki skaitļošanas rīki – “DANN”, “EIGEN”, “MutationAssessor”, “PrimateAI” un “REVEL” šo variantu prognozē kā labdabīgu (*Varsom*, n.d.);
- 4) *BP6* (atbalstošs labdabīguma pierādījums) – vairākos avotos minētais variants tiek klasificēts kā labdabīgs – datubāzēs *ClinVar* (*BLAST*: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.) un *UniProt* (*Blastp* on *UNIPROTKB_HUMAN*, n.d.).

Pacientiem identificēto alēlisko variantu atrašanās vietu gēnā saistībā ar proteīna struktūru skat. 2.2. attēlā.

ATP7B gēna patogēno alēlisko variantu procentuālais sadalījums

Alēliskais variants*	ATP7B eksons	Alēļu skaits	% no alēlēm
c.3207C>A (p.His1069Gln)	14.	89	69,53
c.2304dupC (p.Met769Hisfs*26)	8.	4	3,13
c.213_214del (p.Val73GlufsX4)	2.	2	1,56
c.1934T>G (p.Met645Arg)	6.	1	0,78
c.3106G>A (p.Val1036Ile)	14.	1	0,78
c.2293G>A (p.Asp765Asn)	8.	1	0,78
c.2305A>G (p.Met769Val)	8.	1	0,78
c.3402delC (p.Ala1135GlnfsX13)	15.	1	0,78
c.3472_3482del (p.Gly1158Phefs*2)	16.	1	0,78
c.3800A>G (p.Asn1267Gly)	18.	1	0,78
c.3971A>C (p.Asn1324Thr)	19.	1	0,78
c.4106C>T (p.Ser1369Leu)	20.	1	0,78
c.2605G>T (p.Gly869*)	11.	1	0,78
c.3649_3654del (p.Val1217_Leu1218del)	17.	1	0,78
c.2817G>T (p.Trp939Cys)	12.	1	0,78
Neidentificēts	-	21	16,41

*References secības: NM_000053.3 un NP_000044.2.

**2.2. attēls. ATP7B gēna alēlisko variantu atbilstība proteīna strukturai**

Ar sarkanu atzīmēti patogēnie varianti; ar zilu – nepatogēnie; ar melnu – variants ar pretrunīgi aprakstītu patogenitāti; ar violetu – jauni, iepriekš neaprakstīti, patogēni varianti.

Lielākā daļa no alēliskajiem variantiem ir iepriekš aprakstīti literatūrā, bet divi no atrastajiem variantiem – c.3800A>G (p.Asp1267Gly) 18. eksonā un c.3971A>C (p.Asn1324Thr) 19. eksonā nav iepriekš aprakstīti. Abu iepriekš minēto alēlisko variantu patogenitātes pārbaudei tika izmantotas *ACMG* jaunu sekvences variantu interpretācijas vadlīnijas (Richards et al., 2015). Pie patogenitātes kritērijiem tika izmantotas četras patogenitātes paredzēšanas (prognozēšanas) programmas: *Polyphen-2*, *SIFT*, *Mutation Taster* un *Panther software*, kas uzrādīja abu minētos variantus kā iespējami patogēnus vai slimību izraisošus (skat. 2.5. tabulu).

2.5. tabula

Alēlisko variantu kaitīguma pārbaudes rezultāti

Alēliskais variants (pēc HGVS nomenklatūras)		Alēliskā varianta kaitīguma paredzēšanas rīki			
Reference: NM_000053.3	Reference: NP_000044.2	<i>Polyphen-2</i>	<i>Mutation Taster</i>	<i>SIFT</i>	<i>Panther software</i>
		Prognoze	Prognoze	Prognoze	Prognoze
c.3800A>G	p.Asp1267Gly	Iespējams, patogēns	Slimību izraisošs	Patogēns	Iespējams, patogēns
c.3971A>C	p.Asn1324Thr	Iespējams, patogēns	Slimību izraisošs	Patogēns	Iespējams, patogēns

Abi jaunie varianti tika pārbaudīti arī kontroles grupai. Neaprašstītais variants 18. eksonā tika atrasts vienā kontroles grupas alēlē (ar retāk sastopamās alēles biežumu – 0,005), kas neatšķīrās no alēles biežuma pacientu grupā ($p > 0,05$). Savukārt 19. eksona alēliskais variants netika atrasts nevienam no kontroles grupas. Alēlisko variantu patogenitātes pārbaudes rezultātus skat. 2.6. un 2.7. tabulā.

Neaprašūtā *ATP7B* gēna alēliskā varianta (c.3800A>G; p.Asp1267Gly) patogenitātes raksturojums pēc ACMG vadlīnijām

Patogenitātes pierādījums (piezīme)	Patogenitātes pierādījuma paskaidrojums	
PS4 (pierādījums neizpildās)	Biežums VS pacientu grupā	Biežums kontroles grupā
	0,0078	0,0037
	P = 0,5163; OR = 2,2990	
PM1 (pierādījums izpildās)	Variants izmaina proteīna metālu saistošo domēnu (“Blastp on UNIPROT_KB_HUMAN” n.d.)	
PM2 (pierādījums izpildās)	Konkrētais variants netika atrasts <i>1000 genome project</i> datubāzē (“Chr13: 52.51M-52.51M - 1000 Genomes Browser” n.d.)	
PM5 (pierādījums izpildās)	Atrasti patogēni varianti VS datubāzē (“Home Page” n.d.): c.3800A>C (p.Asp1267Ala) un c.3800A>T (p.Asp1267Val)	
PP3 (pierādījums izpildās)	Četri kaifīguma paredzēšanas rīki atzīst variantu kā iespējami patogēnu vai slimību izraisīšu (skat. 4.5. tabulu)	
PP4 (pierādījums izpildās)	Pacientam ir VS raksturīgie klīniskie simptomi, un ir atklāts arī patogēnais variants p.H1069Q	
Slēdzieni: 3 vidēji kritēriji (PM1+PM2+PM5) + 2 atbalstoši (PP3+PP4) = visdrīzāk, patogēns (likely pathogenic)		

***ATP7B* gēna promotera analīze**

Analizējot *ATP7B* gēna promoteru, tika atrasti pieci alēliskie varianti: rs28362532, rs9563084, rs145371060, rs749629764 un rs1055659322, no kuriem neviens nav patogēns.

ATP7B* gēna pārbaude ar *MLPA

Veicot *MLPA* visiem pacientiem, kuriem līdz tam nebija identificēti divi patogēnie *ATP7B* gēna alēliskie varianti, tika iegūti rezultāti ar aizdomām par *ATP7B* gēna 16.eksna kopiju skaita izmaiņām (duplikāciju) vienam pacientam (relatīvā fluorescētā signāla koeficients = 1,31), kā arī par 18. un 19. eksna kopiju skaita izmaiņām (duplikāciju) citam pacientam (relatīvā fluorescētā signāla koeficients = 1,34). Iegūtie rezultāti tika pārbaudīti, izmantojot *qPCR*.

Neaprakstītā *ATP7B* gēna alēliskā varianta (c.3971A>C; p.Asn1324Thr) patogenitātes raksturojums pēc ACMG vadlīnijām

Patogenitātes pierādījums (piezīme)	Patogenitātes pierādījuma paskaidrojums
PS4 (pierādījums neizpildās)	Biežums VS pacientu grupā 0,0078 P = 0,2038; OR = nedefinēts
PM1 (pierādījums izpildās)	Variants izmaina proteīna transmembranozo domēnu (“Blastp on UNIPROT_KB_HUMAN” n.d.)
PM2 (pierādījums izpildās)	Konkrētais variants netika atrasts <i>Exome Aggregation Consortium</i> datubāzē, bet tur ir cits variants šajā pašā pozīcijā – c.3971A>G (p.Asn1324Ser) – rs760285767, ar retākās alēles biežumu 0,000008 (“Reference SNP (RefSNP) Cluster Report: Rs760285767” n.d.)
PP3 (pierādījums izpildās)	Četri kaitīguma paredzēšanas rīki atzīst variantu kā iespējami patogēnu vai slimību izraisošu (skat. 4.5. tabulu)
PP4 (pierādījums izpildās)	Pacientam ir VS raksturīgie klīniskie simptomi, un ir atklāts arī patogēnais variants p.H1069Q
Slēdziens: 2 vidēji kritēriji (PM1+PM2) + 2 atbalstoši (PP3+PP4) = visdrīzāk, patogēns (likely pathogenic)	

***ATP7B* gēna pārbaude ar qPCR**

Veicot qPCR iepriekšējā punktā minētajiem diviem pacientiem, dati par *ATP7B* gēna 16., 18. un 19.eksna kopiju skaita izmaiņām neapstiprinājās.

***ATP7B* gēna alēlisko variantu saistība ar VS fenotipu**

Lai izvērtētu *ATP7B* gēna alēlisko variantu saistību ar fenotipu, varianti tika iedalīti divās grupās: “vieglie” (V) jeb aminoskābes nomainīšanas varianti (nesinonīmā viena nukleotīda nomainīšana) un “nopietnie” (N), kas ietvēra gan terminējošo variantu (ar STOP kodona izveidi), gan rāmja nobīdes variantus. Abi variantu veidi tika salīdzināti ar VS klīniskajām izpausmēm un laboratoriskajiem rādītājiem. Sīkāk rezultātus skat. 2.8. tabulā.

***ATP7B* gēna alēlisko variantu saistība ar VS klīniskajiem simptomiem un laboratoriskajiem rādītājiem**

Klīniskie un bioķīmiskie rādītāji	<i>ATP7B</i> genotips*		p vērtība
	V/V* (n = 49)	V/S** vai S/S*** (n = 9)	
Kopējais biežums; absolūtais skaits (%)	42 (82,35%)	9 (17,65%)	nav noteikta
Ceruloplazmīna līmenis asinīs, g/dL (mediāna (<i>IQR</i>))	0,11 (0,08 – 0,14)	0,068 (0,02 – 0,10)	0,015
Vara līmenis dn urīnā, μg (mediāna (<i>IQR</i> *))	264 (160 – 389)	156 (94 – 438)	0,332
Pirmo simptomu parādīšanās vecums (gadi ± SD)	24,24 (±11,20)	18,11 ±7,36)	0,101
Hepatoloģiskie simptomi, absolūtais skaits (%)	30 (58,82%)	8 (15,69%)	0,571
Neiroloģiskie simptomi, absolūtais skaits (%)	7 (13,73%)	1 (1,96%)	0,417
Jauktie simptomi, absolūtais skaits (%)	5 (9,80%)	0 (0%)	0,206

*V/V – aminoskābes nomaīņa/ aminoskābes nomaīņa; **V/S – aminoskābes nomaīņa / terminējošs vai rāmja nobīdes variants; ***S/S – terminējošs vai rāmja nobīdes variants / terminējošs vai rāmja nobīdes variants

Salīdzinot viena nukleotīda nomaīņu ar terminējošu vai rāmja nobīdes variantu, statistiski nozīmīga atšķirība tika atrasta starp *ATP7B* gēna genotipu un ceruloplazmīna līmeni asinīs – ceruloplazmīna līmenis asinīs bija vairāk samazināts pie terminējoša varianta kombinācijas ar rāmja nobīdes alēlisko variantu. Salīdzinot H1069Q alēliskā varianta klātbūtni genotipā ar citiem variantiem, statistiski nozīmīga atšķirība tika atrasta starp vairāk samazinātu ceruloplazmīna līmeni asinīs un ne-H1069Q alēliskā variantu genotipā (skat. 2.9. tabulu).

***ATP7B* gēna alēlisko variantu (pēc H1069Q klātbūtnes) asociācija ar VS klīniskajiem simptomiem un laboratoriskajiem rādītājiem**

Klīniskie un bioķīmiskie rādītāji	<i>ATP7B</i> genotips*		p vērtība
	H1069Q/H1069Q (n=36)	H1069Q/cits variants (n=12) vai cits variants/cits variants (n=3)	
Kopējais biežums; absolūtais skaits (%)	36 (70,59%)	12 (23,53%)	–
Ceruloplazmīna līmenis asinīs, g/dL (mediāna, <i>IQR</i>)	0,107 (0,080–0,135)	0,080 (0,070–0,110)	0,003
Vara līmenis dn urīnā, µg (mediāna, <i>IQR</i> *)	268 (161–470)	188 (125– 85)	0,263
Pirmo simptomu parādīšanās vecums (gadi ± SD)	24,889 (±10,980)	19,000 (±9,502)	0,064
Hepatoloģiskie simptomi, n (%)	26 (68,42%)	12 (31,58%)	0,488
Neiroloģiskie simptomi, n (%)	7 (87,50%)	1 (12,50%)	0,569
Jauktie simptomi, n (%)	3 (60,00%)	2 (40,00%)	0,654

2.4. *ATOX1* gēna analīze

Analizējot *ATOX1* gēna kodējošās daļas un tām blakus esošos nekodējošos rajonus (eksonu – intronu robežas), četriem pacientiem tika atrasts viens alēliskais variants – rs571657964 (NM_004045.3:c.7-15delC) heterozigotiskā stāvoklī (MAF pacientiem = 0,023; MAF igauņu populācijā = 0,012 (NCBI, n.d.). Minētais alēliskais variants atrodas gēna nekodējošā daļā – 2. intronā, 15 nukleotīdus aiz 2. eksona beigām (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.). Analizējot variantu brīvpieejas programmā *Human Splicing Finder* (Human Splicing Finder - Version 3.1, n.d.), kurā

iespējams atrast alēlisko variantu iespējamo ietekmi uz splaisingu, tika secināts, ka alēliskajam variantam nav ietekmes uz splaisingu. Ņemot vērā visu iepriekš minēto, alēliskais variants netika iekļauts tālākajā statistiskajā analizē, jo tam ar lielāko varbūtību nav ietekmes uz *ATOXI* gēna ekspresiju.

2.5. *COMMD1* gēna analīze

Analizējot *COMMD1* gēna kodējošās daļas, tika identificēti trīs alēliskie varianti: rs569267407, rs55677935 un rs9096. Tālāk tika salīdzināta atrasto *COMMD1* gēna alēlisko variantu biežums šajā pētījumā ar *GnomAD* datu bāzi (GnomAD, n.d.). Rezultātus skat. 2.10. tabulā.

2.10. tabula

COMMD1 gēnā atrastie varianti VS pacientiem

Variants	NM_152516.3	NP_689729.1	Atrašanās vieta <i>COMMD1</i>	<i>MAF</i> *	<i>MAF</i> **	P vērtība
rs569267407	c.-68_67 del TT	-	1.introns	0,0088	0,0020	0,1469
rs55677935	c.358 C>T	p.Arg120Trp	2.eksons	0,0440	0,0215	0,1553
rs9096	c.492 C>T	p.Asp164=	3.eksons	0,0968	0,1263	0,3247

MAF* – retāk sastopamās alēles biežums šajā pētījumā; *MAF* – retāk sastopamās alēles biežums *GnomAD* – eiropiešu (nesomu) populācijā) (GnomAD, n.d.)

Visu trīs gēna *COMMD1* variantu retās alēles biežumi statistiski nozīmīgi neatšķīrās no *GnomAD* datubāzē minētajiem biežumiem. Tā kā variants rs569267407 atrodas gēna nekodējošā daļā – intronā, tika pārbaudīta tā iespējamā ietekme uz gēna splaisingu (izmantojot programmu *Human Splicing Finder*) (Human Splicing Finder - Version 3.1, n.d.). Tā kā ietekme neapstiprinājās, variants netika tālāk analizēts. Abi atlikušie divi varianti tika pārbaudīti, vai atbilst Hārdija–Veinberga līdzsvaram. Tā kā pie visiem

variantiem p vērtība bija $> 0,005$, tad to sadalījums atbilst Hārdija–Veinberga līdzsvaram (p vērtības un genotipu sadalījumus skat. 2.11. tabulā).

2.11. tabula

COMMD1 gēna alēlisko variantu atbilstība Hārdija-Veinberga līdzsvaram VS pacientiem

Variants	Alēles	Genotipi	p vērtība
rs55677935	C/T	1/3/58 (TT/TC/CC)	0,0803
rs9096	T/C	1/10/51 (CC/CT/TT)	0,4444

Tālāk tika salīdzināti alēlisko variantu vai genotipu biežumi (pēc dažādiem iedzimšanas modeļiem) pret VS pacientu pirmajiem klīniskajiem simptomiem (ņemot vērā tikai tos pacientus, kuriem VS bija molekulāri apstiprināta, $n = 49$) un *ATP7B* gēna genotipa (ņemot vērā visus pacientus ar klīniski apstiprinātu VS vai aizdomām par to, $n = 62$). Salīdzinājumu skat. 2.12. tabulā.

Starp alēļu un genotipu biežumiem un VS pirmajām klīniskajām izpausmēm netika atrastas statistiski nozīmīgas atšķirības. Salīdzinot abu variantu sastopamības biežumus (pēc dominantā iedzimšanas modeļa) un pirmo simptomu parādīšanās vecumu, netika novērotas atšķirības (rs9096 – $p = 0,112$; rs55677935 – $p = 0,146$).

**COMMD1 gēna alēlisko variantu saistība ar VS fenotipu un ATP7B
genotipu**

Variants	A1 *	A2 **	Modelis	Neiroloģiskie simptomi n=7	Hepato- loģiskie simptomi n=42	p vērtība
rs 55677935	C	T	Genotipu (TT/TC/C C)	0/0/7	1/2/39	0,9999
	C	T	Alēliskais (T/C)	0/14	4/80	0,9999
	C	T	Dominant ais (TT + TC/CC)	0/7	3/39	0,9999
	C	T	Recesīvais (TT/TC + CC)	0/7	1/41	0,9999
rs 9096	T	C	Genotipu (CC/CT/T T)	0/1/6	1/6/35	0,9999
	T	C	Alēliskais (C/T)	1/13	8/76	0,9999
	T	C	Dominant ais (CC+CT/ TT)	1/6	7/35	0,9999
	T	C	Recesīvais (CC/CT+ TT)	0/7	1/41	0,9999
rs 55677935	T	C	Genotipu (TT/TC/C C)	0/1/12	1/2/46	0,6202
	T	C	Alēliskais (T/C)	1/25	4/94	0,9999
	T	C	Dominant ais (TT + TC/CC)	1/12	3/46	0,9999
	T	C	Recesīvais (TT/TC + CC)	0/13	1/48	0,9999

2.12. tabulas nobeigums

Variants	A1 *	A2 **	Modelis	Ne-VS*** n=13	VS**** n=49	p vērtība
rs 9096	C	T	Genotipu (CC/CT/TT)	0/3/10	1/7/41	0,5510
	C	T	Alēliskais (C/T)	3/23	9/89	0,7142
	C	T	Dominantais (CC+CT/TT)	3/10	8/41	0,6847
	C	T	Recesīvais (CC/CT+TT)	0/13	1/48	0,999

* – alēle 1; ** – alēle 2; ***Ne-VS – pacienti, kuru *ATP7B* gēna genotipā netika atrasti divi patogēnie varianti; ****VS – pacienti, kuru *ATP7B* gēna genotipā tika atrasti divi patogēnie varianti

2.6. *CP* gēna analīze

Analizējot *CP* gēna nekodējošās daļas (promoteru), tika meklēti septiņi alēliskie varianti: rs66508328, rs67870152, rs16861642, rs73020328, rs73166855, rs66953613 un rs11708215. Visi varianti tika pārbaudīti, vai atbilst Hārdija–Veinberga līdzsvaram. Tā kā pie visiem variantiem p vērtība bija $> 0,005$, tad to sadalījums atbilst Hārdija–Veinberga līdzsvaram (p vērtības un genotipu sadalījumus skat. 2.13. tabulā). Tā kā pirmie seši no minētajiem variantiem pārmantojas kopā, un starp to alēļu biežumiem netika novērotas atšķirības (alēļu biežumus skat. 2.13. tabulā), tad analīzei tika izvēlēts viens no tiem – rs66508328, kā arī rs11708215, kuru biežums atšķīrās no pārējiem minētajiem variantiem.

Vilsona slimības pacientiem identificēto CP gēna promotera alēlisko variantu raksturojums

Variants	Alēles	MAF*	MAF**	P vērtība	Genotipi	P vērtība
rs66508328	G>A	0,0902	0,1068	0,5500	2/7/52 (AA/AG/GG)	0,0608
rs11708215	A>G	0,175	0,2078	0,3771	2/17/41 (GG/GA/AA)	0,9999
rs67870152	C>T	0,0902	0,1069	0,5541	2/7/52 (TT/TC/CC)	0,0608
rs16861642	G>A	0,0902	0,1071	0,5485	2/7/52 (AA/AG/GG)	0,0608
rs73020328	C>T	0,0902	0,1072	0,5430	2/7/52 (TT/TC/CC)	0,0608
rs73166855	G>A	0,0902	0,1070	0,5485	2/7/52 (AA/AG/GG)	0,0608
rs66953613	T>G	0,0902	0,1069	0,5485	2/7/52 (GG/GT/TT)	0,0608

*MAF – retāk sastopamās alēles biežums šajā pētījumā; **MAF – retāk sastopamās alēles biežums *GnomAD* – eiropiešu (ne-somu) populācijā) (“GnomAD” n.d.)

Neviens no variantiem starp VS pacientiem statistiski nozīmīgi neatšķīrās no *GnomAD* datubāzē aprakstītajiem. Tālāk tika salīdzināti alēļu un genotipu biežumi (pēc dažādiem iedzimšanas modeļiem) attiecībā pret VS pacientu pirmajiem simptomiem (ņemot vērā tikai tos pacientus, kuriem VS bija molekulāri apstiprināta) un *ATP7B* gēna genotipa. Salīdzinājumu skat. 2.14. tabulā.

Starp alēļu biežumiem un VS pirmajām klīniskajām izpausmēm netika atrastas statistiski nozīmīgas atšķirības. Tika atrastas statistiski nozīmīgas atšķirības starp abiem analizētajiem variantiem un *ATP7B* genotipu – rs66508328 varianta AA genotips un rs11708215 varianta GG genotips (abi – pēc recesīvā iedzimšanas modeļa) biežāk bija sastopami starp pacientiem, kuriem VS nebija apstiprināta pēc *ATP7B* gēna genotipa.

CP gēna promotera alēlisko variantu saistība ar VS fenotipu un *ATP7B* genotipu

Variants	A1 *	A2 **	Modelis	Neiroloģiskie simptomi n = 8	Hepatoloģiskie simptomi n = 41	p vērtība
rs66508328	A	G	Genotipu (AA/AG/GG)	0/1/7	0/6/35	0,9999
	A	G	Alēliskais (A/G)	1/15	6/76	0,9999
	A	G	Dominantais (AA+AG/GG)	1/7	6/35	0,9999
	A	G	Recesīvais (AA/AG+GG)	0/8	0/41	0,9999
rs11708215	G	A	Genotipu (GG/GA/AA)	0/2/6	0/15/25	0,6938
	G	A	Alēliskais (G/A)	2/14	15/65	0,4998
	G	A	Dominantais (GG+GA/AA)	2/6	15/25	0,7290
	G	A	Recesīvais (GG/GA+AA)	0/8	0/40	0,6938
				Ne-VS*** n = 12	VS**** n = 49	
rs66508328	A	G	Genotipu (AA/AG/GG)	2/0/10	0/7/42	0,0289
	A	G	Alēliskais (A/G)	4/20	7/91	0,2240
	A	G	Dominantais (AA+AG/GG)	2/10	7/42	0,9999
	A	G	Recesīvais (AA/AG+GG)	2/10	0/49	0,0361
rs11708215	G	A	Genotipu (GG/GA/AA)	2/0/10	0/17/31	0,0016
	G	A	Alēliskais (G/A)	4/20	17/79	0,9999
	G	A	Dominantais (GG+GA/AA)	2/10	17/31	0,3059
	G	A	Recesīvais (GG/GA+AA)	2/10	0/48	0,0373

** – alēle 1; ** – alēle 2; ***Ne-VS – pacienti, kuru *ATP7B* gēna genotipā netika atrasti divi patogēnie varianti; ****VS – pacienti, kuru *ATP7B* gēna genotipā tika atrasti divi patogēnie varianti

2.7. *HFE* gēna variantu pārbaude

HFE gēnā tika analizēti divi patogēnie varianti: C282Y un H63D. Genotipu sadalījumu skat. 2.15. tabulā.

2.15. tabula

HFE genotipu sadalījums VS pacientiem atkarībā no pirmajiem slimības izpausmes simptomiem

Genotips pēc <i>HFE</i> variantiem	VS pirmās izpausmes (n = 61)			
	Hepatoloģiskie	Neiroloģiskie	Jauktie	Kopā
C282Y/C282Y	1	0	0	1
C282Y/H63D	1	0	0	1
C282Y/N	3	0	0	3
H63D/N	17	1	1	19
N/N	20	13	4	37

N – savvaļas tipa alēle *HFE* gēnā attiecībā uz C282Y un H63D variantiem

Analizējot *HFE* gēna biežākos patogēnos variantus VS pacientiem, diviem pacientiem tika atrasts *HFE* genotipi, kuri molekulāri apstiprina hereditārās hemohromatozes diagnozi. Viens no pacientiem bija vīrietis, kuram VS diagnosticēta 35 gadu vecumam un izpaudās ar hronisku hepatītu, bet otra paciente bija sieviete, kurai VS diagnosticēta 25 gadu vecumā ar aknu cirozes pazīmēm. Abiem pacientiem bija ekstremāli samazināts seruma ceruloplazmīns – vīrietim attiecīgi 0,054 g/L, bet sievietei – 0,089 g/L (pie normas – > 0,2 g/L).

Veicot klīnisko un bioķīmisko datu salīdzināšanu ar *HFE* gēna genotipiem, statistiski nozīmīgas atšķirības netika atrastas (rezultātus skat. 2.16. tabulā).

VS pacientu pirmo simptomu parādīšanās vecuma un seruma ceruloplazmīna līmeņa saistība ar *HFE* genotipu

Dzimums	<i>HFE</i> genotips	Rādītājs	Simptomu parādīšanās vecums	Ceruloplazmīns serumā (g/L)
Vīrieši	N/N (n = 12)	Vidējais aritmētiskais	21,67	0,11
		Standarta novirze (SD)	10,72	0,05
	Patogēnais alēliskais variants /N (n = 7)	Vidējais aritmētiskais	23,71	0,11
		Standarta novirze (SD)	15,41	0,04
	Patogēnais alēliskais variants/ patogēnais alēliskais variants (n = 1)	Vidējais aritmētiskais	35,00	0,05
		Standarta novirze (SD)	-	-
		p vērtība	0,596	0,512
Sievietes	N/N (n = 13)	Vidējais aritmētiskais	22,31	0,09
		Standarta novirze (SD)	9,30	0,05
	Patogēnais alēliskais variants /N (n = 11)	Vidējais aritmētiskais	17,82	0,12
		Standarta novirze (SD)	7,73	0,04
	Patogēnais alēliskais variants/ patogēnais alēliskais variants (n = 1)	Vidējais aritmētiskais	24,00	0,09
		Standarta novirze (SD)	-	-
		p vērtība	0,421	0,367

N – savvaļas tipa alēle *HFE* gēnā attiecībā uz C282Y un H63D variantiem

3. Diskusija

Darba mērķis bija izpētīt VS raksturojošos ģenētiskos faktoros, kā arī noteikt to asociāciju ar slimības klīniskajām izpausmēm. Darba rezultāti liecina, ka VS Latvijā ir sastopama salīdzinoši bieži, to izraisa dažādi *ATP7B* gēna patogēnie alēliskie varianti, bet, lielākoties, netiek novērota fenotipa/genotipa saistība, kas liecina, ka, VS klīnisko simptomu un laboratorisko izmeklējumu variabilitāti varētu ietekmēt citu gēnu alēliskie varianti, bet šajā pētījumā minētā hipotēze neapstiprinājās.

Vilsona slimības prevalence jaundzimšo kohortās Latvijā ir apmēram 1 : 21 800 dzīvi dzimušajiem. Jāņem vērā, ka prevalences aprēķins ir aptuvenš, jo šī pētījuma jaunākais pacients ir dzimis 2012. gadā. Ņemot vērā, ka vidējais VS pirmo simptomu izpaušanās vecums ir 16 gadi (Coffey et al., 2013), tad minētajā periodā dzimušie bērni ar VS potenciāli vēl ir asimptomātiski un nediagnosticēti, kas liecina, ka prevalence varētu būt vēl lielāka. Literatūrā VS prevalence variē dažādās populācijās. Tas svārstās no 1 : 7 000 līdz 1 : 100 000, bet visbiežāk citētā VS prevalence ir 1 : 30 000 (Czlonkowska et al., 2018). Gadiem ejot, VS prevalence, lielākoties, palielinās, ko varētu skaidrot ar mūsdienās pieaugušo ģenētisko testu pieejamību un klīnisko ārstu lielāku izglītību par ģenētiskajām slimībām, t. sk. Vilsona slimību (Czlonkowska et al., 2018). Latvijā VS prevalence ir biežāka nekā 1 : 30 000, kas liecina, ka Latvijā VS diagnostika ir labā līmenī. 2013. gada pētījumā *Coffey* Lielbritānijā VS divu patogēno alēlisko variantu nesēju skaits tika noteikts kā 1 : 7000 (Coffey et al., 2013). Minētajā pētījumā VS patogēnie varianti tika meklēti 1000 veselīgiem indivīdiem, sekvenējot *ATP7B* gēnu. Latvijas VS pacienti tika diagnosticēti sākotnēji pēc klīniskajiem simptomiem vai tikai molekulāri starp pacientu radiniekiem, tāpēc biežumu nesakritības varētu izraisīt:

1) VS nepietiekama atpazīšana pēc klīniskajiem simptomiem; 2) VS patogēno alēlisko variantu nepilnīga penetrance; 3) dažāds VS simptomu parādīšanās vecums (Czlonkowska, Gromadzka and Chabik 2009; Czlonkowska, Rodo and Gromadzka 2008).

Latvijas pacientiem VS visbiežāk manifestējās vecumā no 25 līdz 30 gadiem, ar vidējo vecumu – 24,00 gadi (SD = 11,55 gadi), turklāt jaunākais pacients Latvijā diagnosticēšanas brīdī bija trīs gadus vecs, bet vecākais – 54 gadus vecs. Vecumu sadalījums Latvijas pacientiem atbilst literatūrā aprakstītajam – lielākā daļā gadījumu pirmie VS simptomi parādās vecumā no pieciem līdz 35 gadiem. Jaunākais aprakstītais pacients ar izmainītām aknu funkcijām Vilsona slimības dēļ bija astoņus mēnešus vecs (Abuduxikuer et al., 2015). Apmēram 3 % pacientu simptomi parādās pēc 40 gadu vecuma (Ferenci et al., 2007), bet vecākajiem pacientiem pirmie simptomi parādījās viņu dzīves astotajā dekādē (Ala et al., 2005).

Vilsona slimība var izpausties jebkurā vecumā, un var tikt apsvērta jebkurai pacientam ar neskaidru aknu vai neiroloģisku slimību.

Lielākoties, VS var diagnosticēt simptomātiski un klīniski, bet molekulārā diagnostika var būt ārkārtīgi nozīmīga, lai atklātu asimptomātiskos VS pacientus, īpaši starp radniekiem, tādēļ ir svarīgi atklāt biežākos alēliskos variantus konkrētās populācijās, lai atvieglotu VS diagnostiku. Biežākais patogēnais *ATP7B* gēna alēliskais variants Eiropā ir H1069Q (c.3207C>A, p.His1069Gln), kura biežums variē dažādās populācijās – no 15 % (Francijā) līdz 72 % Polijā (Gomes and Dedoussis, 2016). Šajā pētījumā visbiežākais alēliskais variants arī bija c.3207C>A (p.His1069Gln), atklāts 69,53 % alēļu, kas atbilst iepriekš aprakstītajam biežumam lielākajā daļā Eiropas populāciju, t. sk. Poliju (72 %). *Kucinskas* aprakstīja ļoti lielu šī varianta biežumu Lietuvā – 92,3 % (Kucinskas et al., 2008), bet pētījumā bija iekļauti tikai 13 pacienti, kas varētu dot nepatiesus rezultātus. Citi patogēnie varianti šajā pētījumā bija

sastopami daudz retāk – tikai trīs varianti bija sastopami biežāk nekā vienam indivīdam: *ATP7B* gēna 2., 8. un 16. eksonā (c.2304dupC (p.Met769Hisfs*26); c.213_214del (p.Val73Glufs*4) un c.3472_3482del (p.Gly1158Phefs*2)), no kuriem pēdējais gan bija sastopams trīs sibiem. Viss iepriekš minētais liecina par lielu alēļu heterogenitāti Latvijas populācijas VS pacientiem. Alēliskie varianti *ATP7B* gēnā tika atrasti 12 no 21 eksona. Visbiežāk alēliskie varianti bija sastopami trīs eksonos: 14., 8. un 2., sastādot 76,56 % no atklātajiem variantiem. Šie dati liecina, ka minētie trīs eksoni būtu jāpārbauda vispirms, analizējot jaunus VS gadījumus Latvijā. Bet, ņemot vērā lielo alēļu heterogenitāti, neatrodot biežāko variantu (H1069Q), ekonomiski izdevīgāk un racionālāk būtu sekvenēt visus pārējos gēna eksonus.

Lielākā daļa no atrastajiem variantiem ir aprakstīti iepriekš. Piemēram, 16.eksonā esošais variants (c.3472_3482del; p.Gly1158Phefs*2) ir aprakstīts tikai divās populācijās – poļiem (Gromadzka et al., 2005) un lietuviešiem (Kucinskas et al., 2008).

Divi varianti, kas tika atrasti šajā pētījumā, nebija aprakstīti iepriekš: c.3800A>G (p.Asp1267Gly) un c.3971A>C (p.Asn1324Thr), bet, izmantojot *ACMG* jaunu sekvences variantu interpretācijas vadlīnijas (Richards et al., 2015), tika pierādīts, ka abi varianti ir “visticamāk, patogēni”, tādēļ tie tika iekļauti tālākajā analīzē.

Variantam c.3620A>G (p.His1207Arg) 17. eksonā iepriekš aprakstītā patogenitāte tika vērtēta kā pretrunīga – tas ir aprakstīts gan kā patogēns (Abdelghaffar et al., 2008), gan kā labdabīgs (Loudianos et al., 1999), bet 2017.gada augustā tika papildināta datubāze *ClinVar*, un minētais variants atzīts kā “labdabīgs / visticamāk, labdabīgs” (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.), tādēļ tas netika iekļauts tālākajā datu apstrādē un analīzē.

No visām pacientu *ATP7B* gēna alēlēm kā patogēnas vai iespējami patogēnas tika identificētas 83,59 %, bet 16,41 % alēļu palika neidentificētas,

tādēļ pētījumā tika iekļauta arī *ATP7B* gēna nekodējošā rajona – promotera analīze, kā arī iespējamās lielas (vairāku eksonu) duplikācijas vai delēcijas tika meklētas, izmantojot *MLPA* metodi. Diemžēl pēdējās divas no minētajām metodēm neuzlaboja identificēto alēļu biežumu. Neatklāto alēlisko variantu iemesli varētu būt dažādi: 1) iespējami alēliskie varianti dziļi intronos vai 3'UTR (3' netranslējamā rajonā), kas netika iekļauti šajā pētījumā; 2) VS ir izraisījis kāds neparasts mutāciju mehānisms, piem., hromosomu translokācijas vai citas hromosomu strukturālas aberācijas, kas ietver *ATP7B* gēnu; 3) “alēļu izkrišana” jeb t. s. *allelic dropout* – labdabīgi alēliskie varianti praimeru piesaistes vietās, kas neļauj pavairot konkrēto gēna kopiju, tādēļ ar tiešo sekvenēšanu var nolasīt tikai vienu gēna kopiju (mantotu no viena no vecākiem) (Stevens et al. 2017); 4) VS līdzīgu fenotipu varētu izraisīt izmaiņas citos gēnos; 5) Cita slimība, kas klīniski tiek interpretēta kā VS. Pirmie divi no minētajiem punktiem gan ir ļoti maz ticami, jo *Coffey* savā pētījumā identificēja 98 % alēļu no klīniski apstiprinātiem VS pacientiem, un secināja, ka “varbūtība, ka VS izraisa alēliskie varianti citos gēnos, ir ļoti maza” (Coffey et al., 2013). Citos pētījumos gan atklāto alēļu biežumi atšķiras: *Beom H. Lee* ziņojuši par 84,6 % atklātajām alēlēm lielā Korejas VS pacientu pētījumā (izmantojot gan tiešo sekvenēšanu, gan *MLPA*) (Lee et al., 2011); citā pētījumā tika identificētas 68,5 % alēļu (Okada et al., 2000); Turcijas pētījumā atklāto alēļu biežums bijis 71,9 % (Simsek Papur, Akman and Terzioglu, 2015), Dānijā – 100 % (Moller et al., 2011a), Ķīnā – 97,1 % (Hua et al., 2016), bet Indijā – tikai 77 %, ietverot arī *ATP7B* gēna promotera un *MLPA* analīzi (Mukherjee et al., 2014). Atklāto alēļu biežumu atšķirības liecina par iespējamām populāciju atšķirībām.

Iepriekš publicētajos pētījumos, mēģinot noskaidrot fenotipa–genotipa korelāciju, ir ziņoti pretrunīgi secinājumi (Stapelbroek et al., 2004; De Bem et al., 2013; Chappuis et al., 2007; Vrabelova et al., 2005). Kādā metaanalīzes

pētījumā, kur analizēti rezultāti no 11 dažādiem centriem, variants c.3207C>A (p.His1060Gln) bija saistīts ar vēlīnākiem un, galvenokārt, neiroloģiskiem simptomiem (Stapelbroek et al., 2004). Savukārt citos pētījumos c.3207C>A (p.His1069Gln) varianta statistiski nozīmīga saistība ar klīniskajiem simptomiem netika atrasta (De Bem et al., 2013; Chappuis et al., 2007; Vrabelova et al., 2005). Šajā pētījumā rezultāti uzrāda tendenci, ka neiroloģiskie un jauktie simptomi (neiroloģiskie un/vai psihiatriskie kopā ar hepatoloģiskajiem) parādās vēlīnāk, nekā tikai hepatoloģiskie, kas sakrīt ar citiem pētījumiem (Stapelbroek et al., 2004), bet dati nav statistiski nozīmīgi. Šī pētījuma ietvaros arī nebija statistiski nozīmīga saistība starp VS izraisīto variantu un klīniskajiem simptomiem vai slimības pirmo izpausmju vecumu.

Citā pētījumā *Gromadzka et al.* klasificē *ATP7B* variantus divās grupās: “nopietnie” (iekļaujot rāmja nobīdes un terminējošos variantus) un “vieglie” (iekļaujot nesinonīmus jeb *missense* variantus) (Gromadzka et al., 2005). Minētajā pētījumā autori atrada izteiktu saistību starp ģenētisko variantu tipu un VS fenotipu, secinot, ka “nopietnie” alēliskie varianti izraisa klīniski smagākus simptomus un VS ekspresiju agrīnākā vecumā, nekā “vieglie” varianti. Šajā pētījumā arī tika meklēta saistība starp dažādiem variantiem. Dati parādīja tendenci, ka “nopietnie” varianti genotipā saistās ar agrīnāku VS simptomu izpaušanos, bet rezultāti nebija statistiski nozīmīgi ($p = 0,101$). Statistiski nozīmīga atšķirība tika novērota starp “nopietno” variantu esamību genotipā un ceruloplazmīna līmeni asinīs – ja genotipā bija kaut viens rāmja nobīdes vai terminējošais variants, ceruloplazmīna līmenis bija zemāks, nekā pie homozigotiska genotipa tikai ar “vieglajiem” variantiem. Dati daļēji sakrīt ar *Gromadzka* pētījuma secinājumiem, bet jāņem vērā, ka šajā pētījumā abu veidu genotipu grupas bija skaitliski ļoti atšķirīgas (42 pacienti pret 9 pacientiem). Līdzīgu pētījumu veica arī *Cocos*, kurā ziņots par rāmja nobīdes variantu saistību ar VS agrīnāku izpausmi (Cocos et al., 2014).

Ņemot vērā ATOX1 proteīna svarīgo mijiedarbību ar ATP7B proteīnu, ir bijuši vairāki pētījumi, kur meklētas iespējamās izmaiņas *ATOX1* gēnā Vilsona slimības pacientiem, bet rezultāti visur ir bijuši negatīvi (Simon et al., 2008; Lee et al., 2011; Czlonkowska et al., 2018). Šajā pētījumā *ATOX1* gēnā arī netika atrastas izmaiņas, kas ietekmētu proteīna aktivitāti, līdz ar to neizdevās pierādīt, ka izmaiņas *ATOX1* gēnā varētu modificēt VS fenotipu.

Meklējot izmaiņas citos gēnos, kas varētu ietekmēt VS klīniskās izpausmes, pētnieku uzmanības centrā nokļuva *COMMD1* gēns, kurā patogēnie varianti ir pierādīti kā vara toksikozi izraisoši Bedlingtonas terjeriem, kas klīniski izpaužas līdzīgi kā Vilsona slimība cilvēkiem (van De Sluis et al., 2002). Ir bijuši vairāki pētījumi, kuros analizēta šī gēna variantu iespējamā ietekme arī cilvēkiem. *Stuehler et al.* atklāja, ka 492. pozīcijā esošā nukleotīda nomaiņa no T uz C (p.Asn164=) saistās ar agrīnāku (apmēram par 10 gadiem) VS klīnisko simptomu izpausmi. Tā kā variants neizmaina aminoskābi proteīnā (klusējošs variants), tad autori kā iespējamus skaidrojumus min varianta varbūtējo ietekmi uz mRNS struktūru, stabilitāti un procesēšanu, kas var ietekmēt tālāko gēna ekspresiju. Vēl minētā pētījuma autori raksta, ka atrastais variants, iespējams, ir kādas citas izmaiņas, kas varētu ietekmēt vara metabolismu, marķieris. (*Stuehler et al.*, 2004). Šajā pētījumā arī tika atrasts iepriekš aprakstītais variants starp Latvijas VS pacientiem. Analizējot tā iespējamo saistību ar slimības klīniskajām izpausmēm, saistība netika atrasta, līdz ar to neapstiprinājās iepriekš minētā hipotēze.

Citā pētījumā 2010.gadā *Gupta et al.* rakstījuši par kāda cita varianta c.521C>T (p.Thr174Met) ietekmi uz VS fenotipu – viņi saista šo variantu ar vairāk paaugstinātu vara līmeni urīnā, kā arī ar pastiprinātu šūnu apoptozi VS pacientiem (*Gupta et al.*, 2010). Pašreizējā pētījumā šāds variants *COMMD1* gēnā netika atrasts nevienam no Latvijas VS pacientiem.

Vēl ir bijuši vairāki pētījumi ar *COMMD1* gēna variantu ietekmi uz VS, bet diemžēl nekāda saistība šajos pētījumos neapstiprinājās (Lovicu et al., 2006; Weiss et al., 2006).

Saistībā ar *HFE* gēna variantu ietekmi uz VS simptomu attīstību ir bijuši vairāki pētījumi. Genotipi ar biežākajiem variantiem (C282Y un H63D) heterozigotiskā stāvoklī pie hemohromatozes reti ir saistīti ar aknu bojājumu tikai dzelzs uzkrāšanās dēļ; dažos pētījumos ir pieņēmums, ka paaugstināta dzelzs koncentrācija aknās var ietekmēt citu aknu slimību gaitu (Bulaj et al., 1996).

HFE gēna biežāko patogēno variantu heterozigotitātes ietekme uz VS gaitu ir pretrunīga: *Hafkemeyer* aprakstīja pacientu ar VS un heterozigotu (attiecībā uz biežākajiem variantiem) genotipu *HFE* gēnā, kuram novēroja dzelzs uzkrāšanos aknās (*Hafkemeyer* et al., 1994), bet *Erhardt* nenovēroja nozīmīgu saistību starp dzelzs rādītājiem un *HFE* gēna patogēnajiem variantiem (*Erhardt* et al., 2002). *Sorbello* ir pierādījuši *HFE* gēna patogēno variantu ietekmi uz papildus dzelzs uzkrāšanos VS pacientiem, kas ietekmē aknu slimības attīstību. Šajā pašā pētījumā secināts, ka medikamentu devu koriģēšana VS ārstēšanā, lai novērstu papildus dzelzs uzkrāšanos, ir efektīva tikai *HFE* savvaļas tipa varianta gadījumos (*Sorbello* et al., 2010).

Šajā pētījumā diemžēl nebija pieejami pietiekami daudz klīnisko datu dzelzs metabolisma izvērtēšanai, bet, vērtējot *HFE* gēna divu biežāko variantu ietekmi uz VS pirmos simptomu parādīšanās vecumu un ceruloplazmīna līmeni asinīs, statistiski nozīmīgas atšķirības netika atrastas, kas neapstiprina izvirzīto hipotēzi, ka *HFE* gēna varianti varētu ietekmēt aknu iekaisuma attīstību. Pētījuma dati tikai parāda tendenci, bet, lai sīkāk analizētu aknu iekaisuma izmaiņas pie dažādiem *HFE* gēna genotipiem, būtu nepieciešams paplašināt pētījuma pacientu grupas, kā arī izvēlēties papildus klīniskos un bioķīmiskos marķierus.

Šajā pētījumā no VS pacientiem ar klīniski apstiprinātu VS diagnozi tika identificēti 83,59 % *ATP7B* gēna alēļu, bet 16,41 % palika neidentificētas. Daži iespējamie skaidrojumi jau tika pieminēti iepriekš diskusijā, bet kā vēl viens skaidrojums varētu būt fakts, ka, iespējams, VS pacientiem ar klīniski apstiprinātu VS diagnozi nemaz nav VS, bet gan Vilsona slimībai līdzīga slimība. VS klīniskie un laboratorie diagnostikas kritēriji ir izstrādāti 2001.gadā, un kopš tā laika nav mainījušies. Ir publicēti vairāki pētījumi par vadlīniju un kritēriju pārskatīšanu (Hedera, 2017), bet Eiropas līmenī tās palikušas nemainīgas (EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's Disease, n.d.). Kā divi no kritērijiem VS diagnostikā ir minēti samazināts ceruloplazmīna līmenis asinīs un neiroloģiskie simptomi. Pie VS ceruloplazmīna līmenis ir samazināts vara uzkrāšanās dēļ, bet samazinātu ceruloplazmīna līmeni asinīs var izraisīt arī citi iemesli, kā, piemēram, aceruloplazminēmija un malabsorbcija. (EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's Disease, n.d.). Ceruloplazmīna līmeņa noteikšana asinīs tiek rekomendēta kā pirmais solis VS diagnostikā (Roberts and Schilsky, 2008). Tas vēl joprojām kalpo kā skrīninga metode, bet pat ar ļoti samazinātu ceruloplazmīna līmeni asinīs nepietiek diagnozes apstiprināšanā, lai gan šajā pētījumā nevienam no pacientiem netika konstatēts normāls seruma ceruloplazmīna līmenis. Seruma ceruloplazmīna līmenis < 20 mg/dL ir izmantojams VS diagnostikā, bet kopējā testa diagnozes paredzošā vērtība ir ļoti zema – 5,9% (Cauza et al., 1997). Ceruloplazmīns ir galvenais varu saistošais proteīns plazmā (ar to saistās > 90 % no vara). Tas pastāv divās formās – kā holoceruloplazmīns ar piesaistīto varu un apoceruloplazmīns, kurš nesatur varu (Hellman and Gitlin, 2002). Gandrīz vienmēr to mēra, izmantojot uz antivielām balstītos, radioimunoloģiskos testus, kas nespēj atšķirt abas ceruloplazmīna izoformas, izraisot varu saistošā proteīna līmeņa asinīs pārvērtēšanu. Seruma ceruloplazmīna līmeni var arī noteikt enzimatiski,

nosakot tā vara atkarīgās oksidāzes aktivitāti. Šis tests spēj atšķirt apoceruloplazmīnu no holoceruloplazmīna, bet netiek plaši pielietots. Ļoti samazināts ceruloplazmīna līmenis asinīs ($< 5 \text{ mg/dL}$) ir ļoti saistīts ar VS, bet tik zemi rādītāji var arī tikt atrasti pie citām slimībām, piem., aceruloplazminēmijas, ko izraisa patogēni alēliskie varianti *CP* gēnā. Neuroloģiskie simptomi pie aceruloplazminēmijas var atdarināt VS, bet tam par iemeslu patiesībā ir dzelzs uzkrāšanās (Hedera, 2017). Tādos gadījumos, lai apstiprinātu aceruloplazminēmiju, jāpārbauda pirmās pakāpes radnieku seruma ceruloplazmīna līmenis (heterozigotiskiem patogēnā alēliskā varianta nesējiem tas ir arī samazināts), kā arī parasti atrod samazinātu dzelzs līmeni serumā, paaugstinātu ferritīna līmeni, diabētu un pierādījumus par dzelzs uzkrāšanos galvas smadzeņu magnētiskās rezonanses izmeklējumos (Hellman and Gitlin, 2002). Ņemot vērā tikko minēto simptomu un laboratorisko radītāju izmaiņu trūkumu VS pacientiem bez molekulāri apstiprinātas diagnozes, aceruloplazminēmijas diagnoze ir apšaubāma, bet izmaiņas jeb alēliskie varianti *CP* gēnā ir aprakstīti dažādos pētījumos: gan par Parkinsona slimību (Zhao et al., 2015), gan sirds priekškambaru mirdzaritmiju (Adamsson Eryd et al., 2014; Arenas de Larriva et al., 2017), kuros secināts, ka izmaiņas *CP* gēna promoterā (nekodējošajā daļā) var būt saistītas ar izmainītu ceruloplazmīna līmeni. Šajā pētījumā tika atklāts, ka *CP* gēna promotera rs66508328 varianta AA genotips un rs11708215 varianta GG genotips (abi – pēc recesīvā iedzimšanas modeļa) biežāk bija sastopami starp pacientiem, kuriem VS nebija apstiprināta pēc *ATP7B* gēna genotipa. Tas varētu liecināt, ka iepriekš minētie varianti *CP* gēnā varētu ietekmēt gēna ekspresiju, izraisot samazinātu ceruloplazmīna līmeni asinīs, kas savukārt izraisa dzelzs pastiprinātu uzkrāšanos galvas smadzenēs, izraisot Parkinsona slimībai līdzīgus simptomus, kas ir raksturīgi arī Vilsona slimībai. Protams, ka datiem ir ieteicoša daba – tie liecina par pētījuma tālāko iespējamo attīstības virzienu, palielinot pacientu

grupas lielumu, jo pašlaik pacientu grupas bija salīdzinoši mazas, un, lai arī atšķirības bija statistiski nozīmīgas, ņemot vērā mazo grupu lielumu, rezultātiem varēja būt nejauša atradne. *Zhao* pētnieku grupa arī publicējuši datus par minētajiem *CP* gēna promotera variantiem un secinājuši, ka variantu retās alēles ir biežāk sastopamas starp Parkinsona slimības pacientiem un tie saistās ar slimības agrīnāku izpausmi (*Zhao et al.*, 2015b).

3.1. Pētījuma ierobežojumi

Lielākā daļa no pētījuma analīzēm ir veiktas ar salīdzinoši nelielu pacientu grupu – 64 pacientiem. Nelielajai pacientu grupai ir vairāki izskaidrojumi:

1. Vilsona slimība pieder reto slimību grupai ar biežāk pieminēto prevalenci – 1 : 30 000. Ņemot vērā minēto prevalenci un vidējo Latvijas iedzīvotāju skaitu (1,92 miljoni) (LCSP, n.d.), tad Latvijā būtu jābūt ap 65 pacientiem;
2. Latvijas Vilsona slimības pacienti lielākoties bija vērsušies pie hepatologiem – pastāv varbūtība, ka, aptverot lielāku speciālistu spektru, pacientu grupa būtu lielāka;
3. nebija vērojama liela atsaucība no pacientu pirmās pakāpes radniekiem – iespējams, arī tad analizējamo pacientu grupa būtu lielāka;
4. ņemot vērā, ka pacientu paraugi tika savākti salīdzinoši lielā laika posmā, tad visām molekulārajām analīzēm nebija vairs pieejami visu pacientu paraugi.

Ņemot vērā nelielo pacientu skaitu, šī pētījuma datiem ir virzoša tendence, ko būtu vēlams pārbaudīt lielākā populācijā, piemēram, veicot starpvalstu pētījumus.

3.2. Klīniskās rekomendācijas

1. Visiem pacientiem ar klīniski apstiprinātu Vilsona slimību vai aizdomām par to, sākotnēji veikt biežākā alēliskā varianta noteikšanu, bet pie negatīva rezultāta – veikt *ATP7B* gēna eksonu sekvenēšanu. Ja diagnoze netiek molekulāri apstiprināta, ieteicams pārskatīt slimības diferenciāldiagnostiku;
2. Vilsona slimības pacientiem, īpaši – molekulāri apstiprinātajiem, tiek rekomendēts radnieku (īpaši – pirmās pakāpes) ģenētiskais skrīnings;
3. Vilsona slimības pacientiem, īpaši ar prevalējošu neiroloģisko simptomātiku, kuriem diagnoze nav apstiprināta molekulāri, ieteicams noteikt citus iespējamus simptomu un bioķīmisko izmaiņu cēloņus.

Secinājumi

1. Visbiežākais Vilsona slimību izraisošais *ATP7B* gēna patogēnais alēliskais variants Latvijas pacientiem ir c.3207C>A (p.His1069Gln) – 69,53% alēļu, kas atbilst vidējiem Eiropas rādītājiem.
2. Visbiežāk *ATP7B* gēna patogēnie alēliskie varianti ir sastopami trīs eksonos – 14., 8. un 2., bet starp Latvijas pacientiem ir vērojama liela *ATP7B* gēna alēliskā heterogenitāte, tāpēc racionāli ir sekvenēt visus *ATP7B* gēna eksonus, savukārt, *ATP7B* gēna promotera rajona sekvenēšana nepalielina atklāto patogēno alēļu skaitu; Latvijas Vilsona slimības pacientiem nav vērojamas lielas *ATP7B* gēna delēcijas vai duplikācijas, norādot, ka *MLPA* radikāli neuzlabo atklāto patogēno alēļu skaitu.
3. Noteiktā Vilsona slimības prevalence Latvijas jaundzimušo kohortās ir 1 : 21 800 dzīvi dzimušajiem, kas atbilst vidējiem Eiropas rādītājiem.
4. Latvijas Vilsona slimības pacientiem nav vērojama saistība starp *ATP7B* gēna patogēnajiem alēliskajiem variantiem un klīniskajām izpausmēm, kas liecina par fenotipa–genotipa saistības trūkumu, kas noraida izvirzīto hipotēzi.
5. *CP* gēna promotera rs66508328 varianta AA un rs11708215 varianta GG genotips biežāk ir sastopami Vilsona slimības pacientiem ar molekulāri neapstiprinātu *ATP7B* gēna genotipu un neiroloģiskajiem simptomiem, kas liecina par *CP* gēna promotera variantu iespējamo saistību ar Vilsona slimības raksturīgajiem neiroloģiskajiem simptomiem un bioķīmiskajām izmaiņām, savukārt, tas, ka netika atrasta *ATOX1*, *COMMD1* un *HFE* gēnu variantu saistība ar Vilsona slimības fenotipu liecina par šo gēnu mazsvarīgo lomu Vilsona slimības patoģenēzē, kas noraida izvirzīto hipotēzi par minēto gēnu ietekmi Vilsona slimības attīstībā.

Izmantotā literatūra

- Abdelghaffar, T. Y., Elsayed, S. M., Elsobky, E., Bochow, B., Buttner, J. and Schmidt, H. 2008. Mutational Analysis of ATP7B Gene in Egyptian Children with Wilson Disease: 12 Novel Mutations. *Journal of Human Genetics*. 53(8), 681-87. DOI: 10.1007/s10038-008-0298-7
- Abuduxikuer, K., Li, T. L., Qiu, Y.L., Wang, N. L. and Wang, J. S. 2015. Wilson Disease with Hepatic Presentation in an Eight-Month-Old Boy. *World Journal of Gastroenterology*. 21(29), 8894-8902. DOI: 10.3748/wjg.v21.i29.8981
- Adamsson, E., S., Sjogren, M., Smith, J. G., Nilsson, P. M., Melander, O., Hedblad, B. and Engstrom, G. 2014. Ceruloplasmin and Atrial Fibrillation: Evidence of Causality from a Population-Based Mendelian Randomization Study. *Journal of Internal Medicine*. 275(2), 164-71. DOI: 10.1111/joim.12144
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S. and Sunyaev, S. R. 2010. A Method and Server for Predicting Damaging Missense Mutations. *Nature Methods*. 7(4), 248-49. DOI: 10.1038/nmeth0410-248
- Ala, A., Borjigin, J., Rochwarger, A. and Schilsky, M. 2005. Wilson Disease in Septuagenarian Siblings: Raising the Bar for Diagnosis. *Hepatology*. 41(3), 668-70. DOI: 10.1002/hep.20601
- Bem, R. S. D., Raskin, S., Muzzillo, D., Deguti, M. M., Cancado, E. L. R., Araujo, T. F., Nakhle, M. C., Barbosa, E. R., Munhoz, R. P., and Teive, H. G. 2013. Wilson's Disease in Southern Brazil: Genotype-Phenotype Correlation and Description of Two Novel Mutations in ATP7B Gene. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 71(8), 503-7. DOI: 10.1590/0004-

282X20130078

- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. US National Library of Medicine. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [viewed 21.10.2018].
- Blastp on UNIPROTKB_HUMAN. [Database]. Available from: <https://www.uniprot.org/blast/uniprot/B20181015AAFB7E4D2F1D05654627429E83DA5CCE008F81L?alignment=1> [viewed 16.10.2018].
- Bulaj, Z. J., Griffen, L. M., Lynn B. J., Corwin Q. E. and Kushner, J. P. 1996. Clinical and Biochemical Abnormalities in People Heterozygous for Hemochromatosis. *New England Journal of Medicine*. 335(24), 1799-1805. DOI:10.1056/NEJM199612123352403.
- Cauza, E., Maier-Dobersberger, T., Polli, C., Kaserer, K., Kramer, L. and Ferenci, P. 1997. Screening for Wilson's Disease in Patients with Liver Diseases by Serum Ceruloplasmin. *Journal of Hepatology*. 27(2), 358-362. DOI: 10.1016/S0168-8278(97)80182-1
- Chappuis, P., Callebert, J., Quignon, V., Woimant, G. and Laplanche, J.L. 2007. Late Neurological Presentations of Wilson Disease Patients in French Population and Identification of 8 Novel Mutations in the ATP7B Gene. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 21(1), 37-42. DOI: 10.1016/j.jtemb.2006.11.002
- Cocos, R., Sendroiu, A., Schipor, S., Bohiltea, L. C., Sendroiu, I. and Raicu, F. 2014. Genotype-Phenotype Correlations in a Mountain Population Community with High Prevalence of Wilson's Disease: Genetic and Clinical Homogeneity. *PloS One*. 9(6), e98520. DOI:10.1371/journal.pone.0098520
- Coffey, A. J., Durkie, M., Hague, S., McLay, K. et al. 2013. A Genetic Study of Wilson's Disease in the United Kingdom. *Brain*. 136(5), 1476-1487. DOI:10.1093/brain/awt035

- Cullen, L. M., Prat, L. and Cox, D.W. 2003. Genetic Variation in the Promoter and 5' UTR of the Copper Transporter, ATP7B, in Patients with Wilson Disease. *Clinical Genetics*. 64(5), 429-432. DOI: 10.1034/j.1399-0004.2003.00160.x
- Czlonkowska, A., Gromadzka, G., Büttner, J. and Chabik, G. 2010. Clinical Features of Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count Syndrome in Undiagnosed Wilson Disease: Report of Two Cases. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 281(1), 129-134. DOI: 10.1007/s00404-009-1080-6
- Czlonkowska, A., Gromadzka, G. and Chabik, G. 2009. Monozygotic Female Twins Discordant for Phenotype of Wilson's Disease. *Movement Disorders*. 24(7), 1066-1069. DOI: 10.1002/mds.22474
- Czlonkowska, A., Litwin, T., Dusek, P., Ferenci, P., Lutsenko, S., Medici, V., Rybakowski, J. K., Weiss, K. H. and Schilsky, M. L. 2018. Wilson Disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 4(1), 21. DOI: 10.1038/s41572-018-0018-3
- Czlonkowska, A., Rodo, M. and Gromadzka, G. 2008. Late Onset Wilson's Disease: Therapeutic Implications. *Movement Disorders*. 23(6), 896-898. DOI: 10.1002/mds.21985
- EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's Disease. N.d. Available from: <https://www.easl.eu/medias/cpg/Wilsons-Disease/English-report.pdf> [viewed 29.10.2017.].
- EASL (European Association for the Study of the Liver). 2012. EASL Clinical Practice Guidelines. *Journal of Hepatology*. 56(3), 671-685. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.11.007
- Erhardt, A., Hoffmann, A., Hefter, H. and Haussinger, D. 2002. HFE Gene Mutations and Iron Metabolism in Wilson's Disease. *Liver International*. 22(6), 474-478. DOI: 10.1034/j.1600-0676.2002.01732.x

- Ferenci, P., Caca, K., Loudianos, G., Mieli-Vergani, G., Tanner, S., Sternlieb, I., Schilsky, M., Cox, D. and Berr, F. 2003. Diagnosis and Phenotypic Classification of Wilson Disease. *Liver International*. 23(3), 139-142. DOI:10.1034/j.1600-0676.2003.00824.x
- Ferenci, P., Czlonkowska, A., Merle, U., Ferenc, S., Gromadzka, G., Yurdaydin, C., Vogel, W., Bruha, R., Schmidt, H.T. and Stremmel, W. 2007. Late-Onset Wilson's Disease. *Gastroenterology*. 132(4), 1294-1298. DOI:10.1053/j.gastro.2007.02.057
- Garry, P. J., Montoya, G. D., Baumgartner, R. N., Liang, H. C., Williams, T. M. and Brodie, S. G. 1997. Impact of HLA-H Mutations on Iron Stores in Healthy Elderly Men and Women. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 23(2), 277-287. DOI:10.1006/bcmd.1997.0144
- GnomAD. [N.d.] Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/> [viewed 08.04.2019.].
- Gomes, A. and Dedoussis, G. V. 2016. Geographic Distribution of ATP7B Mutations in Wilson Disease. *Annals of Human Biology*. 43(1), 1-8. DOI:10.3109/03014460.2015.1051492
- Gromadzka, G., Schmidt, H. H. J., Genschel, J., Bochow, B. et al. 2005. 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. *Clinical Genetics*. 68(6), 524-532. DOI:10.1111/j.1399-0004.2005.00528.x
- Gupta, A., Chattopadhyay, I., Mukherjee, S., Sengupta, M., Das, Sh. K. and Kunal Ray. 2010. A Novel COMMD1 Mutation Thr174Met Associated with Elevated Urinary Copper and Signs of Enhanced Apoptotic Cell Death in a Wilson Disease Patient. *Behavioral and Brain Functions: BBF*. 6(6), 33. DOI: <https://doi.org/10.1186/1744-9081-6-33>
- Hafkemeyer, P., Schupp, M., Storch, M., Gerok, W. and Häussinger, D. 1994.

- Excessive Iron Storage in a Patient with Wilson's Disease. *The Clinical Investigator*. 72(2), 134-136. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00184590>
- Hedera, P. 2017. Update on the Clinical Management of Wilson's Disease. *The Application of Clinical Genetics*. 10, 9-19. DOI: 10.2147/TACG.S79121
- Hellman, N. E. and Gitlin, J. D. 2002. C Eruloplasmin Metabolism and Function. *Annual Review of Nutrition*. 22(1), 439-458.
DOI:10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457
- HGMD. [N.d.] Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
[viewed 20.10.2018.].
- University of Alberta. [N.d.] Wilson disease mutation database. [Home page].
Available from:
<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/search3.asp?a=a> [viewed 16.10.2018.]
- Hua, R., Fang Hua, Yonggeng Jiao, Yu Pan, Xu Yang, Shanshan Peng, and Junqi Niu. 2016. Mutational Analysis of ATP7B in Chinese Wilson Disease Patients. *American Journal of Translational Research*. 8(6), 2851-2861. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27398169>
- Human Splicing Finder - Version 3.1. [N.d.] Available from:
<http://www.umd.be/HSF3/> [viewed 18.10.2018.].
- John, S. W., Weitzner, G., Rozen, R. and Sriver, C. R. 1991. A Rapid Procedure for Extracting Genomic DNA from Leukocytes. *Nucleic Acids Research*. 19(2), 408. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2014181>
- Kucinskas, L., Jeroch, J., Vitkauskiene, A., Sakalauskas, R., Petrenkiene, V., Kucinskas, V., Naginiene, R., Schmidt, H. and Kupcinskas, L. 2008. 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*. 14(38), 5876-5879.

<https://doi.org/10.3748/wjg.14.5876>

- Larriva, A. P., de, Norby, F. L., Chen, L. Y., Soliman, E. Z., Hoogeveen, R. C., Arking, D. A., Loehr, L. R. and Alonso, A. 2017. Circulating Ceruloplasmin, Ceruloplasmin-Associated Genes, and the Incidence of Atrial Fibrillation in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *International Journal of Cardiology*. 241(August), 223-228. DOI:10.1016/j.ijcard.2017.04.005
- LCSP. N.d. IDG010. Dzīvi un nedzīvi dzimušo skaits pēc dzimuma. Centrālās Statistikas Pārvaldes Datubāze. Pieejams no: http://data1.csb.gov.lv/pxweb/lv/iedz/iedz__dzimst/IDG010.px/table/tableViewLayout1/?rxid=f259e646-b6c5-497f-bc7b-4d7e6317cea6 [sk.14.10.2018.].
- Lee, B. H., Kim, J. H., Lee, S. Y., Jin, H. Y. et al. 2011. Distinct Clinical Courses According to Presenting Phenotypes and Their Correlations to ATP7B Mutations in a Large Wilson's Disease Cohort. *Liver International*. 31(6), 831-839. DOI:10.1111/j.1478-3231.2011.02503.x
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 25(4), 402-408. DOI:10.1006/METH.2001.1262
- Loudianos, G., Dessi, V., Lovicu, M., Angius, A. et al. 1999. Mutation Analysis in Patients of Mediterranean Descent with Wilson Disease: Identification of 19 Novel Mutations. *Journal of Medical Genetics*. 36(11), 833-836. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1734255&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lovicu, M., Dessi, V., Lepori, M. B., Zappu, A. et al. 2006. The Canine Copper Toxicosis Gene MURR1 Is Not Implicated in the Pathogenesis of Wilson Disease. *Journal of Gastroenterology*. 41(6), 582-587. DOI:

10.1007/s00535-006-1807-0

Moller, L. B., Horn, N., Dysgaard Jeppesen, T., Vissing, J., Wibrand, F., Jennum, P. and Ott, P. 2011a. Clinical Presentation and Mutations in Danish Patients with Wilson Disease. *European Journal of Human Genetics : EJHG*. 19(9), 935-941.

DOI:<https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.80>

MRC-Holland. [N.d.] Available from:

<http://www.mrcholland.com/WebForms/WebFormMain.aspx> [viewed 14.10.2018.].

Mukherjee, Shashwata, Shruti Dutta, Sulagna Majumdar, Tamoghna Biswas, Preeti Jaiswal, Mainak Sengupta, Abhisek Bhattacharya, et al. 2014. Genetic Defects in Indian Wilson Disease Patients and Genotype-Phenotype Correlation. *Parkinsonism & Related Disorders*. 20(1), 75-81.

DOI:10.1016/j.parkreldis.2013.09.021

Mura, C., Raguene, O. and Ferec, C. 1999. HFE Mutations Analysis in 711 Hemochromatosis Probands: Evidence for S65C Implication in Mild Form of Hemochromatosis. *Blood*. 93(8), 2502-2505.

DOI:10.1182/blood.v93.8.2502.408k27_2502_2505

NCBI. [N.d.] Chr13: 52.51M-52.51M : 1000 Genomes Browser. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/?gts=rs1057516740> [viewed 16.10.2018.].

Okada, T., Shiono, Y., Hayashi, H., Satoh, H. et al. 2000. Mutational Analysis OfATP7Band Genotype-Phenotype Correlation in Japanese with Wilson's Disease. *Human Mutation*. 15(5), 454-462.

DOI:10.1002/(SICI)1098-1004(200005)15:5<454::AID-HUMU7>3.0.CO;2-J

PolakovA, H., Katrincsakova, B., Minarik, G., Ferakova, E., Ficek, A.,

- Baldovic, M. and Kadasi, L. 2007. Detection of His1069Gln Mutation in Wilson Disease by Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles (BI-PASA) Test. *General Physiology and Biophysics*. 26(2), 91-96.
- Primer3 Input (Version 0.4.0). [N.d.] Available from:
<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> [viewed 19.10.2018.].
- Reference SNP (RefSNP) Cluster Report: Rs760285767. [N.d.] Available from:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=760285767
[viewed 16.10.2018.].
- Reilly, M., Daly, L. and Hutchinson, M. 1993. An Epidemiological Study of Wilson's Disease in the Republic of Ireland. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 56(3), 298-300.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8459248>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D. et al. 2015. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 17(5), 405-423. DOI: <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- Roberts, E. A. and Schilsky, M. L. 2008. Diagnosis and Treatment of Wilson Disease: An Update. *Hepatology*. 47(6), 2089-2111.
<https://doi.org/10.1002/hep.22261>
- NCBI. [N.d.] Rs571657964 RefSNP Report – DbSNP. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs571657964> [viewed 25.02.2019.].
- Simon, I., Schaefer, M., Reichert, J. and Stremmel, W. 2008. Analysis of the Human Atox 1 Homologue in Wilson Patients. *World Journal of Gastroenterology*. 14(15), 2383-2387. DOI: 10.3748/WJG.14.2383
- Simsek, P., Ozlenen, Sezin Asik Akman, and Orhan Terzioglu. 2015. Clinical and Genetic Analysis of Pediatric Patients with Wilson Disease. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 26(5), 397-403.

<https://doi.org/10.5152/tjg.2015.0097>

- Sluis, B. van De, Rothuizen, J., Pearson, P. L., van Oost, B. A. and Wijmenga, C. 2002. Identification of a New Copper Metabolism Gene by Positional Cloning in a Purebred Dog Population. *Human Molecular Genetics*. 11(2), 165-173. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11809725>
- Sorbello, O., Sini, M., Civolani, A. and Demelia, L. 2010. HFE Gene Mutations and Wilson's Disease in Sardinia. *Digestive and Liver Disease*. 42(3), 216-219. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.06.012>
- Stapelbroek, J. M., Bollen, C. W., Ploos Van Amstel, J., Van Erpecum, K. J., Hattum, J. V., Van Den Berg, L. H., Klomp, L. W. J. and Houwen, R. H. J. 2004. The H1069Q Mutation in ATP7B Is Associated with Late and Neurologic Presentation in Wilson Disease: Results of a Meta-Analysis. *Journal of Hepatology*. 41(5), 758-763. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.07.017>
- Stevens, A. J., Taylor, M. G., Pearce, F. G. and Kennedy, M. A. 2017. Allelic Dropout During Polymerase Chain Reaction Due to G-Quadruplex Structures and DNA Methylation Is Widespread at Imprinted Human Loci. *G3 (Bethesda, Md.)*. 7(3), 1019-1025. <https://doi.org/10.1534/g3.116.038687>
- Stuehler, B., Reichert, J., Stremmel, W. And Schaefer, M. 2004. Analysis of the Human Homologue of the Canine Copper Toxicosis Gene MURR1 in Wilson Disease Patients. *Journal of Molecular Medicine*. 82(9), 629-634. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0557-9>
- Varsom. [N.d.] The Human Genomics Community. Rs7334118 SNV | Hg19. Available from: <https://varsome.com/variant/hg19/rs7334118> [viewed 21.02.2020.].
- Vrabelova, S., Letocha, O., Borsky, M. and Kozak, L. 2005. Mutation Analysis of the ATP7B Gene and Genotype/Phenotype Correlation in 227 Patients

- with Wilson Disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. 86(1-2), 277-285. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.05.004>
- Weiss, K. H., Merle, U., Schaefer, M., Ferenci, P., Fullekrug, J. and Stremmel, W. 2006. Copper Toxicosis Gene MURR1 Is Not Changed in Wilson Disease Patients with Normal Blood Ceruloplasmin Levels. *World Journal of Gastroenterology*. 12(14), 2239-2242. <https://doi.org/10.3748/WJG.V12.I14.2239>
- Zarina, A., Tolmane, I., Kreile, M., Chernushenko et al. 2017. Genetic Variation Spectrum in ATP7B Gene Identified in Latvian Patients with Wilson Disease. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 5(4), 405-409. DOI:<https://doi.org/10.1002/mgg3.297>.
- Zhao, N., Xiao, J., Zheng, Z., Fei, G., Zhang, F., Jin, L. and Zhong, C. 2015. Single-Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes of Non-Coding Area in the CP Gene Are Correlated with Parkinson's Disease. *Neuroscience Bulletin*. 31(2), 245-256. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1512-6>

Publikācijas par pētījuma tēmu

Zinātniskie raksti (3)

1. **Zarina, A.**, Tolmane, I., Kreile, M., Chernushenko, A., Cernevska, G., Pukite, I., Micule, I., Krumina, Z., Krumina, A., Rozentale, B., Piekuse, L. 2017. Genetic variation spectrum in *ATP7B* gene identified in Latvian patients with Wilson disease. *Molecular genetics & genomic medicine*, 5(4), 405–409.
2. Krumina, A., Pliss, L., Zarina, G., Puzuka, A., **Zarina, A.**, Lace, B., Elferts, D., Khrunin, A., Limborska, S., Klovins, J., Gailite, L. 2018. Population genetics of Latvians in the context of admixture between North-Eastern European ethnic groups. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Sect.B.* 72(3), 131–151.
3. **Zarina, A.**, Tolmane, I., Krumina, Z., Tutane, A. I., Gailite, L. 2019. Association of Variants in the *CP*, *ATOX1* and *COMMD1* Genes with Wilson Disease Symptoms in Latvia. *Balkan J Med Genet.* 22(2), 37–42.

Tēzes un prezentācijas starptautiskās konferencēs (8)

1. **Zarina A.**, Tutane A., Rots D., Kreile M., Tolmane I., Cernevska G., Pukite I., Krumina Z., Gailite L. 2018. *Is it sufficient with direct sequencing of ATP7B gene coding regions to diagnose Wilson disease?* - Environmental and Experimental Biology.16, 279. Abstract of the 7th Baltic Genetics Congress.
2. **Zarina A.**, Piekuse L., Kreile M., Tolmane I., Sondore V., Cernevska G., Pukite I., Krumina Z. 2016. Is COMMD1 gene a modifier locus of Wilson disease? *European Journal of Human Genetics*. ESHG Conference, Abstracts. 24, Suppl.1, 93.
3. **Zarina A.**, Piekuse L., Kreile M., Tolmane I., Keiss J., Cernevska G., Pukite I., Krumina Z., Krumina A. 2015. *Not typical North-European ATP7B gene mutation in Latvian patients with Wilson disease.* European Journal of Human Genetics. ESHG Conference, Abstracts. 23, Suppl.1, 144.
4. **Zarina A.**, Piekuse L., Kreile M., Steinberga Z., Tolmane I., Keiss J., Chernushenko A., Sondore V., Cernevska G., Krumina Z., Krumina A. 2014. *Mutations in genes HFE, SERPINA1, CFTR in Wilson's disease patients in Latvia.* European Journal of Human Genetics. ESHG Conference, Abstracts. 22, Suppl.1, 397.
5. **Zarina A.**, Piekuse L., Kreile M., Tolmane I., Keiss J., Micule I., Eglite I., Kaze I., Cernevska G., Krumina A. 2013. *Inheritance of*

- Wilson's disease and its clinical appearance in four unrelated families in Latvia.* RSU Collection of Scientific Papers, VI Latvian Gastroenterology Congress with International participation, Abstracts. Suppl.2, 48.
6. **Zarina A.**, Piekuse L., Kreile M., Krumina A., Lace B., Keiss J., Sondore V., Cernevska G. 2011. *Mutation spectrum of Wilson disease in Latvia.* IV International Congress of Molecular Medicine, Istanbul, Turkey, Abstracts. 115.
 7. **Zarina A.**, Krumina A., Lace B., Keiss J., Sondore V., Cernevska G. 2009. *High frequency of Wilson Disease and new mutations found in Latvia.* 4th Baltic Sea Region Conference in Medical Sciences, Warsaw, Abstracts. 86.
 8. Krumina A., Keiss J., Sondore V., Cernevska G., **Zarina A.**, Lace B. 2008. *Clinical evaluation and molecular-genetic diagnosis of Wilson disease.* The American Society of Human Genetics, 58th Annual Meeting, Philadelphia, USA. Abstracts.156.

Tēzes un prezentācijas vietēja mēroga konferencēs Latvijā (7)

1. **Zariņa A.**, Kreile M., Tolmane I., Čerņušenko A., Čerņevska G., Puķīte I., Krūmiņa Z., Gailīte L. 2018. *Vilsona slimība Latvijā: 17 gadu pieredze molekulārajā diagnostikā.* RSU Zinātniskā konference. Rīga, 242.
2. **Zariņa A.**, Tolmane I., Čerņušenko A., Puķīte I., Čerņevska G., Krūmiņa Z., Kreile M., Piekuse L. 2017. *ATOX1 gēna variantu ietekme uz Vilsona slimības klīnisko gaitu.* RSU Zinātniskā konference. Rīga, 292.
3. **Zariņa A.**, Piekuse L., Kreile M., Tolmane I., Čerņevska G., Puķīte I., Krūmiņa Z., Keiņš J. 2016. *Vilsona slimības pirmās klīniskās izpausmes bērniem vecumā līdz 18 gadiem Latvijas populācijā.* RSU Zinātniskā konference. Rīga, 162.
4. **Zariņa A.**, Piekuse L., Kreile M., Tolmane I., Keiņš J., Čerņušenko A., Čerņevska G., Puķīte I., Krūmiņa Z., Krūmiņa A. 2015. *Kritēriji Vilsona slimības klīniskajai un molekulārajai diagnostikai.* RSU Zinātniskā konference. Rīga. 173.
5. **Zariņa A.**, Piekuse L., Kreile M., Tolmane I., Keiņš J., Sondore V., Čerņušenko A., Čerņevska G., Krūmiņa Z., Krūmiņa A. 2014. *HFE gēna mutāciju C282Y un H63D saistība ar Vilsona slimību Latvijas pacientiem.* RSU Zinātniskā konference. Rīga. 146.

6. **Zariņa A.**, Kreile M., Piekuse L., Čerņevska G., Keišs J., Mičule I., Krūmiņa A. 2010. *Vilsona slimības izraisošās mutācijas H1069Q biežums bērniem līdz 18 gadu vecumam Latvijas populācijā*. RSU Zinātniskā konference, Rīga. 240.
7. **Zariņa A.** 2008. *Vilsona slimības fenotipiski genotipiskā struktūra Latvijā*. RSU 57. Medicīnas nozares studentu zinātniskā konference, Rīga. 21.-22.

Pateicības

Vēlos pateikties visiem kolēģiem, līdzcilvēkiem, draugiem un radniekiem, kas ir piedalījušies promocijas darba tapšanā.

Īpašs paldies abām darba vadītājām – asoc. prof. Ievai Tolmanei un doc. Zitai Krūmiņai par neatslābstošu promocijas darba pārbaudīšanu, padomu došanu un labojumu veikšanu. Atsevišķi vēlos pateikties promocijas darba zinātniskajai konsultantei – RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas vadītājai – Lindai Gailītei – par sniegtajām konsultācijām, ieteikumiem, labojumiem un vārdos neizsakāmo atbalstu.

Atsevišķu paldies vēlos teikt visiem promocijas darba pirmās apspriešanas sēdes dalībniekiem un organizētājiem, kas ļāva veikt nozīmīgus labojumus promocijas darbā. Īpašs paldies prof. Mārai Pilmanei.

Liels paldies visiem RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas kolēģiem – gan esošajiem, gan bijušajiem. Atsevišķi vēlos pateikties pirmajai laboratorijas vadītājai Baibai Lācei, kas sniedza pirmo atbalstu manas zinātnieces karjeras uzsākšanā; prof. Astrīdai Krūmiņai par pirmo zinātnes soļu kontrolēšanu un uzraudzību; Ievai Mičulei – par pirmās intereses radīšanu ģenētikas nozarē; Dmitrijam Rotam – par palīdzību pētījuma dizaina izstrādē un vērtīgiem padomiem, rakstot pašu promocijas darbu; Madarai Kreilei – par padomu sniegšanu un atbalstu.

Vēlos pateikties RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras kolēģiem – gan esošajiem, gan bijušajiem. Īpašs paldies katedras vadītājai prof. Jutai Kroičai par atbalstu grūtos brīžos un sniegtajiem

vērtīgajiem padomiem. Pasakos visiem katedras kolēģiem par sniegto emocionālo atbalstu, vērtīgiem padomiem un palīdzības sniegšanu, īpaši – prof. Edvīnam Miklaševičam, asoc. prof. Zandai Danebergai, asoc. prof. Erikai Naglei, doc. Agritai Puzukai.

Vēlos teikt lielu paldies arī RSU Onkoloģijas institūta molekulārās ģenētikas laboratorijas kolektīvam par palīdzību sekvenēšanā.

Atsevišķu paldies vēlos pateikt visiem pacientiem par piekrišanu piedalīties pētījumā, kā arī dažādu klīniku ārstiem par pacientu paraugu nosūtīšanu molekulāriem pētījumiem, īpaši – prof. Jāzepam Keišam, prof. Ludmilai Vīksnai, dr. Guntai Čerņevskai, dr. Ievai Puķītei, dr. Aleksandram Černušenko, dr. Paulam Aldiņam, dr. Gitai Tauriņai, dr. Ievai Grīnfeldai u.c.

Liels paldies visiem, kas ir piedalījušies promocijas darba formatēšanā, īpaši liels paldies Ingai Znotiņai par palīdzību atsauču noformēšanā.

Paldies vēlos teikt arī RSU Doktorantūras nodaļas darbiniekiem par atsaucību promocijas darba tapšanā un tālākā virzīšanā.

Liela pateicība visiem manas ģimenes locekļiem (īpaši – vecākiem), draugiem un paziņām, par sniegto emocionālo atbalstu.