

Agnese Zariņa

ORCID 0000-0002-0242-5796

Vilsona slimības klīnisko gaitu raksturojošie ģenētiskie faktori

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

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes,
tai skaitā farmācija

Apakšnozare – medicīniskā ģenētika

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. med. asociētā profesore **Ieva Tolmane**, Latvijas Universitātē
Dr. med. docente **Zita Krūmiņa**, Rīgas Stradiņa universitātē, Latvija

Zinātniskā konsultante:

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

Rīga, 2020

Anotācija

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

VS klīniskās izpausmes ir ļoti dažādas, biežāk ietverot aknu bojājumu un neiroloģiskos simptomus. Vilsons slimība var izpausties jebkurā vecumā, lai gan lielākajā daļā gadījumu pirmie simptomi parādās vecumā no pieciem līdz 35 gadiem. Lai arī slimību izraisa dažādi alēliskie varianti *ATP7B* gēnā, turpinās pētījumi, lai izskaidrotu Vilsons slimības klīnisko izpausmju variabilitāti. Ir vairāki pētījumi par *ATP7B* gēna alēlisko variantu dažādo ietekmi uz olbaltumvielas ATP7B funkcijām. Tiek minēta arī citu gēnu iespējamā ietekme uz VS fenotipu. Kā VS klīnisko gaitu ietekmējošie gēni visbiežāk tiek minēti tie, kuru kodētās olbaltumvielas ir iesaistītas vara vielmaiņā, piem., *ATOX1* un *COMMD1* gēns, kā arī gēni, kuru patogēnie varianti var ietekmēt aknu šūnās esošo iekaisumu, piem., *HFE* gēns.

VS diagnostika balstās uz 2001. gadā pieņemtajām diagnostikas vadlīnijām, 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.

Šī pētījuma mērķis bija izpētīt Vilsons slimības ģenētiskos faktorus, raksturojot slimību izraisošo alēlisko variantu spektru un biežumu Latvijā, to korelāciju ar slimības klīniskajām izpausmēm, kā arī identificēt citus iespējamus Vilsons slimību ietekmējošos ģenētiskos faktorus.

Promocijas darba ietvaros analizēti sešdesmit četri neradnieciski indivīdi, kuriem klīniski un / vai molekulāri bija apstiprināta Vilsons slimība. Vilsons slimības prevalence jaundzimšo kohortās Latvijā tika noteikta kā apmēram 1 : 21 800 dzīvi dzimušajiem. Izmantojot *ATP7B* gēna tiešo sekvenēšanu un *PCR-BiPASA* metodi, *ATP7B* gēna patogēnie alēliskie varianti tika atrasti 83,59 % alēļu starp Latvijas VS pacientiem, no kuriem biežākais bija c.3207C>A (p.His1069Gln). *ATP7B*, *ATOX1*, *COMMD1* un *HFE* gēna alēlisko variantu ietekme uz VS fenotipu netika pierādīta. Pētījumā tika atrasta *CP* gēna rs66508328 varianta AA un rs11708215 varianta GG genotipa saistība ar VS neiroloģiskajām izpausmēm pacientiem ar molekulāri neapstiprinātu genotipu *ATP7B* gēnā.

Annotation

The doctoral thesis is entitled “Genetic Factors Characterising the Clinical Course of Wilson's Disease”. Wilson's disease (WD) is an autosomal recessive disorder of copper metabolism caused by approximately 800 allelic variants in gene *ATP7B* with prevalence 1 per 30 000 individuals in the Europe.

WD manifestations are very different, mostly including the hepatic pathology and neurological symptoms. WD can be symptomatic at any age, but predominantly the first symptoms appear at age between five and 35 years. Although the disease is caused by various allelic variants in the *ATP7B* gene, studies are ongoing to explain the variability of WD clinical presentation. There are several studies on the different effects of the *ATP7B* gene allelic variants on the protein ATP7B function. The possible effect of other genes on the WD phenotype has been discussed as well, with the main focus on genes encoding proteins involved in copper metabolism, e.g., *ATOX1* and *COMMD1*, as well as genes containing pathogenic variants that can influence inflammation in liver cells, e.g. *HFE*.

WD diagnosis is based on diagnostic guidelines adapted in 2001, where reduced levels of ceruloplasmin in the blood are one of the main diagnostic criteria. Other reasons, such as allelic variants of the *CP* gene encoding ceruloplasmin, may also cause this change.

The aim of this study was to study the genetic factors of WD, describing the spectrum and frequency of disease-causing allelic variants in Latvia, their correlation with clinical manifestations of the disease, and identifying other possible genetic factors affecting WD.

Sixty-four unrelated individuals who had clinical and/or molecular confirmation of WD were analyzed in the thesis. The prevalence of WD in newborn cohorts in Latvia was estimated at about 1: 21,800 live births. Using direct sequencing of the *ATP7B* gene and the *PCR-BiPASA* method, among the Latvian WD patients 83,59 % disease causing allelic variants of the *ATP7B* gene were identified, the most common being c.3207C>A (p.His1069Gln). The effect of *ATP7B*, *ATOX1*, *COMMD1* and *HFE* gene allelic variants on WD phenotype had not been established. Relation to neurological manifestations of WD by a non-molecular confirmed genotype in the *ATP7B* gene was found to *CP* gene rs66508328 and rs11708215 variants – AA and GG genotypes.

Saturs

Darbā izmantotie saīsinājumi	6
Ievads	9
Darba aktualitāte.....	10
Darba novitāte.....	10
Darba mērķis.....	10
Darba hipotēze	11
1. Literatūras apskats	12
1.1. Vara homeostāze eikariotu šūnās	12
1.1.1. Vara sadale audos	12
1.2. ATP7B proteīna un gēna organizācija.....	16
1.2.1. ATP7B proteīna uzbūve.....	16
1.2.2. <i>ATP7B</i> gēna uzbūve un Vilsona slimību izraisošie alēliskie varianti	17
1.3. Vilsona slimības epidemioloģija	18
1.4. Vilsona slimības klīniskās izpausmes.....	19
1.4.1. Simptomu sākšanās vecums.....	19
1.4.2. Fizikālās pazīmes	19
1.4.3. Aknu slimība.....	20
1.4.4. Hemolīze	21
1.4.5. Neiroloģiskie simptomi.....	21
1.4.6. Psihiatriskie un uzvedības simptomi.....	22
1.4.7. Citas klīniskās izpausmes	23
1.5. Vilsona slimības fenotipu daudzveidība un klīnisko simptomu modificējošie faktori	23
1.5.1. Citu gēnu alēlisko variantu iespējamā ietekme uz Vilsona slimības fenotipu.....	24
1.6. Vilsona slimības diagnostika	29
1.6.1. Diagnostiskie kritēriji.....	30
1.6.2. Citi VS izmeklējumi, kas neietilpst Leipcigas diagnostiskajos kritērijos	31
1.6.2. Molekulārā diagnostika.....	33
2. Materiāls un metodes	34
2.1. Pētījuma grupas	34
2.2. Molekulārie izmeklējumi.....	35
2.2.1. DNS izdalīšana no venozajām asinīm.....	35
2.2.2. <i>ATP7B</i> gēna alēliskā varianta H1069Q noteikšana ar PCR Bi-PASA metodi	35

2.2.3. Sekvenēšanas reakcija.....	37
2.2.4. <i>ATP7B</i> gēna tiešā sekvenēšana	38
2.2.5. Alēlisko variantu patogenitātes analizēšana	38
3.2.6. <i>ATOX1</i> gēna tiešā sekvenēšana.....	41
3.2.7. <i>COMMD1</i> gēna tiešā sekvenēšana.....	41
3.2.8. <i>CP</i> gēna tiešā sekvenēšana.....	42
2.2.9. Multiplekta ligācijas atkarīga proves pavairošana (MLPA).....	42
2.2.10. Kvantitatīvā <i>PCR</i> (<i>qPCR</i>)	44
2.2.11. <i>HFE</i> variantu noteikšana.....	45
2.3. Vilsona slimības prevalences aprēķini	45
2.4. Datu statistiskā apstrāde	46
3. Rezultāti	47
3.1. Vilsona slimības prevalence jaundzimušo kohortās.....	47
3.2. Vilsona slimības pacientu raksturojums	47
3.2.2. Vilsona slimības pacientu dzimums un pirmo simptomu parādīšanās vecums	47
3.2.3. VS pacientu pirmo simptomu raksturojums	48
3.3. <i>ATP7B</i> gēna analīze.....	50
3.3.1. <i>ATP7B</i> gēna kodējošo daļu (eksonu) analīze.....	50
3.3.2. <i>ATP7B</i> gēna promotera analīze.....	55
3.3.3. <i>ATP7B</i> gēna pārbaude ar <i>MLPA</i>	55
3.3.4. <i>ATP7B</i> gēna pārbaude ar <i>qPCR</i>	55
3.3.5. <i>ATP7B</i> gēna alēlisko variantu saistība ar VS fenotipu	55
3.4. <i>ATOX1</i> gēna analīze	57
3.6. <i>CP</i> gēna analīze	59
3.7. <i>HFE</i> gēna variantu pārbaude	60
4. Diskusija	62
Secinājumi.....	70
Publikācijas	71
Publikācijas starptautiska mēroga recenzējamās izdevumos (3).....	71
Ziņojumi kongresos un konferencēs (15)	71
Izmantotā literatūra	73
Pateicības.....	89

Darbā izmantotie saīsinājumi

Saīsinājums	Nosaukums latviešu valodā	Nosaukums angļu valodā
> 5 ×	vairāk nekā 5 reizes	<i>more than 5 times</i>
μmol/24 h	mikromoli 24 stundās	<i>micromoles per 24 hours</i>
μmol/g	mikromoli gramā	<i>micromoles per gram</i>
μmol/L	mikromoli litrā	<i>micromoles per litre</i>
ACMG	Amerikāņu medicīniskās ģenētikas un genomikas koledža	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AHCY	adenozilhomocisteināze	<i>adenosylhomocysteinase</i>
ALG11	alfa-1,2-mannoziltransferāze	<i>alpha-1,2-mannosyltransferase</i>
ATOX1	antioksidants 1 – vara šaperons (mazo molekulu korektormolekula)	<i>antioxidant 1 copper chaperone</i>
ATP	adenozīntrifosfāts	<i>adenosine triphosphate</i>
ATP7A	ATPāze – vara transportētājs alfa	<i>ATPase copper transporting alpha</i>
ATP7B	ATPāze – vara transportētājs beta	<i>ATPase copper transporting beta</i>
ATPāze	adenozīntrifosfātu šķeļošs enzīms	<i>adenosine triphosphate cleaving enzyme</i>
BKUS	Bērnu klīniskā universitātes slimnīca	<i>Children Clinical university Hospital</i>
BLAST	pamata vietējās meklēšanas rīks	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	bāzu pāris	<i>base pair</i>
CCS	vara šaperoni superoksīda dismutāzei	<i>copper chaperons for superoxide dismutase</i>
cDNS	komplementārā dezoksiribonukleīnskābe	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
COMMD1	vara metabolisma domēnu saturošais proteīns 1	<i>copper metabolism domain containing 1</i>
COX	citohroma-c oksidāze	<i>cytochrome c oxidase</i>
CP	ceruloplazmīns	<i>ceruloplasmin</i>
CTR1	vara transportētājs 1	<i>copper transporter 1</i>
Cu	varš	<i>copper</i>

del	delēcija	<i>deletion</i>
DMT1	dzelzs jonu membrānas transporta proteīns 1	<i>ferrous ion membrane transport protein 1</i>
DNS	dezoksiribonukleīnskābe	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DT	datortomogrāfija	<i>Computer Tomography</i>
Fe	dzelzs	<i>iron</i>
g/L	grami litrā	<i>grams per litre</i>
HFE	cilvēka homeostatisks regulētājproteīns	<i>human homeostatic iron regulator protein</i>
HGMD	cilvēka gēna mutāciju databāze	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HGVS	cilvēka genoma variāciju biedrība	<i>Human Genome Variation Society</i>
Hi-Di formamīds	ļoti dejonizēts formamīds	<i>highly deionized formamide</i>
IQR	starpkvartiļu amplitūda	<i>interquartile range</i>
kDa	kilodaltons	<i>kilodalton</i>
KRIT1	ankirīna atkārtojumu saturošs	<i>ankyrin repeat containing</i>
MAF	retāk sastopamās alēles biežums	<i>minor allele frequency</i>
MBD	metālu saistošie domēni	<i>metal binding domains</i>
μl	mikrolitrs	<i>microlitre</i>
MLPA	multipleksa ligācijas atkarīga proves pavairošana	<i>multiplex ligation - dependent probe apmlication</i>
MRI	magnētiskās rezonanses izmeklējums	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MRI T2	magnētiskās rezonanses izmeklējuma T2 izmeklējums	<i>Magnetic Resonance Imaging T2 weighted scans</i>
mRNS	matricas ribonukleīnskābe	<i>messenger ribonucleic acid</i>
nt	nukleotīds	<i>nucleotide</i>
OMIM	tiešsaistē pieejamā mendelējošā iedzimšana starp cilvēkiem	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
P. Stradiņa	Paula Stradiņa Klīniskā	<i>Pauls Stradins Clinical University</i>
KUS	universitātes slimnīca	<i>Hospital</i>
PAGE	poliakrilamīda gela elektroforēze	<i>polyacryl gel electrophoresis</i>
PCR	polimerāzes ķēdes reakcija	<i>polymerase chain reaction</i>

<i>PCR Bi-PASA</i>	divvirzienu <i>PCR</i> (polimerāzes ķēdes reakcija) specifisku alēļu pavošanai	<i>Bidirectional PCR (polymerase chain reaction) amplification of specific alleles</i>
qPCR	kvantitatīva polimerāzes ķēdes reakcija	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RAKUS	Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca	<i>Riga East Clinical University Hospital</i>
<i>RFLP</i>	restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu analīze	<i>restriction fragment length polymorphism analysis</i>
rs	references <i>SNP</i> (viena nukleotīda polimorfisms)	<i>Reference SNP (single nucleotide polymorphism)</i>
RSU MĢZL	Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskā laboratorija	<i>Rīga Stradiņš University Scientific Laboratory of Molecular Genetics</i>
SAH	S-adenozilhomocisteīns	<i>S-adenosyl-cysteine</i>
SAM	S-adenozilmetionīns	<i>S-adenosyl-methionine</i>
SD	standartnovirze	<i>standard deviation</i>
siRNS	īsās, ietekmējošās ribonukleīnskābes	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SOD1	superoksīda dismutāze 1	<i>superoxide dismutase 1</i>
<i>SREBP-2</i>	sterola regulatorais elements – saistošais proteīns 2	<i>sterol regulatory element-binding protein 2</i>
<i>SSCP</i>	vienpavediena konformācijas polimorfismu analīze	<i>single stranded conformational polymorphism analysis</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TMD	transmembrānu domēni	<i>transmembrane domains</i>
<i>UTR</i>	netranslējamais rajons	<i>untranslated region</i>
VS	Vilsona slimība	<i>Wilson disease</i>

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. VS 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 VS 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

VS ir viena no retajām ģenētiskām saslimšanām, kuru var veiksmīgi ārstēt. Bieži vien klīniskā diagnostika ir novēlota, varš jau ir uzkrājis audos un neatgriezeniski bojājis tos. DNS diagnostika paver iespējas diagnosticēt VS presimptomātiski (biežāk jau esošo slimnieku radiniekiem, 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 Vilsona slimības DNS diagnostika tiek veikta jau kopš 2004. gada, pārsvarā balstoties uz biežākā patogēnā alēliskā variantā – 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 VS pacientu molekulārā izpēte, nosakot alēlisko variantu „karstos punktus”, kas palīdzētu izstrādāt VS molekulārās diagnostikas algoritmu, ātrāk un lētāk diagnosticējot VS citiem pacientiem.

Ja izdotos atrast citu gēnu ietekmi uz VS 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 saslimšana, 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. Literatūras apskats

1.1. Vara homeostāze eikariotu šūnās

Pēdējā laikā ir novērots liels progress vara metabolismā (uzņemšanā, intracelulārajā izplatībā un izdalē no šūnas) iesaistīto gēnu un to kodēto olbaltumvielu identifikācijā (Kim, Nevitt and Thiele, 2008; Cobine, Pierrel and Winge, 2006; Lutsenko et al., 2007).

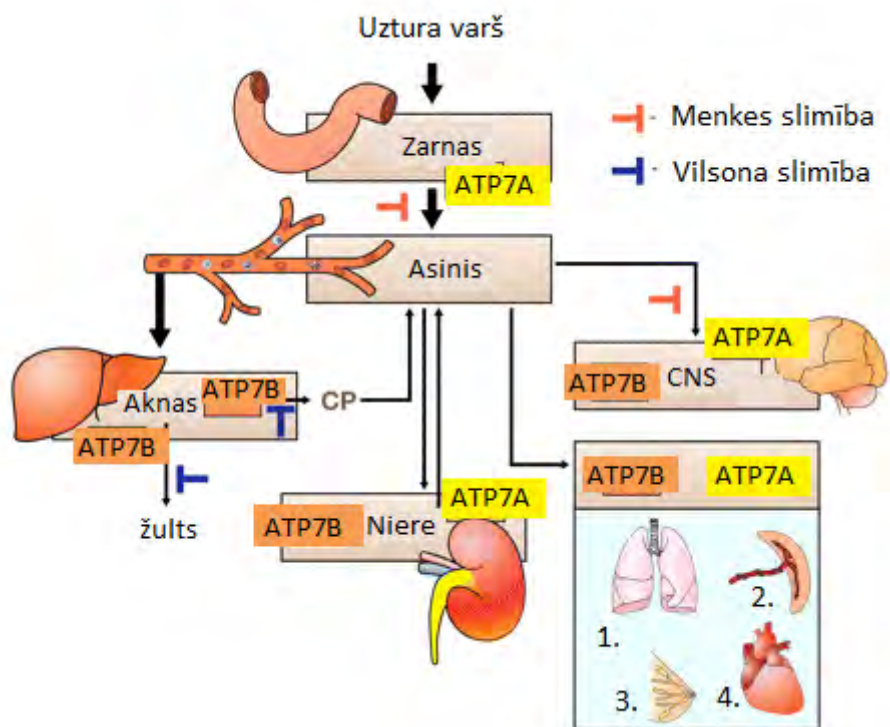
1.1.1. Vara sadale audos

Vara uzņemšana zarnās

Varam ir liela loma cilvēka metabolismā, tas ir kā kofaktors metabolajiem enzīmiem, kas ir iesaistīti elpošanā, neirotransmiteru biosintēzē, brīvo radikāļu detoksikācijā, dzelzs vielmaiņā un citos bioķīmiskajos procesos. Vidējā vara dienas deva ar uzturu ir apmēram 1 – 3 mg. Lielākā daļa no vara tiek absorbēta divpadsmitpirkstu zarnā, bet molekulārie ceļi, kas regulē vara uzņemšanu organismā, līdz galam nav skaidri. Zarnu šūnu apikālās membrānas rajonā ir noteikts augstas afinitātes vara transportproteīns – CTR1, kuram ir loma vara uzņemšanā no zarnu dobuma puses, bet šāda proteīna atrašanās vieta ir noteikta tikai peļu mazulim, bet pieaugušiem dzīvniekiem visbiežāk šis proteīns atrodas intracelulāri (Kuo et al., 2006). Šis novērojums, visticamāk, norāda par CTR1 regulējošu, nevis noteicošu lomu vara transportā un/ vai šī proteīna iespējamu iesaisti vara eksportā no šūnas, no intracelulārās vides.

Viens no citiem vara transporta proteīnu kandidātiem ir relatīvi neselektīvais, bivalentais metāla transporteris DMT1 (Arredondo et al., 2003), kurš piedalās dzelzs uzņemšanā no uztura. Pētījumos ar kultivētām šūnām, kurās DMT1 tika izslēgts ar siRNS palīdzību, novēroja ievērojamu dzelzs un vara uzņemšanas samazināšanos (Arredondo et al., 2003). Visbeidzot, vara uzņemšanā svarīgu lomu var spēlēt tāds mehānisms kā pinocitoze (Mann, Camakaris and Danks, 1979), galvenokārt, gremošanas trakta nobriešanas laikā.

No enterocītiem asinīs varš tiek eksportēts ar ATPāzi – ATP7A (skat. 1.1. attēlu). Menkes slimības (*MIM#* 309400, *SSK10 – E83.0*) gadījumā ATP7A ir inaktivēts un vara eksports no enterocītiem ir traucēts, kā rezultātā varš uzkrājas zarnu šūnās un asinīs nokļūst mazāk vara, kas noved pie vara trūkuma citos audos (Kodama, Murata and Kobayashi, 1999).



1.1. attēls. **Vara sadale organismā** (Lutsenko et al., 2007).

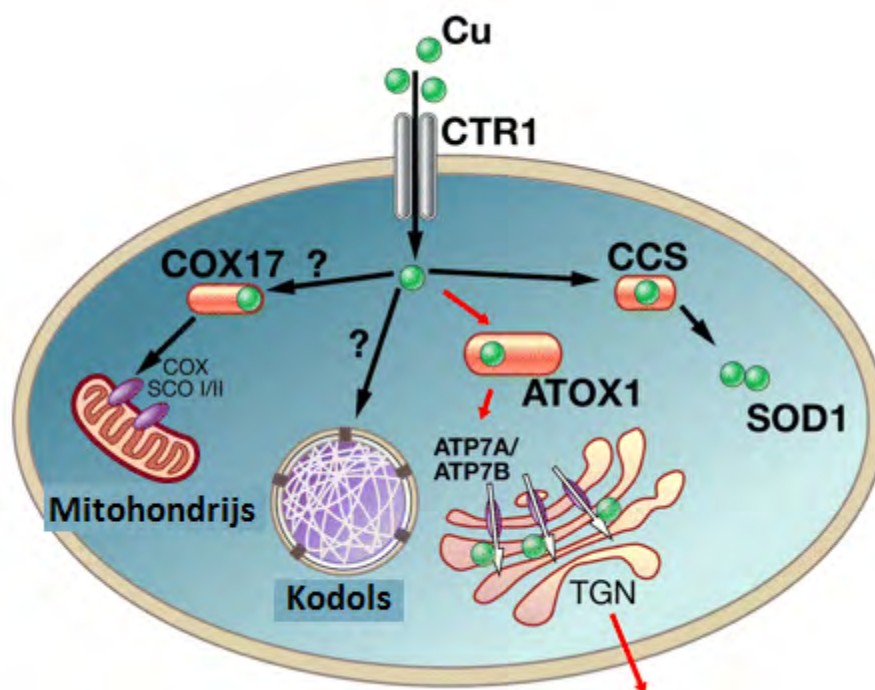
1. Plaušas; 2. Placenta; 3. Piena dziedzeris; 4. Sirds; CP – ceruloplazmīns. Ar  un  simboliem atzīmēts konkrētā bioķīmiskā procesa bloķējošs efekts.

Varš iekļūst šūnā, migrē caur to un tad tiek eksportēts no šūnas reducētā formā – Cu (I) (Ralle, Lutsenko, and Blackburn, 2003; Wernimont, Yatsunyk and Rosenzweig, 2004). Lai vai kā – gan zarnu lūmenā, gan asinīs varš pārsvarā ir oksidētā formā – Cu (II), tāpēc varam jātiek reducētam pirms iekļūšanas šūnā un oksidētam, kad tas izkļūst no šūnas. Truša enterocītos ir pierādīta īpaša citohroma (citohroma b558) esamība ar reduktāzes aktivitāti, kam varētu būt liela loma arī vara uzņemšanai cilvēka organismā (Knopfel and Solioz, 2002). Līdz galam nav skaidrs, vai oksidāzes aktivitāte ir nepieciešama vara izkļūšanai no šūnas, un, vai vara transportam ar ATP7A un ATP7B proteīniem ir nepieciešama šāda vara oksidēšana (Linder et al., 1998).

ATP7B proteīna loma organisma vara homeostāzes regulācijā hepatocītos

Lielākā daļa no vara, kas uzsūcas zarnās, ar asinīm nokļūst aknās, bet mazākā daļa – nierēs un citos audos (Linder et al., 1998). Aknas ir vara homeostāzes centrālais orgāns, kas primāri ir atbildīgs par liekā vara izvadīšanu no organisma (skat. 1.1. attēlu). Vara uzņemšana aknās nav izteikti regulēta, turpretī – vara izvadīšana no aknām ir vara atkarīgs, regulēts process, kuru regulē vara transportējošais proteīns, ATPāze – ATP7B. Pēc iekļūšanas hepatocītā varš tiek izplatīts dažādās intracelulārajās daļās (skat. 1.2. attēlu). Citosolā varu

utilizē ar radikāļu detoksicējošā enzīma – vara un cinka atkarīgās superoksīda dismutāzes (SOD1) palīdzību, kas uzņem varu ar speciāla metālšaperona – superoksīda dismutāzes vara šaperona (CCS) palīdzību (Culotta, Yang, and O’Halloran, 2006). Varš nokļūst arī mitohondrijos, kur tas tiek iesaistīts citohroma c oksidāzes (COX) struktūrā, bet mehānisms, kā tas tieši notiek, nav līdz galam izpētīts, lai arī ir aprakstīti vairāki iespējamie proteīni, kas varētu būt iesaistīti šajā procesā (Prohaska and Gybina, 2004; Punter and Glerum, 2003). Varš iekļūst šūnā caur augstas afinitātes vara transportieri – CTR1 un piesaistās vara šaperoniem citosolā. COX17 varētu piedalīties vara nogādāšanā mitohondrijā, lai arī pēdējā laikā tas tiek apšaubīts, un kopā ar SCO proteīnu sekmē vara apvienošanos ar citohroma c oksidāzi (COX). CCS pārnes varu uz SOD1 citosolā. Sarkanās bultiņas norāda ceļu, kurā vara atkarīgajām ATPāzēm ir liela loma. Šajā ceļā vara atkarīgās ATPāzes saņem varu no ATOX1, pārnes varu sekretorā ceļa lūmenā, kā arī eksportē vara pārpalikumu no šūnas (Lutsenko et al., 2007). Intracelulāros vara sadales ceļus skat. 1.2. attēlā.



1.2. attēls. **Intracelulārie vara sadales ceļi** (Lutsenko et al., 2007)

Cu – varš; CTR1 – vara transportējošais proteīns; COX – citohroma c oksidāze; SCO – citohroma c oksidāzes sintēzes proteīns; TGN – Goldži kompleksa *trans* daļa; CCS – superoksīda dismutāzes vara šaperons; SOD1 – cinka atkarīga superoksīda dismutāze; ATOX1 – citosolisks vara šaperons.

Trešais nozīmīgais vara mērķis šūnā ir tā sekretorais ceļš. Goldži kompleksa *trans* daļas, saturošas vara ATPāzes (ATP7B hepatocītos), saņem varu no citosola vara šaperona ATOX1 (Iqbal Hamza, Prohaska and Gitlin, 2003; Hamza et al., 2001; Walker, Tsivkovskii and Lutsenko, 2002). ATPāze tad pārnes varu caur membrānai sekretoro ceļu lūmenā, kur

varš tiek sasaistīts ar vara atkarīgo ferrooksidāzi – ceruloplazmīnu (CP) (skat. 1.1. attēlu), kas no hepatocītiem tiek sekretēts asinīs. Ceruloplazmīns ir galvenais varu saturošais proteīns serumā, lai gan tam nav, šķiet, lielas lomas vara metabolismā, jo pētījumā ar CP izslēgšanu (*knock-out*) pelēm, tās neuzrādīja vara homeostāzes traucējumus, lai gan varš uzkrājās aknās. Pētījuma autori to skaidro ar īpašu nodalījumu aknu šūnās, kur uzkrājas ceruloplazmīnam paredzētais varš – ja ceruloplazmīna nav, varš uzkrājas šajā īpašajā nodalījumā (Meyer et al., 2001).

Liekais citosolā esošais varš tiek ekskretēts ar žulti, kam ir nepieciešams ATP7B proteīns. ATP7B atkarīgā vara ekskrēcija žultī (pēc tam – fēcēs) ir galvenais vara izvades veids no organisma. Vilsona slimības pacientiem ir traucēti abi vara izvades veidi no hepatocīta – sekretorais un ar žulti, kas rezultējas vara uzkrāšanās aknās, samazinātā ceruloplazmīna līmenī asinīs, jo varš netiek sekretēts ārā no hepatocītiem, kā arī samazinātā vara līmenī žultī (Lutsenko et al., 2007).

Vara sastopamība ārpus aknu audiem

Eksperimentos ar pelēm, izmantojot radioaktīvu varu, atklājās, ka varš asinīs paaugstinās divos viļņos: pirmais pacēlums (pēc divām stundām) atbilst vara uzsūkšanās zarnās, bet otrais vilnis (pēc apmēram sešām stundām) reprezentē vara saistīšanos ar ceruloplazmīnu, ko sekretē aknas. Tiek uzskatīts, ka viss seruma varš saistās ar nesējproteīniem vai, iespējams, zem molekulāriem komponentiem, piem., transkupreīnu (Lutsenko et al., 2007).

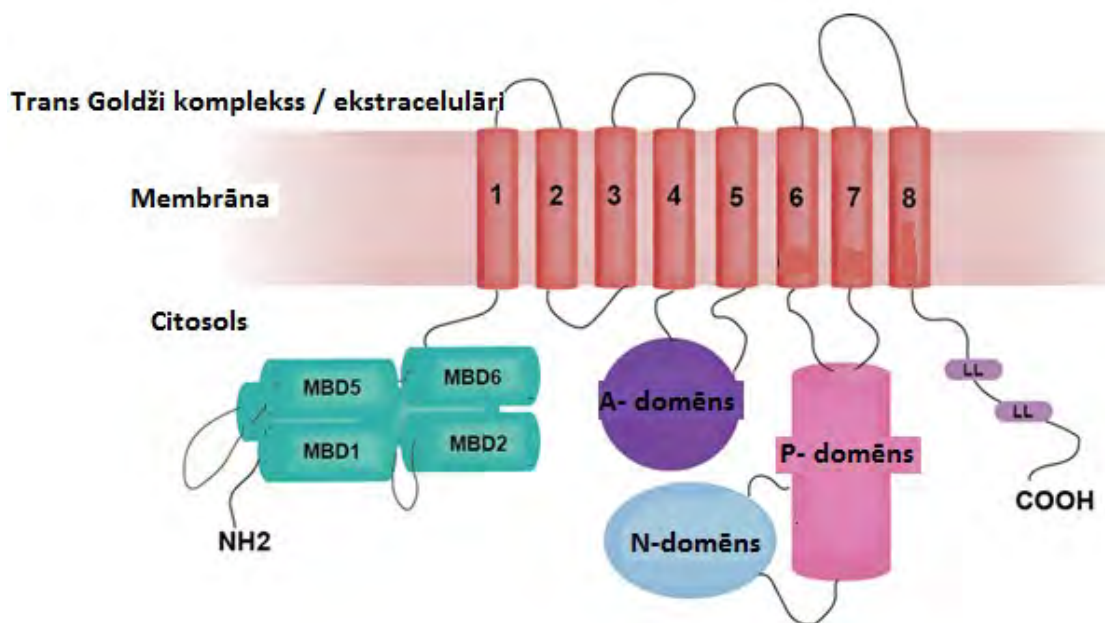
Kad varš tiek nogādāts dažādos orgānos, tas tiek izmantots, lai ražotu vara atkarīgos enzīmus ar vispārējām (piem., citohroma c oksidāze vai superoksīda dismutāze) vai audu specifiskām funkcijām (piem., dopamīna β hidroksilāze virsnierēs, peptidilglicīna α monooksigenāze hipofīzē (Steveson et al., 2003) vai tirozināze melanocītos). Proteīni, kas regulē vara izplatību šūnās, liekas, ir vienādi visos audos, bet daži orgāni ekspresē tikai vienu no ATPāzēm (piem., virsnierēs tikai ATP7A vai aknu šūnās tikai ATP7B), un šajos audos viena ATPāze pilda gan biosintēzes, gan vara eksporta funkcijas (Lutsenko et al., 2007). Liela daļa audu, piemēram, galvas smadzenes, nieres, placenta, piena dziedzeri, acis, plaušas u.c. ekspresē abas vara atkarīgās ATPāzes. Vara atkarīgās ATPāzes ekspresijas specifiskās šūnās, kā arī abu vara atkarīgo ATPāžu esamība vienās un tajās pašās šūnās varētu būt saistīta ar ATP7A un ATP7B dažādām funkcionālām īpašībām vai to dažādo darbības regulāciju. Zarnās abas vara atkarīgās ATPāzes tiek ekspresētas (Bauerly, Kelleher and Lonnerdal, 2005; Kuo, 1997), bet ATP7B nekompensē ATP7A funkcijas zudumu. Turpretī peļu modeļos ar *ATP7B*

izslēgšanu (*ATP7B* ekspresija ir nobloķēta) Atp7a kompensē otra proteīna funkcijas zudumu. Katras ATPāzes specifiskas funkcijas noteikšana ir svarīga, lai labāk saprastu ATP7A un ATP7B inaktivācijas sekas dažādos audos, kā, piemēram, plaušās, sirdī un nierēs (La Fontaine et al., 1998).

1.2. ATP7B proteīna un gēna organizācija

1.2.1. ATP7B proteīna uzbūve

ATP7B proteīnam ir tipiska P tipa ATPāzes uzbūve ar citosola daļu, ko veido fosforilēšanas (P), ATP saistošais (N) un aktuatora / defosforilācijas (A) domēns, un membrāno daļu, ko veido astoņas transmembranālas cilpas (transmembrānu domēni (TMD)), kas veido vara kanālu membrānā (Banci et al., 2009). Šī daudz domēnu saturošā proteīna unikāla strukturāla pazīme ir liela citosolā esoša N gala aste, ko veido seši, no 70 aminoskābēm sastāvoši, neatkarīgi salocīti, reducētu varu saistoši domēni, turpmāk saukti par metālu saistošiem domēniem – MBD (skat. 1.3. attēlu) (Banci et al., 2009; LeShane et al., 2010).



1.3. attēls. ATP7B proteīna uzbūve – attēloti lielie, funkcionālie domēni

ATP7B proteīns sastāv no trīs citosolā esošiem domēniem; nukleotīdu saistošā domēna (N domēna); fosforilācijas domēna (P domēna) un aktuatora / defosforilācijas domēna (A domēna).

N un P domēnu kombinācija tiek saukta par ATP-saistošo domēnu. MBD – metālus saistošie domēni. LL – leicīnu saturošie domēni (Arioz, Li, and Wittung-Stafshede, 2017).

MDB tiek numurēti no N gala, kur MBD1 ir tuvāk N galam, bet MBD6 – tuvāk ATP7B membrānu caurejošām daļām. Domēnus savieno dažāda garuma peptīdu savienotāji (Arioz, Li and Wittung-Stafshede, 2017).

1.2.2. *ATP7B* gēna uzbūve un Vilsona slimību izraisošie alēliskie varianti

Pilnīga *ATP7B* gēna eksonu – intronu struktūra tika atklāta 1994. gadā (Petrukhin et al., 1994). Gēna cDNS sekvences un genomiskā informācija ir pieejama *Ensemble Genome* mājas lapā (Ensembl Genome Browser 94, n.d.).

ATP7B (OMIM[#] 606882) gēns atrodas 13. hromosomā (13q14.3), tā genomiskais garums ir 80 kb, kura sastāvā ir 21 eksons, kuru garumi variē no 77 līdz 1234 bp, atkarībā no transkripta, bet starta kodons atrodas 1. eksonā (Petrukhin et al., 1994). *ATP7B* gēns kodē varu transportējošo P tipa ATPāzi (Vilsona ATPāzi), sastāvošu no 1465 aminoskābēm (Bull et al., 1993). Proteīns tiek sintezēts endoplazmatiskajā tīklā un tad lokalizējas trans Goldži kompleksā, pārsvarā hepatocītos. Dažāda līmeņa ATP7B ekspresija var būt arī galvas smadzenēs, nierēs, plaušās un placentā.

VS izraisa alēliskie varianti, kas var traucēt jebkuru ATP7B katalītiskā cikla soli, un beigu ietekme uz proteīnu var variēt no vieglas līdz smagai atkarībā no tā, kura proteīna daļa ir izmainīta (Huster et al., 2012).

Līdz šim brīdim Cilvēka gēnu mutāciju databāzē (*Human Gene Mutation Database* (HGMD)) ir ziņoti vairāk nekā 800 alēliskie varianti ar novērotiem klīniskajiem simptomiem, bet alēlisko variantu izraisīto simptomu lielā dažādība bieži vien apgrūtina VS agrīnu klīnisko diagnostiku (Jang et al., 2017; Braiterman et al., 2015; Dong et al., 2016). Visbiežāk – 60 % gadījumu – ir sastopami aminoskābes nomaiņas un terminējošie alēliskie varianti, ko izraisa viena nukleotīda izmaiņas, 26 % gadījumu ir sastopamas nukleotīdu insercijas / delēcijas un 9 % gadījumu – splaisa saita alēliskie varianti (Chen et al., 2015). Vilsona slimību izraisošie alēliskie varianti pārsvarā atrodas rajonā no 8. līdz 18. eksonam, kamēr alēliskie varianti rajonā no 2. līdz 5. eksonam, kas biežāk asociējas ar smagu fenotipu, biežāk sastopami indiešu populācijās (Z.-Y. Wu et al., 2001; Payne, Kelly and Gitlin, 1998). Ķīniešu populācijās VS izraisošie alēliskie varianti biežāk sastopami 2., 5., 8.–13., 16., 18. un 19. eksonā (Wang et al., 2011). Lielākā daļa alēlisko variantu, atrasti VS pacientiem, lokalizēti noteiktās ATPāzes serdes daļās, īpaši transmembranālajā daļā (atbilst *ATP7B* gēna 6.–13. un 18.–20. eksonam) (Huster et al., 2012; Forbes and Cox, 1998), bet daži no alēliskajiem variantiem ir atrasti arī citās ATPāzes struktūrās (piem., A domēnā, MBDi (atbilst *ATP7B*

gēna 2.–6., 14.–18. eksonam). Trīs visbiežāk sastopamie alēliskie varianti ir: R778L (rs28942074), atrodas TMD4, tuvu A domēnam – pasaulē visbiežākais alēliskais variants (58 % VS gadījumu), galvenokārt, sastopams pacientiem no Āzijas dienvidu un austrumu reģioniem (lielākoties no Korejas un Ķīnas); H1069Q (rs76151636), sastopams N domēnā – otrs biežākais alēliskais variants (35–45 % VS gadījumu), visbiežāk sastopams Eiropas un Ziemeļamerikas reģionos; R778W (rs137853284, sastopams transmembranālajā domēnā) – trešais biežākais alēliskais variants, kas biežāk sastopams Indijas reģiona populācijās (Hedera, 2017; Jang et al., 2017; Inesi, Pilankatta and Tadini-Buoninsegni, 2014).

Simptomu un to parādīšanās vecuma dažādības dēļ zināšanas par *ATP7B* gēna alēlisko variantu saistību ar simptomiem vēl joprojām ir nepārliecinošas. Dāņu pētījumā patogēnie alēliskie varianti atkarībā no slimības pirmo simptomu parādīšanās vecuma tiek klasificēti kā “nopietnie” – slimības pirmie simptomi parādās pirms 20 gadu vecuma, un “vidējie” – slimības simptomi parādās pēc 20 gadu vecuma (Moller et al., 2011). Vairākos pētījumos – gan bioloģiskajos / bioķīmiskajos un biofizikālajos, VS izraisītie alēliskie varianti ir raksturoti ar dažādu ietekmi uz *ATP7B* proteīna funkcijām (Braiterman et al., 2015; Chen et al., 2015). Visbiežāk novērotais efekts ir nepareiza proteīna trešējās struktūras izveidošana, kā rezultātā *ATP7B* paliek endoplazmatiskajā tīklā ar nozīmīgi samazinātu proteīna stabilitāti, kas rezultējas vara transporta zudumā šūnā (Concilli et al., 2016; Tsivkovskii, Efremov and Lutsenko, 2003). Vēl ir ziņoti arī tādi efekti, kā nepareiza proteīnu mijiedarbība, samazināts / palielināts fosforilēšanas statuss, izmainīta ATP saistīšanās spēja ar varu, izmainīta proteīna konformācija vai celulārā lokalizācija un pūslīšu (vezikulu) transporta kļūdas (Chen et al., 2015).

1.3. Vilsona slimības epidemioloģija

Vilsona slimība ir izplatīta visā pasaulē, ar noteikto prevalenci – 1 : 30 000 no dzīvi dzimušajiem lielākajā daļā populāciju (Huster, 2010), lai gan populācijas skīninga datos no Lielbritānijas parādās potenciāli lielāka prevalence – 1 : 7021 (Coffey et al., 2013). Pieņemot, ka slimības prevalence ir no 1 : 10 000 – 1 : 30 000, *ATP7B* gēna patogēnā varianta nesēju heterozigotiskā stāvoklī skaits ir apmēram 1 no 90. Atsevišķās, izolētās populācijās, slimības prevalence ir augstāka. Viena no lielākajām prevalencēm ir ziņota no kāda maza kalnu ciema Krētā, kur Vilsona slimība tika diagnosticēta vienam no 15 jaundzimušajiem (Dedoussis et al., 2005). Paaugstinātā prevalence, visticamāk, ir saistīta ar lielu radnieku laulību sastopamības biežumu konkrētajā ciemā. Pētījumā, kurā izmantoti lielas franču kohortas dati,

atklājās, ka aptuveni viens cilvēks no 31 ir heterozigots nesējs (Collet et al., 2018), un tas atbilst paredzamajai slimības prevalencei vienā gadījumā no 1000 dzīvjiem dzimušajiem. Neatbilstība starp heterozigotu nesēju biežumu un novēroto Vilsona slimības prevalenci liecina par nepilnīgu penetranci, taču ir nepieciešams turpināt pētīt slimības specifiskos patogēnos alēliskos variantus.

Daži pētījumi liecina, ka Vilsona slimība vienādi skar gan vīriešus, gan sievietes, lai gan Vilsona slimības dēļ sievietēm biežāk nekā vīriešiem attīstās akūta aknu mazspēja (Beinhardt et al. 2014; Litwin, Gromadzka, and Czlonkowska, 2012). Tomēr lielā reģistra pētījumā, kurā piedalījās 627 pacienti ar Vilsona slimību, atklājās, ka vīriešu pārsvars ir neliels (52 %). Diagnostikas laikā simptomātisku pacientu vidū vīriešiem neiropsihiatriska slimība bija sastopama biežāk nekā sievietēm (75 pret 58 %), bet retāk – aknu slimība (25 pret 41 %) (Schilsky, n.d.).

1.4. Vilsona slimības klīniskās izpausmes

1.4.1. Simptomu sākšanās vecums.

Vilsona slimība var izpausties jebkurā vecumā, lai gan lielākajā daļā gadījumu pirmie simptomi parādās vecumā no pieciem līdz 35 gadiem. Jaunākais aprakstītais pacients ar izmainītām aknu funkcijām Vilsona slimības dēļ bija astoņus mēnešus vecs bērns (Abuduxikuer et al., 2015). Apmēram 3 % pacientu simptomi parādās pēc 40 gadu vecuma (Ferenci et al., 2007), bet vecākajiem pacientiem pirmie simptomi parādās viņu dzīves astotajā dekādē (Ala et al., 2005; Weitzman et al., 2014).

1.4.2. Fizikālās pazīmes

Vilsona slimībai ļoti raksturīga pazīme ir Kaizera–Flaišera gredzens, kas ir sastopams 95 % pacientu ar neiroloģiskajiem simptomiem un mazliet vairāk kā pusei pacientu bez neiroloģiskajiem simptomiem (Gow et al., 2000). Bērniem ar aknu slimību Kaizera–Flaišera gredzenu parasti nenovēro (EASL, 2012). Kaizera–Flaišera gredzenu izraisa vara izgulsnēšanās radzenē. Lai to identificētu, ir nepieciešama izmeklēšana ar spraugas lampu, ko, vēlams, veic pieredzējis speciālists. Šie gredzeni nav pilnībā specifiski tieši Vilsona slimībai, jo tos var atrast arī pacientiem ar hroniskām holestātiskām slimībām, ieskaitot bērnus ar jaundzimušo holestāzi. Citas acu izmaiņas ir retas, iekļaujot “saulespuķes” kataraktu, ko

izraisa vara izgulsnēšanās lēcas centrā, ko arī var diagnosticēt ar spraugas lampas palīdzību (EASL, 2012).

Neiroloģiskie simptomi ir variabli, visbiežāk – trīce, ataksija un distonija. Aknu slimības simptomi ir nespecifiski, bet jebkura neskaidras izcelsmes aknu slimība var tikt uztverta kā Vilsona slimība, līdz nav pierādīts pretējais. Diagnostiskā modrība aknu slimības gadījumā ir ļoti svarīga, jo Kaizera–Flaišera gredzens var nebūt līdz pat 50 % pacientu ar Vilsona slimību, ja tā skar tikai aknas (Gow et al., 2000).

1.4.3. Aknu slimība

Vilsona slimības pacientiem var būt jebkāda veida aknu slimība. Klīniski pierādīta aknu slimība var apsteigt neiroloģiskos simptomus par apmēram 10 gadiem, un lielākajai daļai pacientu ar neiroloģiskajiem simptomiem ir arī kādas pakāpes aknu slimības forma. Aknu slimības simptomi var būt ļoti variabli, sākot ar asimptomātiskiem, tikai ar bioķīmiskām izmaiņām, beidzot ar aknu cirozi un ar visām tās komplikācijām. Vilsona slimība var arī izpausties kā akūta aknu mazspēja, kas reizēm ir kopā ar Kumbsa negatīvu hemolītisku anēmiju un akūtu nieru mazspēju. Pacienti ar diagnosticētu Vilsona slimību, kuriem anamnēzē ir bijusi dzelte, var būt piedzīvojuši hemolīzes epizodi (EASL, 2012). Pirmie simptomi var būt dažādi: dzelte, anoreksija, vemšana, ascīts, tūska, varikozā asiņošana, hemorāģiskā diastēze, hemolīze, hepatomegālija, splenomegālija, bet slimība var noritēt arī asimptomātiski jau pie aknu bojājuma (Roberts and Schilsky, 2003; Ferenci et al., 2003).

Akūta aknu mazspēja (agrāk – zibensveida hepatīts)

VS jāapsver diferenciāldiagnostikā jauniem pacientiem ar akūtu hepatītu, kura klīniskās izpausmes nav atšķiramas no akūta virāla hepatīta ar dzelti un abdominālu diskomfortu. Dažiem pacientiem simptomi spontāni izzūd, bet tikko kā Vilsona slimība tiek diagnosticēta, ir nepieciešama ārstēšana mūža garumā. No otras puses, slimība var progresēt līdz akūtai aknu mazspējai.

Vilsona slimība ir diagnosticēta 6–12 % no visiem pacientiem ar akūtu aknu mazspēju, kas bija nosūtīti uz ārkārtas aknu transplantāciju (Eisenbach et al., 2007). Lai gan lielākajā daļā gadījumu ciroze jau bija attīstījusies, klīniskie simptomi ir akūti un ātri progresē līdz aknu un nieru mazspējai, kas neārstēšanas gadījumā 95 % gadījumu izraisa nāvi. Akūta aknu mazspēja Vilsona slimības gadījumā pārsvarā sastopama jaunām sievietēm (sieviešu un vīriešu attiecība ir 4 : 1) (EASL, 2012). Akūtas izpausmes ar ātru progresēšanu var būt arī

pacienti, kas ir tikuši ārstēti, bet pārtraukuši ārstēšanu (Eisenbach et al., 2007). Aizdomas par akūtu Vilsona slimību parasti ir pacientiem ar izteiktu dzelti, samazinātu hemoglobīna un holīnesterāzes līmeni (Eisenbach et al., 2007), tikai nedaudz paaugstinātu transamināžu un samazinātu sārmainās fosfatāzes līmeni.

Hronisks hepatīts un ciroze

Daudziem pacientiem ir hroniskas aknu slimības pazīmes – gan kompensētā, gan dekompensētā stadijā. Pacientiem var būt izolēta splenomegālija sakarā ar nenosakāmu cirozi ar portālo hipertensiju. Klīniskā aina var būt grūti atšķirama no citām hroniska aktīva hepatīta formām ar simptomiem, kas ietver dzelti, vispārēju nogurumu un neskaidrām sūdzībām par abdominālo rajonu (EASL, 2012).

1.4.4. Hemolīze

Hemolītiskā anēmija ar negatīvu Kumbasa reakciju var būt kā vienīgais pirmais Vilsona slimības simptoms, lai gan nozīmīga hemolīze parasti saistās ar nopietnu aknu slimību. Aknu šūnu sabrukšana var novest līdz uzkrātā vara atbrīvošanās lielā daudzumā, kas tikai pasliktina hemolīzi. Kādā pētījumā hemolīze kā galvenais simptoms bija 25 pacientiem (12 %) no 220, kuriem hemolīze notika vai nu kā atsevišķs, akūts notikums, vai atkārtoti kā zemas pakāpes hroniska hemolīze. Starp 283 Japānas Vilsona slimības pacientiem tikai trim bija izolēta hemolīze (EASL, 2012). Ceturtajai daļai pacientu ar dzelti bija arī hemolīze. Akūta aknu mazspēja un hemolīze var būt dzemdību laikā, imitējot *HELLP* sindromu (H – hemolīze; EL – paaugstināts aknu enzīmu līmenis; LP – zems trombocītu skaits) (Czlonkowska et al., 2010). Zemas pakāpes hemolīze var būt sastopama Vilsona slimības gadījumā pat bez klīniski pierādītas aknu slimības. Daži pacienti ar neiroloģiskiem simptomiem ir ziņojuši par pārejošām dzeltes epizodēm, kas, iespējams, bijušas hemolīzes dēļ (EASL, 2012).

1.4.5. Neiroloģiskie simptomi

Vilsona slimība var izpausties ar iespaidīga spektra neiroloģiskajiem, uzvedības vai psihiatriskajiem traucējumiem, kas var būt slimības pirmās izpausmes, parādīties kopā ar aknu slimības pazīmēm vai vairākus gadus pēc tām. Neiroloģiskie simptomi var būt neizteikti, intermitējoši vairākus gadus, bet var attīstīties arī ļoti ātri, dažu mēnešu laikā novedot līdz pilnīgai invaliditātei. Neiroloģiskie traucējumi var tikt klasificēti kā: (1) Parkinsona slimībai

līdzīgs akinētiski rigīdais sindroms; (2) pseidoskleroze ar dominējošu trīci; (3) ataksija un (4) distoniskais sindroms. Daudzos gadījumos neiroloģiskos traucējumus ir grūti klasificēt, jo pacientiem var būt vairāk par vienu traucējumu, un katrs var būt dažādā smaguma pakāpē (EASL, 2012).

Raksturīgā trīce ir rupja, neregulāra proksimālo muskuļu drebēšana ar “spārna dauzīšanās” parādīšanos. Distonija var būt fokāla, segmentāra vai ļoti smaga, kad iesaistītas ir visas ķermeņa daļas, kas noved līdz nopietnām kontraktūrām. Ļoti bieži motorie traucējumi ietver kraniālo reģionu un izpaužas kā dizartrijs (var būt cerebellāra vai ekstrapirimidāla, kas noved līdz afonijai), siekalošanās vai orofaringeāla distonija. Raksturīgas izpausmes ir sejas grimašu veidošana, atvērts žoklis, siekalošanās un lūpas atvilkšana. Runas izmaiņas un nekontrolēta siekalošanās bieži ir agrīnie neiroloģiskie simptomi. Trīces–rigiditātes sindroma (“juvenilā Parkinsonisma”) gadījumā vajadzētu būt aizdomām par Vilsona slimību (Svetel et al., 2009).

Pieaugošās kustību kontroles zaudēšanas un progresējošas distonijas dēļ pacienti kļūst “piekalti gultai” un nespēj par sevi parūpēties, vai arī pacienti ir tramīgi, bet nespēj parunāt. Pacientiem, kuriem ir arī aknu slimība, neiroloģiskie simptomi var tikt sajaukti ar aknu encefalopātiju (EASL, 2012).

1.4.6. Psihiatriskie un uzvedības simptomi

Bieži ir uzvedības un psihiskie simptomi, un daži no tiem var būt pirms neiroloģiskām vai aknu pazīmēm un simptomiem. Apmēram trešdaļai pacientu sākotnēji ir psihiskas novirzes. Bērniem ar Vilsona slimību tiek novērota sekmju pasliktināšanās skolā, personības izmaiņas, impulsivitāte, labils garastāvoklis, seksuālais ekshibicionisms un neatbilstoša izturēšanās (Svetel et al., 2009).

Sākotnējie simptomi bieži tiek nepareizi diagnosticēti kā uzvedības problēmas, kas saistītas ar pubertāti. Gados vecākiem cilvēkiem var novērot psihozes, kas atgādina paranoju, šizofrēniju vai depresiju, bet bieži ir arī uzvedības izmaiņas. Pacientiem ar progresējošu neiroloģisku slimību tiek novērota nopietna kognitīvā stāvokļa pasliktināšanās, bet kopumā kognitīvā funkcija nav izteikti traucēta (Seniow et al., 2002).

Bieži Vilsona slimības diagnosticēšana pacientiem ar neiropsihiskiem traucējumiem ir novēlota, un vienā gadījumā diagnostika ilga 12 gadus (Merle et al., 2007). Pacientiem ar neiropsihiskiem simptomiem var būt vienlaicīga simptomātiska aknu slimība, bet lielākajai daļai pacientu aknu slimību var noteikt tikai ar laboratorijas novērtējumu, aknu

attēlā diagnostikas pētījumiem vai ar aknu histoloģiskajiem izmeklējumiem. Apmēram pusei pacientu ir progresējoša fibroze vai atklāta ciroze. No otras puses, veicot biopsiju, var pat pilnībā nebūt aknu slimības pazīmju (EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's Disease, n.d.).

1.4.7. Citas klīniskās izpausmes

Daudz retākas klīniskās izpausmes ietver gigantismu, nieru slimību, ieskaitot aminoacidūriju un nierakmeņus, hiperkalciūriju un nefrokalcinozi, kardiomiopātiju, miopātiju, hondrokalcinozi un osteoartrītu, hipoparatireoidismu, pankreatītu, neauglību un spontānos abortus (EASL, 2012).

1.5. Vilsona slimības fenotipu daudzveidība un klīnisko simptomu modificējošie faktori

Kādā pētījumā, salīdzinot divus monozigotisko dvīņu pārus ar vienādu *ATP7B* gēna genotipu, tika aprakstīts, ka klīniskie simptomi dvīņiem atšķiras (Czlonkowska, Gromadzka and Chabik, 2009), liekot noprast, ka bez alēļu heterogenitātes ir jābūt citiem faktoriem, kas izraisa Vilsona slimības fenotipisko daudzveidību (Ferenci et al., 2011; Litwin et al., 2012). Pētījumā, kas veikts izolētā, kalnos mītošā populācijā Rumānijā ar augstu Vilsona slimības prevalenci, *ATP7B* gēns tika sekvenēts septiņiem pacientiem un 43 viņu ģimenes locekļiem, un tika meklēta genotipa–fenotipa korelācija (Cocos et al., 2014). Tika atklāts, ka slimības sākums, dominējošās klīniskās izpausmes un diagnozes noteikšanas laiks starp pārbaudītajiem indivīdiem ir līdzīgs, norādot, ka vides faktoriem, bet nav zināms, kādiem tieši, varētu būt loma slimības izpausmē. Acīmredzot genotipa–fenotipa saistība ir daudzu faktoru ietekmēta (Okada et al., 2000; Liu et al., 2004; Lee et al., 2011), un ir grūti noteikt tiešu genotipa–fenotipa korelāciju Vilsona slimības pacientiem (F. Wu et al., 2015).

Bez alēļu heterogenitātes, epiģenētiskās atšķirības arī var ietekmēt Vilsona slimības klīnisko izpausmju dažādību. DNS metilācija ir viens no gēnu regulācijas galvenajiem mehānismiem. S adenozilmetionīns (SAM) ir metilgrupas donors. DNS metilācija tiek panākta ar DNS metiltransferāžu (DNMTs) palīdzību. S-adenozilhomocisteīns (SAH) ir gan transmetilācijas produkts, gan tās inhibitors (Krijt, Duta and Kozich, 2009), un S adenozilhomocisteīnāze (AHCY) ir SAH hidrolāze. Vilsona slimības modelī ar Džeksona toksiskā piena peļu modeli AHCY transkripta līmenis negatīvi korelēja ar vara uzkrāšanos (Le et al., 2014). Vara uzkrāšanās aptur SAH hidrolīzi un noved līdz SAH intracelulārās

uzkrāšanās, kas, savukārt, inhibē *DNMT* transkripciju (Tao et al., 2008), samazina metilāciju (Medici et al., 2013), kam seko gēna ekspresijas izmaiņas. Starp pacientiem bez aknu patoloģijas un pacientiem ar hronisku hepatītu, cirozi un hepatocelulāru karcinomu ir novērota nozīmīga atšķirība *DNMT* ekspresijas līmeņos (Oh, B. et al., 2007).

Aknu steatoze ir izplatīts Vilsona slimības simptoms. Iepriekšējos pētījumos ir novērots, ka palielināts intracelulārā vara līmenis varētu inhibēt lipīdu, pārsvarā holesterola, sintēzi (F. Wu et al., 2015). Lai analizētu holesterola metabolismu, tika izveidots Vilsona slimības dzīvnieku modelis (peles ar *Atp7b* izslēgšanu), kur tika novērota nozīmīga holesterola sintēzes samazināšanās. Šajā pašā modelī tika novērota arī sterola regulatorā – saistošā proteīna 2 mērķgēna (*Srebp-2*) – transkripcijas faktora, kas aktivizē holesterola biosintēzi, nozīmīga ekspresijas samazināšanās. Tika izteikts minējums, ka vara uzkrāšanās inhibē *Srebp-2* funkciju (Huster et al., 2007).

1.5.1. Citu gēnu alēlisko variantu iespējamā ietekme uz Vilsona slimības fenotipu

***ATOX1* gēna un proteīna uzbūve, funkcijas**

ATOX1 (OMIM #602270) gēns atrodas 5. hromosomā (5q33.1), references secība – NC_000005 (no 151742822. līdz 151758649. nukleotīdam). Tā kodētā mRNS (NM_004045.3) sastāv no četriem eksoniem, no kuriem kodējošie ir pirmie trīs, garumā no 104 līdz 171 bāzu pāriem. Starta kodons sākas no pirmā eksona 99. nukleotīda (no pirmā eksona pēdējie seši nukleotīdi ir kodējoši). Gēna kodētais proteīns (NP_004036.1) sastāv no 68 aminoskābēm (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

ATOX1 proteīns ir vara šaperons (mazo molekulu korektormolekula), kas nogādā varu pie *ATP7A* un *ATP7B* (*ATPāžu*) metālu saistošajiem domēniem. Zīdītāju šūnās, izmantojot *ATP* hidrolīzē iegūto enerģiju, *ATP7A* vai *ATP7B* (atkarībā no šūnu veida) pārvieto varu no citoplazmas uz Goldži kompleksu, lai tālāk to ievietotu enzīmu sekretorajos ceļos (Iqbal Hamza, Prohaska and Gitlin, 2003) vai, lai izvadītu lieko varu ārpus šūnas. Pelēs *Atox1* gēna delēcija noved līdz intracelulārai vara uzkrāšanās un samazinātai vara – atkarīgo enzīmu (piemēram, tirozināzes) aktivitātei, atbalstot izvirzīto *Atox1* lomu kā metāla donoru varu transportējošajām *ATPāzēm*. (Hamza et al., 1999) Izmaiņas *ATP7B* gēnā, kā zināms, izraisa intracelulāru vara uzkrāšanos un nopietnus aknu un neiroloģiskus bojājumus. Vairāki alēliskie varianti *ATP7B* gēnā izmaina proteīna mijiedarbību starp *Atp7b* un *Atox1*, norādot, ka šīs mijiedarbības ir ļoti svarīgas vara homeostāzē (Hussain, Olson and Wittung-Stafshede, 2008).

Nemot vērā Atox1 svarīgo mijiedarbību ar Atp7b, ir bijuši vairāki pētījumi, kur pētnieki ir meklējuši iespējamās izmaiņas *ATOX1* gēnā Vilsona slimības pacientiem, bet rezultāti visur ir bijuši negatīvi (Simon et al., 2008; Czlonkowska et al., 2018; Lee et al., 2011).

COMMD1 gēna un proteīna uzbūve, funkcijas

COMMD1 (OMIM #607238) gēns atrodas 2. hromosomā (2p15), references secība – NC_000002.12 (no 61888723. līdz 62136070. nukleotīdam). Gēnam ir seši iespējamie mRNS transkriptu un proteīnu varianti (skat. 1.1. tabulu).

COMMD1 proteīns ir vislabāk aprakstītais no COMMD proteīnu ģimenes. Šim proteīnam ir pleiotropa darbība – tas ir iesaistīts daudzu šūnas fizioloģisko procesu regulācijā, kas ietver vara un holesterola homeostāzi, jonu transportu, oksidatīvo stresu, proteīnu agregāciju, proteīnu transportēšanu, hipoksijas inducētu transkripciju, DNS bojājuma atbildes reakciju un onkoģenēzi (Riera-Romo, 2018). COMMD1 ir 21 kDa proteīns, kas sastāv no 190 aminoskābēm. Proteīns ekspresējas dažādos audos, g.k., sēkliniekos, tīmusā un aknās. COMMD1, galvenokārt, atrodas citosolā, bet var tikt atrasts arī kodolā, norādot uz būtisku transportu starp abām vietām (Burstein et al., 2005). Gan kodolā, gan citosolā COMMD1 regulē vairāku proteīnu stabilitāti (Maine and Burstein, 2007).

1.1. tabula

***COMMD1* gēna kodētie transkriptu un proteīnu varianti**
(BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.)

mRNS references secība	Eksonu skaits, garums (bp*)	Kodējošie eksoni	Proteīna references secība	Aminoskābju skaits proteīnā
NM_001321781.1	Trīs eksoni; 120 – 282	2.–3.	NP_001308710.1	124
NM_001321782.1	Trīs eksoni; 113 – 282	2.–3.	NP_001308711.1	124
NM_152516.3	Trīs eksoni; 111 – 282	1.(no 180.nt**) – 3.	NP_689729.1	190
XM_011532558.2	Trīs eksoni; 215 – 1785	1. (no 180.nt) –3. (pirmie 21 nt)	XP_011530860.1	160
XM_017003412.1	Trīs eksoni; 25 – 282	2.–3.	XP_016858901.1	124
XM_011532559.2	Trīs eksoni; 168 – 282	1. (no 165.nt) –3. (pirmie 111 nt)	XP_011530861.1	131

* bp – bāzu pāri; ** nt – nukleotīdi.

Saistībā ar vara homeostāzi *Commd1* gēns tika atklāts Bedlingtonas terjeriem, kas cieš no vara toksikozes. Bedlingtonas terjeriem ir augsta vara toksikozes prevalence, un ir labi dokumentēts, ka viņiem ir traucēta vara izvade ar žulti. Kādā pētījumā Bedlingtonas terjeriem ar vara uzkrāšanos tika atrasts, ka visiem ir *Commd1* gēna 2. eksona delēcija homozigotiskā stāvoklī (van De Sluis et al., 2002). Šo saslimšanu suņiem raksturo vara uzkrāšanās aknu šūnās un traucēta vara izdale žultī, izraisot cirozi un toksisku aknu un smadzeņu bojājumu (Klomp et al., 2003). Izmaiņas *Commd1* gēnā suņiem liecina par iespējamo *Commd1* iesaisti vara uzkrāšanās un izdalē (van De Sluis et al., 2002). Kādā pētījumā pētnieki atklāja, ka *Commd1* Bedlingtonas terjeriem ar vara toksikozi neekspresējās aknās, bet veselām pelēm un Bīgla sugas suņiem proteīns bija atrodams aknās (Klomp et al., 2003). Vara izdalīšanu ar žulti veic ATP7B – P tipa ATPāze, kas atrodas aknu šūnu trans Goldži kompleksā. Izmaiņas *ATP7B* gēnā, kā zināms, izraisa Vilsona slimību, kas pēc simptomiem ļoti atgādina vara toksikozi suņiem (Weiss et al., 2006). Tas liecina, ka *Commd1*, šķiet, ka ietekmē vara vielmaiņu, mijiedarbojoties ar Atp7b, bet skaidrs mehānisms vēl nav zināms (Riera-Romo, 2018).

2007. gadā veiktajā pētījumā tika aprakstīts, ka vairāki VS izraisošie varianti *ATP7B* gēnā (G85V – rs786204643; L492S; G591D – rs797045402; un A604P) palielina COMMD1 piesaisti. Minētie *ATP7B* gēna varianti izraisa proteīna nepareizu salocīšanu – tādējādi autori secināja, ka COMMD1, iespējams, ir iesaistīts ATP7B proteīna kvalitātes kontrolē (de Bie et al., 2007).

Kādā pētījumā ar 63 pacientu grupu tika atklāti varianti *COMMD1* gēnā 30 % VS pacientu. Pētnieki atrada korelāciju starp alēlisko variantu H1069Q (homozigotiskā stāvoklī) un klusējošu nukleotīdu nomaiņu c.492T>C (rs9096) *COMMD1* gēnā (Stuehler et al., 2004). Vēlākos pētījumos dažādās pacientu populācijās šie dati netika apstiprināti (Lovicu et al., 2006; Weiss et al., 2006). Kādā pētījumā 2010. gadā tika ziņots par cita varianta ietekmi uz VS – tas saistās ar vairāk paaugstinātu vara līmeni urīnā (Gupta et al., 2010).

CP gēna un proteīna uzbūve, funkcijas

CP (OMIM #117700) gēns atrodas 3. hromosomā (3q24-q25), references secība – NC_000003.12 (no 149162410. līdz 149222045. nukleotīdam). Gēnam ir iespējami deviņi transkripti: divi nekodē proteīnus (NR_046371.1 un XR_427361.3), bet septiņi transkriptu varianti kodē mRNS un proteīnus (skat. 1.2. tabulā).

Ceruloplazmīns (CP) ir seruma dzelzs oksidāze, kas satur vairāk nekā 95 % no plazmā esošā vara. Šis proteīns pieder multivara oksidāžu ģimenei – evolucionāri līdzīgu proteīnu

grupai, kas izmanto varu savas funkcijas veikšanai. Par spīti pēc vara nepieciešamības savu funkciju veikšanai, ceruloplazmīnam nav lielas lomas vara transportā vai vielmaiņā (Hellman and Gitlin, 2002). CP ir metālproteīns, kas ir iesaistīts toksiskas dzelzs formas (Fe^{2+}) oksidācijā uz netoksisku (Fe^{3+}). Dzelzij ir ļoti nozīmīga loma dažādos bioloģiskajos procesos. Tā darbojas kā kofaktors dažādiem enzīmiem, ieskaitot ribonukleotīdu reduktāzi un aconitāzi, savukārt, tās klātbūtne hēmā piešķir hemoglobīnam spēju pārnest skābekli un dod iespēju citohroma oksidāzei reducēt skābekli ūdenī. Tas padara dzelzi arī toksisku, jo ražo brīvos skābekļa radikāļus, un Fe^{2+} forma spēj ražot augsti toksiskus hidroksil- un superoksīda brīvos radikāļus ūdeņraža peroksīda vai molekulārā skābekļa klātbūtnē. No visa iepriekš minētā var secināt, ka dzelzs vielmaiņu regulē dažādi proteīni, kas transportē, izolē vai mobilizē dzelzi (de Silva, Askwith and Kaplan, 1996). Transferīns – lielākais dzelzi pārnesošais proteīns plazmā, pārnēs dzelzi no tās uzglabāšanas vietām (piem., aknām) uz audiem, kas izmanto dzelzi. Dzelzs oksidāzei (CP), ko ražo aknas un sekretē plazmā, arī ir nozīmīga loma dzelzs kustībā. Oksidējot Fe^{2+} uz Fe^{3+} , CP veicina dzelzs piesaisti transferīnam, kurš piesaista tikai Fe^{3+} formu. Papildus tam CP ir arī efektīvs antioksidants, jo spēj oksidēt dzelzi relatīvi netoksiskā formā, palīdzot novērst proteīnu, lipīdu un DNS oksidatīvu bojājumu. Ceruloplazmīns ekspresējas astrocītos galvas smadzenēs, smadzenītēs un tīklenē (Patel et al., 2002).

1.2. tabula

CP gēna kodētie transkriptu un proteīnu varianti
(BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.)

mRNS references secība	Eksonu skaits, garums (bp*)	Kodējošie eksoni	Proteīna references secība	Aminskābju skaits proteīnā
XM_006713499.3	20 eksoni; 107 – 466	1. (no 146.nt) – 19. (pirmie 92 nt)	XP_006713562.1	1090
XM_0115124352.2	20 eksoni; 107 – 466	1.(no 146.nt) – 19. (pirmie 92 nt)	XP_011510737.1	1094
NM_000096.3	20 eksoni; 107 – 1232	1.(no 146.nt) – 19. (pirmie 17 nt)	NP_000087.1	1065
XM_017005735.2	18 eksoni; 107 – 1232	1.(no 146.nt) – 18. (pirmie 21 nt)	XP_016861224.1	1012
XM_006713500.4	19 eksoni; 107 – 1232	1.(no 146.nt) – 19. (pirmie 17 nt)	XP_006713563.1	1069
XM_006713501.3	19 eksoni; 107 – 362	1.(no 146.nt) – 19. (pirmie 17 nt)	XP_006713564.1	1065
XM_017005734.2	19 eksoni; 107 – 362	1.(no 146.nt) – 19. (pirmie 17 nt)	XP_016861223.1	1069

* bp – bāzu pāri; ** nt – nukleotīdi.

Traucēta ceruloplazmīna biosintēze, ko izraisa *CP* gēna patogēni alēliskie varianti, izjauc dzelzs vielmaiņu, kas rezultējas dzelzs izgulsnēšanās dažādos orgānos, īpaši – bazālajos ganglijos, izraisot nopietnu neironu bojājumu. Dzelzs izgulsnēšanās galvas smadzenēs noved līdz neurodeģenerācijai un neiroloģiskajiem simptomiem, kā motorā dezorientācija un citi motorie deficīti, kas izpaužas vecumā ap 45–55 gadiem (Patel et al., 2002).

OMIM datubāzē pie *CP* gēna alēliskajiem variantiem ir atrodami trīs fenotipi: cerebellārā ataksija; hemosideroze aceruloplazminēmijas dēļ un iedzimta hipoceruloplazminēmija (#MIM – 604290) (*OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man*, n.d.). Iedzimta hipoceruloplazminēmija (arī aceruloplazminēmija) izpaužas ar parkinsonismu un tīklenes deģenerāciju sakarā ar dzelzs uzkrāšanos minētajos audos (Harris et al., 1995). Dažādos pētījumos ir pierādīta *CP* saistība ar palielinātu dzelzs uzkrāšanos peļu modeļos (ar *CP* izslēgšanu) centrālajā nervu sistēmā (Patel et al., 2002). Ir atrasts, ka abi – *CP* līmenis un tā aktivitāte – serumā un cerebrospinālajā šķidrumā ir samazināti Parkinsona slimības pacientiem (Torsdottir et al., 2006; Olivieri et al., 2011). Vairākos pētījumos ir meklētas izmaiņas *CP* gēnā Parkinsona slimības pacientiem un atrastas izmaiņas gan gēna kodējošajās (Hochstrasser et al., 2004), gan nekodējošās daļās (Zhao et al., 2015a).

HFE gēna un proteīna funkcijas, saistība ar vara metabolismu

HFE (*OMIM* #613609) gēns atrodas 6. hromosomā (6p22.2), references secība – NC_000006.12 (no 26087281. līdz 26098343. nukleotīdam).

HFE gēns kodē atipisku audu saderības kompleksa (angl. *major histocompatibility complex (MHC)*) klases olbaltumvielu, kas tiek pārveidota Goldži kompleksā un pēc tam tiek nogādāta šūnas virsmā, kur mijiedarbojas ar $\beta 2$ mikroglobulīnu. *HFE* olbaltumviela g.k. ekspresējas aknu un zarnu šūnās (Lebron et al., 1998). *HFE* olbaltumviela mijiedarbojas ar citām olbaltumvielām šūnas virsmā, lai regulētu dzelzs daudzumu organismā. Kad *HFE* ir piesaistīta pie transferīna receptora 1, šis receptors nevar piesaistīt transferīnu. Savukārt, lai dzelzs varētu iekļūt šūnā, transferīna 1 receptoram ir jābūt saistītam ar transferīnu. Tātad *HFE* olbaltumviela regulē dzelzs līmeni aknu šūnās, novēršot transferīna saistīšanos ar transferīna 1 receptoru (Pantopoulos, 2008). *HFE* olbaltumviela regulē arī hepcidīna produkciju. Hepcidīns ir olbaltumviela, kuru ražo aknas un kura regulē dzelzs uzsūkšanos no pārtikas produktiem, kā arī dzelzs izdalīšanos no organisma iekšējām rezervēm. Ja *HFE* nav saistījies ar transferīna 1 receptoru, tā saistās ar citām olbaltumvielām, t.sk., hepcidīnu. Šī saistīšanās veicina hepcidīna producēšanu (Erhardt et al., 2002).

Patogēnie alēliskie varianti *HFE* gēnā izraisa dzelzs uzkrāšanās slimību – hereditāro hemohromatozi, kuras gadījumā lielākajai daļai pacientu ir sastopami divi biežākie varianti – p.C282Y (rs1800562) un p.H63D (rs1799945) (Pantopoulos, 2008).

Saistība starp vara un dzelzs metabolismu ir novērojama pie vairākām slimībām. Aceruloplazminēmija ir autosomāli recesīva dzelzs metabolisma slimība, pie kuras novērojams ceruloplazmīna deficīts tā kodējošā ceruloplazmīna gēna patogēno alēlisko variantu dēļ (Hellman and Gitlin, 2002). Pie Vilsona slimības var novērot samazinātu ceruloplazmīna līmeni, kas var novest līdz dzelzs uzkrāšanās aknās. Ir ziņota dzelzs uzkrāšanās dzīvnieku modeļos ar Vilsona slimību (Kato et al., 1993). Dzelzs uzkrāšanās ir novērota arī starp VS pacientiem (Erhardt et al., 2002), kā arī pētījumi ir pierādījuši, ka pie VS var novērot arī dzelzs uzkrāšanos smadzeņu bazālajos ganglijos (Sorbello et al., 2010). VS ārstēšanā izmanto farmakoloģiskos preparātus, piem., D penicilamīnu un trientīnu, kas samazina vara uzkrāšanos, bloķējot vara uzsūkšanos zarnās. Ārstēšana var samazināt vara biopieejamību, tādējādi samazinot vara saistīšanos ar proteīniem (Roberts and Schilsky, 2003). Ceruloplazmīna – vara atkarīgās ferooksidāzes līmeņa samazināšanās rezultējas dzelzs uzkrāšanās un sideroblastiskā anēmijā [15](Brewer and Askari, 2005).

1.6. Vilsona slimības diagnostika

Parasti Vilsona slimības diagnosticēšanai pietiek ar Kaizera–Flaišera gredzena atradnes kombināciju ar zemu seruma ceruloplazmīnu ($< 0,1\text{g/L}$). Kad Kaizera–Flaišera gredzens netiek atrasts (kā tas bieži vien ir vērojams aknu slimības gadījumā), ceruloplazmīna līmenis ne vienmēr ir uzticams rādītājs, jo tas var būt samazināts ne tikai Vilsona slimības, bet dažādu citu iemeslu dēļ, piemēram, autoimūna hepatīta, smagas aknu mazspējas, celiakijas un ģimenes aceruloplazminēmijas gadījumā (Cauza et al., 1997), vai ceruloplazmīns var būt samazināts arī *ATP7B* gēna alēlisko variantu nesējiem heterozigotiskā stāvoklī, bet bez vara uzkrāšanās slimības. No otras puses, iekaisums aknās vai citos audos var izraisīt ceruloplazmīna koncentrācijas paaugstināšanos, reaģējot kā akūtas fāzes proteīnam. Ņemot vērā iepriekš minētos iemeslus, daudziem pacientiem var būt nepieciešami vairāki papildus izmeklējumi, kas norāda uz vara vielmaiņas izmaiņām. Neviena izmeklējumam nav specifisks, tādēļ ir jāpielieto vairāku izmeklējumu kopums (skat. 1.3. tabulu).

Vilsons slimības diagnostikas standarta izmeklējumi (EASL, 2012)

Izmeklējums	Tipiskā atradne	Nepatiesi negatīvi	Nepatiesi pozitīvi
Seruma ceruloplazmīns	Samazināts par 50 % no normāla līmeņa	Normāls līmenis:	Pazemināts, ja ir:
		Pacientiem ar nozīmīgu aknu iekaisumu	Malabsorbcija
		Līmeņa pārvērtēšana imunoloģiskajā izmeklējumā	Aceruloplazminēmija
		Grūtniecība, ārstēšana ar estrogēniem	Heterozigoti
Varš diennakts (24h) urīnā	> 1,6 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$	Normāls līmenis:	Paaugstināts, ja ir:
		Nepareiza materiāla savākšana	Hepatocelulārā nekroze
	> 0,64 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ (bērniem)	Bērniem bez aknu slimības	Holestāze
			Parauga kontaminācija
“Brīvais” varš serumā	> 1,6 $\mu\text{mol}/\text{L}$	Normāls, ja ceruloplazmīns ir pārvērtēts imunoloģiskajā izmeklēšanā	
Varš aknās	> 4 $\mu\text{mol}/\text{g}$ sausā svara	Aknu audu rajona dēļ, no kurienes paņemts paraugs:	Holestātisku sindromu gadījumā
		Pacientiem ar aktīvu aknu slimību	
		Pacientiem ar reģeneratīviem mezgliem	
Kaizera–Flaišera gredzena atradne, izmantojot spraugas lampu	Ir	Nav:	Primāra biliāra holangīta gadījumā
		50 % pacientu ar hepatoloģiskiem simptomiem	
		Lielākajai daļai asimptomātisko radnieku	

1.6.1. Diagnostiskie kritēriji

Darba grupas tikšanās laikā Leipcigā 2001. gadā tika izstrādāti Vilsons slimības diagnostiskie kritēriji (skat. 1.4. tabulu) (Ferenci et al., 2003), kuri ir pierādījuši augstu diagnostisko precizitāti (Nicastro et al., 2010). Vilsons slimības diagnoze tiek apstiprināta, ja pēc kritērijiem tiek savākti vismaz četri punkti. Ja punktu skaits ir trīs – tad diagnoze ir iespējama un ticama, bet papildus ir jāveic citi testi, savukārt, pie punktu skaita, kas ir mazāks vai vienāds par diviem – Vilsons slimības diagnoze ir maz ticama (EASL, 2012).

Vilsona slimības diagnostiskie kritēriji, izstrādāti 2001. gadā Leipcigā
(Ferenci et al., 2003)

Tipiskie simptomi un pazīmes		Citi izmeklējumi	
Kaizera–Flaišera gredzens		Varš aknās (ja nav holestāzes)	
Ir	2	$> 5 \times$ virs normas ($> 4 \mu\text{mol/g}$)	2
Nav	0	$0,8\text{--}4 \mu\text{mol/g}$	1
Neiroloģiskie simptomi**		Normāls ($< 0,8 \mu\text{mol/g}$)	– 1
Ļoti izteikti	2	Rodanīna pozitīvas granulas*	1
Viegli izteikti	1	Varš 24 h urīnā (ja nav akūta hepatīta)	
Nav	0	Normāls	0
Seruma ceruloplazmīns		$1\text{--}2 \times$ virs normas	1
Normāls ($> 0,2 \text{ g/L}$)	0	$> 2 \times$ virs normas	2
$0,1\text{--}0,2 \text{ g/L}$	1	Normāls, bet $> 5 \times$ virs normas pēc D penicilamīna kursa	2
$< 0,1 \text{ g/L}$	2	Alēlisko variantu analīze	
Kumbsa negatīva hemolītiskā anēmija		Atrasti patogēni varianti abās alēlēs	4
Ir	1	Atrasts patogēns variants vienā alēlē	1
Nav	0	Patogēni varianti nav atrasti	0

* Ja nav pieejama kvantitatīvā vara līmeņa mērīšana; ** vai tipiskas izmaiņas galvas smadzeņu magnētiskās rezonanses attēlos.

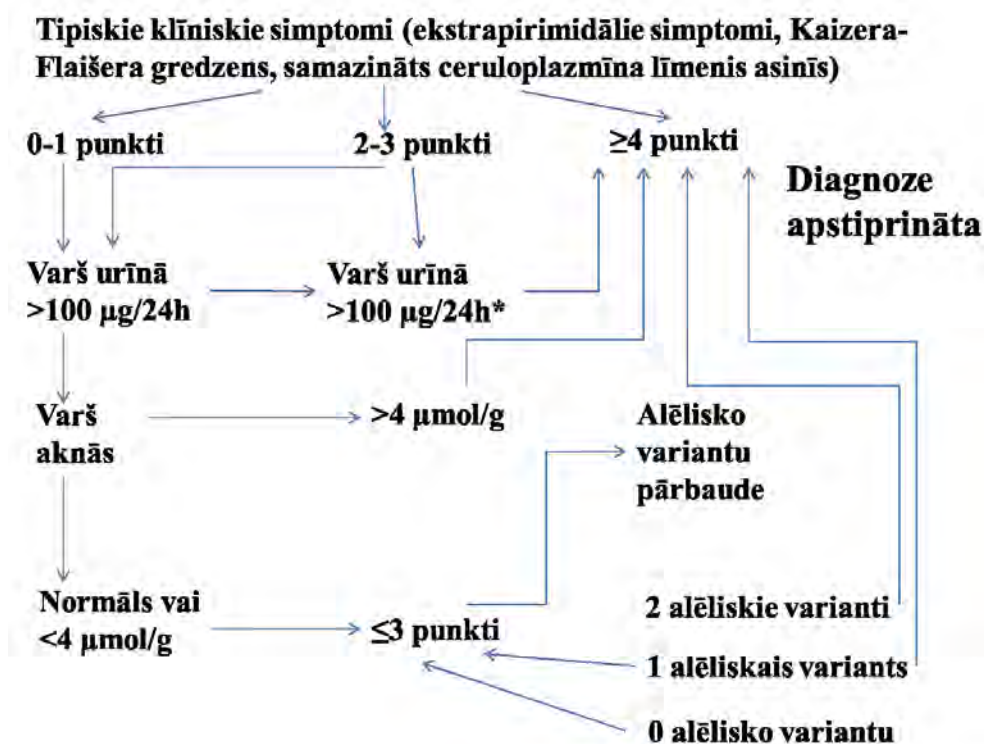
Diagnostiskais algoritms, kas balstās uz šiem kritērijiem, ir attēlots 1.4. attēlā (EASL, 2012).

1.6.2. Citi VS izmeklējumi, kas neietilpst Leipcigas diagnostiskajos kritērijos

Aknu biopsija

Aknu biopsija diagnostiskajiem nolūkiem ir nepieciešama tikai tad, ja klīniskie simptomi vai neinvazīvie izmeklējumi neļauj apstiprināt diagnozi, vai pie aizdomām par citu aknu slimību. Agrīnas histoloģiskas izmaiņas aknās ietver vieglu steatozi (mikro vai makrovezikulāru), glikogenizētus kodolus hepatocītos un fokālu hepatocelulāru nekrozi (Ludwig, Moyer and Rakela, 1994.). Bieži šīs izmaiņas tiek diagnosticētas kā nealkoholiska taukainā aknu slimība vai nealkoholiskais steatohepatīts. Aknu biopsijas paraugos var tikt atrasta klasiska autoimūna hepatīta (tā sauktā “hroniska aktīva hepatīta”) aina. Progredējot aknu parenhīmas bojājumam, attīstās aknu fibroze ar tai sekojošu cirozi. Apmēram pusei no pacientu aknu ciroze vērojama jau slimības diagnosticēšanas brīdī (Ferenci et al., 2005). Aknu

paraugu ultrastruktūras analīze steatozes gadījumā uzrāda specifiskas mitohondriju izmaiņas. Tipiska atradne ietver mitohondriju izmēra un formas daudzveidību, palielinātu matriksa materiāla blīvumu, kā arī neskaitāmus ieslēgumus, kā lipīdus un skaidras granulas, kas varētu būt varš. Visuzkrītošākā izmaiņa ir palielināta starpkristu telpa ar kristu galu dilatāciju, radot cistisku izskatu (Cope-Yokoyama et al., 2010). Ja nav holestāzes, tad aprakstītās izmaiņas tiek uzskatītas par īpaši raksturīgām Vilsona slimībai. Slimības vēlākās stadijās lizosomās ir sastopami blīvi depozi.



1.4. attēls. Vilsona slimības diagnostikas algoritms, balstīts uz Leipcigas kritērijiem.

*Bērniem robeža var būt zem 40 µg/24h (Ferenci et al., 2003).

Galvas smadzeņu radioloģiskā izmeklēšana

Galvas smadzeņu magnētiskās rezonanses (MRI) vai datora tomogrāfijas (DT) izmeklējumi var noteikt bazālo gangliju strukturālas izmaiņas (van Wassenaeer-van Hall et al., 1996). Visbiežākās atradnes ir bazālo gangliju rajona palielināts blīvums datora tomogrāfijā vai hiperintensitāte MRI T2. MRI var būt jutīgāka metode šo izmaiņu noteikšanā. Izmaiņas nav limitētas tikai minētajā rajonā, bet var ietvert citus rajonus. Raksturīga atradne Vilsona slimības gadījumā ir t.s. “gigantiskās pandas seja”, bet tā ir atrasta mazākajai daļai pacientu. Bez šīs pazīmes, Vilsona slimībai vēl ir raksturīgas hiperintensitātes tektālajā plaknē un centrālajā tilta daļā ar papildus bazālo gangliju, talāma un galvas smadzeņu stumbra iesaisti

(Prashanth et al., 2010). Nozīmīgas izmaiņas galvas smadzeņu radioloģiskajos izmeklējumos var būt pat pirms klīnisko simptomu sākuma (van Wassenaeer-van Hall et al., 1996).

1.6.2. Molekulārā diagnostika

Tieša VS molekulārā diagnostika ir apgrūtināta, jo *ATP7B* gēnā ir sastopami vairāk nekā 800 patogēnie alēliskie varianti (HGMD, n.d.), kuri, lielākoties, ir reti sastopami, ar dažiem izņēmumiem (Ferenci et al., 2005). Turklāt, lielākā daļa pacientu ir kompaunda heterozigoti (katrā no gēna alēlēm ir cits alēliskais variants). Tomēr jebkuram pacientam ar aizdomām par Vilsona slimību ir saprātīgi veikt *ATP7B* gēna analīzi – gan diagnozes apstiprināšanas nolūkiem, gan, lai atvieglotu radnieku skrīningu (EASL, 2012).

Vilsona slimības molekulārā diagnostika ir iekļautas dažādas metodes, kā, piemēram, vienkāršākas un salīdzinoši lētākas skrīninga metodes, piemēram, *SSCP* (vienpavediena konformācijas polimorfismu analīze – angl., *single stranded conformational polymorphism analysis*) vai *RFLP* (restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu analīze, angl. – *restriction fragment length polymorphism analysis*), kam sekoja Sangerā tiešā DNS sekvenēšana, bieži vien – iepriekš pierādītiem *ATP7B* gēna t.s. “karstajiem punktiem” (Coffey et al., 2013). Atsevišķiem variantiem ir alēļu specifiskas *PCR*, piemēram, H1069Q variantam – *PCR Bi-PASA* (Polakov et al., 2007).

Pēdējā laikā VS molekulārā diagnostika, ņemot vērā lielo alēļu heterogenitāti, pārsvarā balstās uz *ATP7B* gēna kodējošo daļu – eksonu un tam pieguļošo rajonu tiešo (Sangerā) sekvenēšanu (Simsek Papur, Akman and Terzioglu, 2015; Vrabelova et al., 2005; Hua et al., 2016). Ja neizdodas atrast patogēnos alēliskos variantus *ATP7B* gēna kodējošos rajonos, tad molekulāro diagnostiku turpina ar *ATP7B* gēna regulatoro rajonu – promotera un 3'UTR (3' netranslējamā rajona) sekvenēšanu (Mukherjee et al., 2014; Coffey et al., 2013). Ja pēc visu iepriekš minēto metožu pielietošanas nav izdevies identificēt *ATP7B* gēna patogēnos alēliskos variantus, tad tiek izmantota *MLPA* (multiplekša ligācijas atkarīga proves pavairošana – angl., *multi ligation - dependent probe amplification*) metode lielu (vairāku eksonu ietverošu) delēciju vai duplikāciju atrašanai (Coffey et al., 2013; Bost et al., 2012). Pēdējos gados tiek izmantota arī jaunās paaudzes sekvenēšana (NGS) VS diagnostikā – galvenokārt, tā ir mērķēta – visa *ATP7B* gēna vai gēnu paneļa sekvenēšana (piem., pie neskaidras izcelsmes hepatīta, kur VS ir kā viena no iespējamām diagnozēm (Poon, Tan and Koay, 2016; Collet et al., 2018).

2. Materiāls un metodes

2.1. Pētījuma grupas

Pētījums apstiprināts Latvijas Republikas Centrālajā Ētikas komitejā (skat. 1. pielikumā), 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 (Latvijas Republikas Centrālās Ētikas komitejas atļauju skat. 2. pielikumā).

Pētījumam tika apzināti dati no visiem pacientiem, kuru bioloģiskais paraugs tika nosūtīts RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskajai laboratorijai (MGZL) 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 MGZL 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, abu ārstniecības iestāžu atļaujas veikt pētījumu skat. 3. un 4. pielikumā.

2.2. Molekulārie izmeklējumi

Visi molekulārie izmeklējumi veikti Rīgas Stradiņa universitātes molekulārās ģenētikas zinātniskajā laboratorijā (MĢZL) laika posmā no 2006. līdz 2018. gadam.

2.2.1. 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.

2.2.2. *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.

Sākotnēji veic polimerāzes ķēdes reakciju (*PCR*) analizējamā fragmenta pavairošanai. Reakcijā izmantotie reaģenti (tilpumi norādīti vienai reakcijai, µl): H₂O – 11,5; 10 × *Taq* buferis ar (NH₄)₂SO₄ (*Thermo Fisher*, ASV) – 2,0; 25 mM MgCl₂ – 3,0; 10 mM *dNTP* mix (*Thermo Fisher*, ASV) – 0,5; W14F (tiešais praimeris) – 0,7; W14R (reversais praimeris) – 0,7; H1069QN (pirmais iekšējais praimeris) – 0,7; H1069QM (otrais iekšējais praimeris) – 0,7; *Taq DNA* polimerāze (*Thermo Fisher*, ASV) – 0,1. Praimeru secības skat. 2.1. tabulā.

19 µl reakcijas maisījumam pievieno 1 µl (30 ng/µl) DNS parauga. Lai nodrošinātu reakcijas norisi, maisījumu ievieto automātiskajā termociklerā, piemērojot specifisku temperatūras režīmu: sākotnējā denaturācija – 94 °C (2 min.); 30 atkārtoti cikli ar sekojošiem parametriem: denaturācija – 94 °C (30 s.); hibridizācija (praimeru piesaistīšanās) – 56 °C (30 s.); fragmenta pagarināšana – 72 °C (30 s.); beigās seko noslēdzošā fragmenta pagarināšana – 72 °C (7 min.) un paraugu atdzesēšana – 4 °C (10 min.).

PCR Bi-PASA metode balstās uz to, ka ierasto divu praimeru (sintētisko oligonukleotīdu) vietā tiek izmantoti četri (praimeru secības skat. 2.1. tabulā):

1) divi ārējie praimeri, kas piesaistās analizējamam fragmentam no abiem galiem (5' un 3') un nodrošina to, ka vienmēr tiek uzsynetizēts 356 bp garš fragments, kas kalpo par kontroli, ka reakcija ir notikusi;

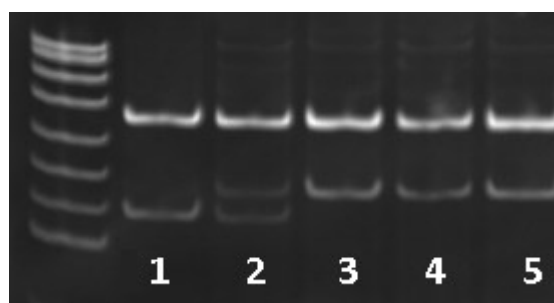
2) divi iekšējie – alēļu specifiskie praimeri, kas piesaistās tikai pie noteiktas nukleotīdu secības un uzsynetizētie fragmenti ir atkarīgi no alēliskā variantā klātbūtnes.

2.1. tabula

***PCR Bi-PASA* izmantoto praimeru (sintētisko oligonukleotīdu) secības**

	Nosaukums	Secība (5'-3')
Ārējie praimeri	W14R	5' GGG CCC TCT AAG TGG TTT TC 3'
	W14F	5' CCC CTC CAT CTG TAT TGT GG 3'
Alēļu specifiskie – iekšējie praimeri	H1069QN	5' GAC TGC CAC GCC CAA GGG G 3'
	H1069QM	5' GGA GGC CAG CAG TGA ACA A 3'

Pēc *PCR* produkti tika analizēti 8 % poliakrilamīda gela elektroforēzē (*PAGE*), kur gels pēc tam krāsots ar etīdija bromīdu; dati vizualizēti un dokumentēti ar ultravioletu transluminatoru – gela fotodokumentācijas ierīci (rezultātu interpretāciju un gela attēlu skat. 2.1. attēlā).



2.1. attēls. Alēliskā variantā H1069Q analīze ar *PCR Bi-PASA* (8% *PAGE*).

Izmantotais marķieris (pirmajā gela bedrītē no kreisās puses) – *pUC19 DNA/MSPI* (*Thermo Fisher*, *ASV*). Individu genotipi: 1. H1069Q homozigotiskā stāvoklī. 2. H1069Q heterozigotiskā stāvoklī. 3. – 5. H1069Q variants nav atrasts nevienā no alēlēm.

2.2.3. Sekvenēšanas reakcija

Sekvenēšanas reakcija sastāv no vairākiem posmiem, un tie ir:

1. Analizējamā fragmenta amplifikācija, izmantojot *PCR*. Reakcijas maisījums sastāv no (katra reaģenta daudzums ir norādīts mikrolitros vienai reakcijai): ddH₂O – 13,4; 10 × *Taq* buferis+ (NH₄)₂SO₄-MgCl₂ – 2,0; 25 mM MgCl₂ – 2,0; 10 mM *dNTP Mix* – 0,5; 10 pmol P_F (tiešais praimeris) – 0,5; 10 pmol P_R (reversais praimeris) – 0,5; *Taq DNA* polimerāze 5 U/μl – 0,1. 19 μl reakcijas maisījumam pievieno 1 μl (30 ng/μl) DNS parauga. Tālāk maisījumu ievieto automātiskajā termociklerā, piemērojot specifisku temperatūras režīmu: sākotnējā denaturācija – 94 °C (2 min); 30 atkārtoti cikli ar sekojošiem parametriem: denaturācija – 94 °C (30 s.); hibridizācija (praimeru piesaistīšanās) – 56 °C (30 s.); fragmenta pagarināšana – 72 °C (30 s.); beigās seko noslēdzošā fragmenta pagarināšana – 72 °C (7 min.) un paraugu atdzesēšana – 4 °C (10 min.).
2. Amplifikācijas produkta pārbaudīšana 2 % agarozes gelā.
3. Amplifikācijas produkta attīrīšana, 10 μl paraugam pievienojot 1 μl eksonukleāzi (*ExoI*) *ThermoScientific* (*Waltham*, ASV) un 2 μl garneļu sārmaino fosfatāzi (*SAP*) *ThermoScientific* (*Waltham*, ASV). Pēc tam paraugu inkubē 15 minūtes 37 °C temperatūrā un pēc tam 15 minūtes – 85 °C, tad atdzesē līdz 4 °C. Metode adaptēta RSU MĢZL pēc *Werle* un kolēģu aprakstītā protokola (*Werle et al.*, 1994).
4. Sekvenēšanas reakcija. Tiek sagatavots reaģentu maisījums, sastāvošs no: 4,7 μl ddH₂O; 0,3 μl *BigDye Terminator v3.1* (ar krāsvielu iezīmētu nukleotīdu maisījums); 1 μl sintētiskā oligonukleotīda (viens no iepriekš *PCR* izmantotajiem) un 2 μl 5x sekvenēšanas bufera (*Applied Biosystems Waltham*, ASV).
5. 8 μl sekvenēšanas reakcijas maisījuma tiek pievienoti 3 μl attīrītā *PCR* produkta, bet tālāk maisījums tiek ielikts automātiskajā termociklā, kur uzstādīta sekvenēšanas *PCR* programma: ātra denaturācija 94 °C (1 s), kam seko 25 atkārtoti cikli: 96 °C (10 s); 58 °C (5 s); 60 °C (4 min); pēc tam seko 4 °C (7 min), kas nepieciešams reakcijas pabeigšanai. Metode pielāgota RSU MĢZL, saskaņā ar ražotāja rekomendēto protokolu.
6. Sekvenēšanas produkta attīrīšana no liekajiem oligonukleotīdiem.
7. Sākotnēji veic etanola/ EDTA (*Sigma-Aldrich* (ASV)) precipitāciju, paraugam pievienojot 2,5 μl 12,5 mM EDTA un 25 μl 96 % etanola, 15 minūtes paraugu inkubē istabas temperatūrā. Pēc tam paraugus centrifugē pie + 4 °C ar 4 400 rpm

45 minūtes, supernatantu uzmanīgi atsūc ar pipeti, pievieno 30 µl auksta 70 % etanola un invertē 5 ×, pēc tam atkal centrifugē pie + 4 °C ar 4 400 rpm 15 minūtes. Pēc tam atkal uzmanīgi ar pipeti atsūc supernatantu un žāvē termostatā pie + 50 °C.

8. Paraugu denaturēšana. Pievieno 12 µl formamīda un inkubē pie 95 °C 5 minūtes.
9. Paraugu analīze kapilāru elektroforēzē. Ievieto paraugus sekvenatorā (*ABI Prism 310* un *ABI Prism 3500*) sekvenēšanas reakcijas veikšanai (metode aprakstīta ražotāja izdotajā rokasgrāmatā).

2.2.4. *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 sekvenēšanu, praimeru secības, piesaistes temperatūru un produkta garumu skat. 2.3. tabulā. 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.).

2.2.5. 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) (Wilson mutation database, n.d.) un *NCBI* Nacionālā Biotehnoloģijas Informācijas centra (*National Center for Biotechnology Information*, *NCBI*) datubāzē *ClinVar*.

Iepriekš neaprakstītu 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). Patogēnu variantu klasificēšanas kritērijus skat. 2.2. tabulā.

Patogēnu variantu klasificēšanas kritēriji (Richards et al., 2015).

Patogenitātes pierādījumi	Kategorija
Ļoti stipri (PVS)	PVS1 – nulles variants (terminējošs, rāmja nobīdes, izmaiņas kanoniskā vietā ± 1 vai 2 splaisinga vietas, iniciācijas kodons, viena vai vairāku eksonu delēcija) gēnā, kurā funkcijas zudums ir pierādīts kā slimību izraisošs mehānisms
Stipri (PS)	PS1 – tāda pati aminoskābes nomaiņa kā iepriekš aprakstītam patogēnam variantam, neskatoties uz nukleotīda nomaiņu
	PS2 – <i>de novo</i> (pierādīts gan no mātes, gan tēva puses) pacientam ar slimību, bet bez ģimenes anamnēzes
	PS3 – bojājošs gēna vai gēna produkta efekts labi pierādīts <i>in vitro</i> vai <i>in vivo</i> funkcionālajos pētījumos
	PS4 – varianta prevalence starp pacientiem ir nozīmīgi lielāka nekā starp kontroles grupas indivīdiem
Videji (PM)	PM1 – variants atrodas mutāciju „karstajā punktā” un/vai kritiskajā un labi aprakstītā funkcionālajā domēnā (piem., enzīma aktīvajā saitā) bez labdabīgiem variantiem
	PM2 – variants nav atrasts (vai atrasts ļoti reti) datubāzēs pieejamajās kontroles grupās (<i>Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, vai Exome Aggregation Consortium</i>)
	PM3 – pie recesīvām slimībām, variants atrasts <i>trans</i> fāzē ar otru patogēno variantu
	PM4 – proteīna garuma izmaiņas bez rāmja nobīdes delēciju/ inserciju gadījumā vai terminējošā kodona zudums
	PM5 – jauna nesinonīma nomaiņa tajā pašā aminoskābes vietā, kur iepriekš novērota cita nesinonīma nomaiņa
	PM6 – uzskatāms kā <i>de novo</i> , bet bez maternālas un paternālas apstiprināšanas
Atbalstoši (PP)	PP1 – atrašana kopā ar slimību vairākiem pacientiem vienā ģimenē gēnā, kurā ir zināmi citi alēliskie varianti, kas izraisa slimību
	PP2 – nesinonīms variants gēnā, kurā labdabīgi nesinonīmi varianti ir reti sastopami, bet nesinonīmi varianti biežāk ir zināmi kā slimību izraisoši
	PP3 – daudzi skaitļošanas (datora) pierādījumi atbalsta gēna vai gēna produkta kaitīgumu (gēna produkta saglabāšanas, evolucionārs, slaisinga ietekmes utml.)
	PP4 – pacienta fenotips vai ģimenes vēsture ir ļoti specifiska monogēnai slimībai
	PP5 – cienījamā avotā variants nesen ir aprakstīts kā patogēns, bet laboratorijai nav pieejami pierādījumi, lai veiktu neatkarīgu novērtējumu

Pie PP3 kritērija tika izmantotas *Polyphen-2*, *SIFT*, *Mutation Taster* un *Panther software* programmas, (Adzhubei et al., 2010) kā arī iepriekš neaprakstītie varianti tika pārbaudīti kontroles grupā.

Savukārt, *ATP7B* gēna promotera (5'UTR) rajona tiešajai sekvenēšanai tika izmantoti praimeri no iepriekš aprakstīta pētījuma (Cullen, Prat and Cox, 2003). Gēna *ATP7B* promotera sekvenēšanu, praimeru secības, piesaistes temperatūru un produkta garumu skat. 2.3. tabulā. *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.

2.3. tabula

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

<i>ATP7B</i> gēna rajons	Praimeris 1 (5'- 3')	Praimeris 2 (5'- 3')	T.¹ (°C)	G.² (bp)
1.	CTTTAACACCCCGCTCTCCT	AAAATCCTCCTGGTGGGA GT	60	192
2.1	TCCATTTTCTCAGTGCCAGA	CCCATGTCCCAATTGA T	60	394
2.2	ATATGTGCCATCGGTTGTGT	TCTCTTTGGGTAGTGCTT TG	60	400
2.3	CTGCCATCAAGAGCAAAGTG	TGATCTGTCCCACTCCCTT C	60	394
2.4	GGAGAACAAACTGCCCAAG	CTCAGGACATGCCTCAAA CA	60	400
3.	CTCACCAAGAGCCCTGAAAC	CGCAGCATTCTAAGTTC AA	60	383
4.	CTGCCCACCCAGAGTGTTAC	GGATGTGTCCAAAATGCA AA	60	269
5.	TTTCCTTGATCCTGGGTCTG	GCTATATTTTCTCATT CTTCACTG	60	291
6.	AAAGTGCTTTCTGCCAATGC	AGAGTTGGGCCAGGTAG AG	60	222
7.	CAGAAGGGGAGTGGCTTGTA	ACACAGCATGGAAGGGA GAG	60	293
8.	GTCACGACTGTGCACAAAGC	TTCTGAACCTGAAGCTGC TGT	60	373
9.	GTGACTCTCAGGCTGGGTTT	TCTCTGCCACACTCACA AG	60	277
10.	CAGCTGGCCTAGAACCTGAC	CCTCCTGAGGGAACATGA AA	60	231
11.	TGACAGTTGTCTTTCTACGT C	TCCCAGAACTCTTCACAT AATTC	60	250
12.	ATTTCCTATGGTCTTGGTGT	AACCACCATATAGCCCAA GG	60	200
13.	CCTGCCTCTGACTCTGTCCT	CATCTCTCAGGATGGGGA AA	60	261
14.	GGGCCCTCTAAGTGGTTTTC	CCCCTCCATCTGTATTGT GG	60	356
15.	TTTCACTTCACCCCTCTTGG	CTGTGGTTTGACCCACCT CT	60	283
16.	GCTGTAAAAGGATTGCATGG	TCTGAGAGAGCGGAAGG AAG	60	260
17.	CCCAACTTGTGTAGCTGCTG	GGCCAACCTGGTGCTTACT TT	60	259

<i>ATP7B</i> gēna rajons	Praimeris 1 (5'- 3')	Praimeris 2 (5'- 3')	T.¹ (°C)	G.² (bp)
18.	GGGCAAGGGTAACTTGAGGT	TGATGGAGAGGAGCACA CAG	60	363
19.	CTGTGTGCTCCTCTCCATCA	TCACTAACCCCAGCAGGA AC	60	217
20.	CCTAGGTGTGAGTGCGAGTTC	TGGGAAATGAGAGGCAA GTT	60	230
21.	AGATGCTGTTGCGTTCCTG	TCAGCTTGTGGTGAGTGG AG	60	356
P ³ (1159 –824)	TCTGTGAGCCCACACGA	CTGTCAATCACAGGCCAC G	59	336
P ³ (872 – 532)	GACAGCAGTGGGGGGTTG	ACTCAGCTCCCAGGGCTC	61	341
P ³ (549 – 39)	GAGCCCTGGGAGCTGAGT	CCCTTCTCTGGCTGTGAT CT	60	583

¹ – praimeru piesaistes temperatūra; ² – PCR produkta garums; P³ – promotera rajoni. *ATP7B* gēna eksoni atzīmēti ar cipariem no 1.-21.

2.2.6. *ATOX1* gēna tiešā sekvenēšana

Gēna sekvenēšana tika veikta visiem VS pacientiem, kuriem VS tika molekulāri apstiprināta (identificēti divi patogēnie alēliskie varianti *ATP7B* gēnā), lai noteiktu *ATOX1* gēna variantu iespējamo saistību ar dažādu VS fenotipu. Gēna sekvenēšanai tika izmantoti praimeri, kuri piemeklēti, izmantojot brīvpieejas programmu *Primer 3* (“Primer3 Input (Version 0.4.0)” n.d.). Gēna *ATOX1* eksonu sekvenēšanu, praimeru secības, piesaistes temperatūru un produkta garumus skat. 2.4. tabulā. Iegūtās sekvenses salīdzinātas ar *BLAST* pieejamo references sekvenci – NC_000005.10, NM_004045.3 un NP_004036.1 (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

2.2.7. *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 praimeri no iepriekš publicētiem datiem (Gupta et al., 2010). Gēna *COMMD1* eksonu sekvenēšanu, praimeru secības, piesaistes temperatūru un produkta garumu skat. 2.4. tabulā. Iegūtās sekvenses salīdzinātas ar *BLAST* pieejamo references sekvenci – NC_000002.12, NM_152516.3, NP_689729.1 (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

2.2.8. *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. *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). Gēna regulatorās daļas (promotera) sekvenēšanai tika izmantoti praimerī, no kuriem divi piemeklēti, izmantojot brīvpieejas programmu *Primer 3* (Primer3 Input (Version 0.4.0), n.d.), bet pārējie divi izmantoti no iepriekš publicētas informācijas (Zhao et al., 2015). Gēna *CP* promotera sekvenēšanu, praimeru secības, piesaistes temperatūru un produkta garumu skat. 2.4. tabulā. Analīzē tika izmantoti četri praimerī: ārējie – *PCR* produkta iegūšanai, iekšējie (kopā ar ārējiem) – sekvenēšanas reakcijā. Iegūtās sekvenses salīdzinātas ar *BLAST* pieejamo references sekveni – NC_000003.12 (*BLAST*: Basic Local Alignment Search Tool, n.d.).

2.2.9. 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.). Reakcijā tiek izmantots reaģentu maisījums “SALSA MLPA Probemix P098-D1 Wilson disease” (*MRC-Holland*, Nīderlande), lai noteiktu lielas *ATP7B* gēna delēcijas vai duplikācijas, kas izraisa VS. Reaģentu komplekts satur: SALSA *MLPA* buferi; SALSA Ligāzi -65; ligāzes buferi A; ligāzes buferi B; SALSA *PCR* praimeru maisījumu; SALSA polimerāzi. Reaģentu maisījums arī var tikt izmantots, lai noteiktu punktveida alēliskos variantus: R778L (c.2333G>T; rs28942074), A874V (c.2621C>T; rs121907994), H1069Q (c.3207C>A; rs76151636) un N1270S (c.3809A>G; rs121907990), kā arī c.-441_427del15 variantu (15 bp delēciju). Reakciju maisījums satur 41 *MLPA* zondes, ar amplifikācijas produktu garumu starp 132 un 445 nukleotīdiem. No visām zondēm 28 ir domātas *ATP7B* gēnam; viena – *ATP7B* gēna pieguļošajam rajonam *ALG11* gēnā. Papildus tiek izmantotas vēl 12 references zondes dažādos autosomālajos rajonos. Reakcija tika veikta atbilstoši ražotāja protokolam.

Pēc reakcijas 1 µl no paraugiem tika sajaukti ar Hi-Di formamīdu (12 µl) un *GeneScan LIZ500* garuma standartu (0,5 µl) (*Thermo Fisher*, ASV) un tika izlaisti uz kapilārās elektroforēzes *ABI 3500* (*Thermo Fisher*, ASV). Dati tika analizēti uz *Coffalyzer* programmatūras, atbilstoši ražotāja rekomendācijām. Kā kontroles tika izmantots materiāls no vairākiem veseliem indivīdiem un indivīdiem ar zināmiem patogēniem variantiem (piem., alēliskais variants – H1069Q heterozigotiskā un homozigotiskā stāvoklī). Fluorescentā signāla koeficients tika definēts robežās no 0,7 līdz 1,3 (zem 0,7 – iespējama delēcija; virs 1,3 – iespējama duplikācija).

2.4. tabula

Gēnu *ATOXI* un *COMMD1* eksonu un *CP* gēna promotera rajona praimeru secības, piesaistes temperatūras un *PCR* produktu garumi

Gēns	Rajons	Praimeris 1 (5' – 3')	Praimeris 2 (5' – 3')	T. ¹ (°C)	G. ² (bp)
<i>ATOXI</i>	1. eksons	TTCTGAAAAAGGCCG ACAGT	CCTGAGCCCTTCAAGAT CAG	60	400
	2. eksons	AGTCTGATGCCAACC AGGTC	GCCGTGGTGAGGATTAA ATG	60	397
	3. eksons	CATTGCTTTCTGGCC TGTT	CAAGGTGTTCTGCTCTGA TGA	60	400
<i>COMMD1</i>	1. eksons	GTGGTGGTTTTGCAC AGGC	TCCAAGCCGGAGACTAC AG	59	301
	2. eksons	TTCAGTGATTTAAGA GTCACTC	GAATAGACAAGCTAACA TG TAG	57	456
	3. eksons	GAGTTTGGTCATGCC AGATG	GTGAGAACCTCTGCACT GG	58	379
<i>CP</i>	Promoters	CTTGCCTGAGACCAT TTTACATCC	CAACAGCACAGACTGGG GTTAG	62	878
	Promoters	TTGCTGACCCTTGAG AACTG	TTGGCATGGAGTAGGGG TTA	-	-

¹ – praimeru piesaistes temperatūra; ² – *PCR* produkta garums.

2.2.10. 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* (Livak and Schmittgen, 2001) un *Qiagen* rekomendācijām. Analīzei tika izmantots *5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)* reaģentu maisījums (*SolisBiodyne*, Igaunija), un analīze tika veikta ar *RotorGene-Q* aparātu (*Qiagen*, Vācija), izmantojot ražotāja programmatūru. 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 Sangera sekvenēšanu, un *KRIT1* gēna fragmentu (*KRIT1* 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. 2.5. 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 veseliem 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 atkārtojumi). Par kontroles paraugiem tika izmantoti trīs indivīdu paraugi. Par relatīvā fluorescentā signāla stipruma koeficienta (“Delta Delta C(T)”) normu tika pieņemtas koeficienta robežas no 0,7 līdz 1,3, kas atbilst divām kopijām konkrētajā interesēs rajonā.

2.5. tabula

**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.	AGTCCCCCAGACCTTCTCTG	CGTGGTCTGTTCATAGCGTCA	60	101
18.	TTTGCAGAGGTGCTGCCTT	CAATGGCCACACCCATGTCT	63	136
19.	GATTTGCTGGATGTGGTGGC	TGCAATGGGTATCCCAACCA	63	111
2.	GTGGTCACCCTCCAAGTCTGAG	GAAGTGCCTCGATAGCCCTC	61	190

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

2.2.11. *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). Abu variantu polimerāzes ķēdes reakcijā izmantotie reaģenti (tilpumi norādīti vienai reakcijai, µl): ddH₂O – 13,4; 10 × *Taq* buferis ar (NH₄)₂SO₄ (*Thermo Fisher*, ASV) – 2,0; 25 mM MgCl₂ – 2,0; 10 mM *dNTP* mix (*Thermo Fisher*, ASV) – 0,5; *Taq* polimerāze (*Thermo Fisher*, ASV) – 0,1. C282Y varianta noteikšanai: P_{C282YF} (tiešais praimeris) – 0,5; P_{C282YF} (reversais praimeris) – 0,5, bet H63D varianta noteikšanai: P_{H63DF} (tiešais praimeris) – 0,5; P_{H63DF} (reversais praimeris) – 0,5 (Mura, Raguenes and Ferec 1999; Garry et al. 1997). Praimeru secības un *PCR* produkta garumus skat. 2.6. tabulā.

19 µl reakcijas maisījumam pievieno 1 µl (30 ng/µl) DNS parauga. Lai nodrošinātu reakcijas norisi, maisījumu ievieto automātiskajā termociklerā, piemērojot specifisku temperatūras režīmu: sākotnējā denaturācija – 94 °C (2 min); 30 atkārtoti cikli ar sekojošiem parametriem: denaturācija – 94 °C (1 min.); hibridizācija (praimeru piesaistīšanās) – 62 °C (1 min.); fragmenta pagarināšana – 72 °C (1 min.) beigās seko noslēdzošā fragmenta pagarināšana – 72 °C (7 min.) un paraugu atdzesēšana – 4 °C (10 min.).

Pēc polimerāzes ķēdes reakcijas veikšanas uz amplificētajiem fragmentiem iedarbojas ar restrikcijas endonukleāzēm: C282Y variantam ar *RsaI* (*Thermo Fisher*, ASV) un H63D variantam *MboI* (*Thermo Fisher*, ASV). Pēc produktu inkubācijas 37 °C vismaz divas stundas, tie tika analizēti 8 % poliakrilamīda gela elektroforēzē (*PAGE*), kur gels pēc tam krāsots ar etīdija bromīdu; dati vizualizēti un dokumentēti ar ultravioletu transluminatoru – gela fotodokumentācijas ierīci. Pēc restrikcijas 282Y varianta gadījumā *PCR* produkti tika sašķelti 240, 120 un 30 bp garos fragmentos, savukārt, savvaļas tipa (C282) gadījumā – 240 un 150 bp garos fragmentos. 63D variantu gadījumā *PCR* produkti netika sašķelti, savukārt, savvaļas tipa (H63) gadījumā – tie tika sašķelti 140 un 60 bp garos fragmentos.

2.3. 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. līdz 2012. gadam. Laika posms pirms 1964. gada netika iekļauts analīzē, 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 ($1980 - 16 = 1964$).

2.6. tabula

***HFE* gēna praimeru secības, piesaistes temperatūras un *PCR* produktu garumi**

Variants	Praimeris 1 (5'- 3')	Praimeris 2 (5'- 3')	T. ¹ (°C)	G. ² (bp)
C282Y	TGGCAAGGGTAAACAGATC C	CTCAGGCACTCCTCTCAA CC	60	390
H63D	ACATGGTTAAGGCCTGTTGC	CTTGCTGTGGTTGTGATTT TCC	61	200

¹ – praimeru piesaistes temperatūra; ² – *PCR* produkta garums.

2.4. 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 $\alpha = 0,05$.

3. Rezultāti

3.1. Vilsona slimības prevalence jaundzimušo kohortās

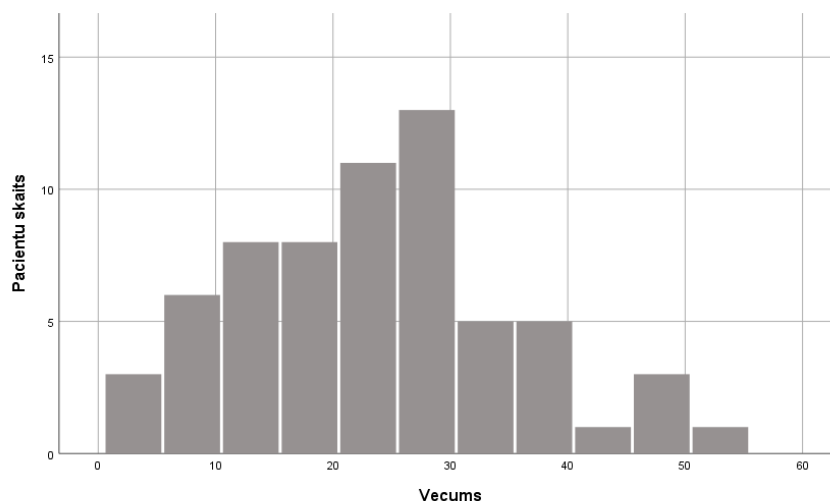
Prevalences jaundzimušo kohortās aprēķinos tika iekļauti 59 pacienti, kuriem molekulāri apstiprināta VS, kā arī astoņi pacientu radinieki, kuri sākotnēji bija asimptomātiski. Laika posmā no 1964. līdz 2012. gadam Latvijā kopā bija 1 463 083 dzīvi dzimuši bērni (LCSP, n.d.). Aprēķins: 67 pacienti / 1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

3.2. 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, radinieki 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.

3.2.1. Vilsona slimības pacientu dzimums un pirmo simptomu parādīšanās vecums

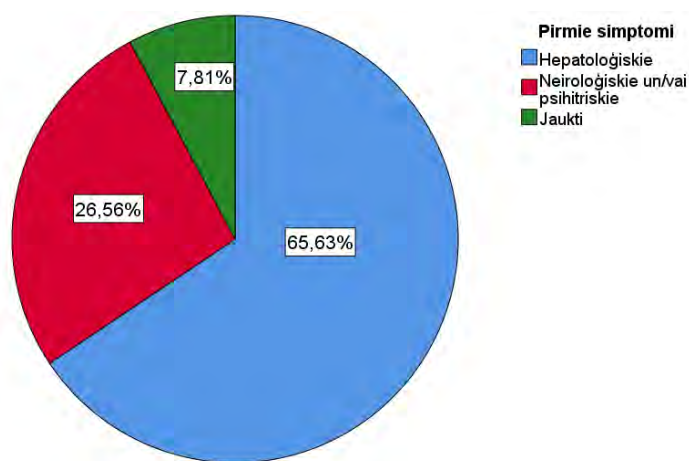
Vīriešu: sievietes attiecība starp pētījuma dalībniekiem bija 1,13 : 1 (34 vīrieši : 30 sievietēm). VS pirmo simptomu izpaušanās vecums bija no trīs līdz 54 gadu vecumam, ar vidējo vecumu – 24,00 gadi (SD = 11,55 gadi), bet visvairāk pacientu bija vecuma grupā no 25 līdz 30 gadiem. VS pacientu sadalījums pa vecumiem parādīts 3.1. attēlā.



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

3.2.2. 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) jaukti (hepatoloģiski un neiroloģiski, un/vai psihiatriski simptomi.) VS raksturīgais simptoms – Kaizera–Flaišera gredzens netika iekļauts analizē datu trūkuma dēļ. Pacientu procentuālais sadalījums simptomu grupās apkopots 3.2. attēlā.



3.2. attēls. VS pacientu pirmie slimības simptomi

Aknu slimība kā pirmā VS izpausme starp pacientiem izpaudās 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. Neuroloģiskie simptomi izpaudās 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. 3.1. tabulā.

3.1. 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	
Neuroloģiskās 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. 3.2. tabulā.

Pirmo simptomu saistība ar laboratorisko rādītāju izmaiņām netika atrastas. Tika novērots, ka neuroloģiskie 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 neuroloģiskie simptomi, savukārt, sievietēm – biežāk sastopami hepatoloģiskie simptomi, bet datiem nebija statistiski nozīmīgu atšķirību.

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, (<i>IQR</i>)	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 (<i>IQR</i> *)	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* – starpkvartiļu amplitūda; **SD – standartnovirze

3.3. *ATP7B* gēna analīze

3.3.1. *ATP7B* gēna kodējošo daļu (eksonu) analīze

VS molekulāri tika apstiprināta 51 pacientam, kā arī viņu septiņiem pirmās pakāpes radiniekiem, 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 radinieku genotipus skat. 3.3. 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.

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

Genotips pēc HGVS nomenklatūras*	Pacientu skaits	Radinieku 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.

Kopā starp VS pacientiem tika atrasti 23 alēliskie varianti, no kuriem 15 tika identificēti kā slimību izraisoši. 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. 3.4. tabulā.

***ATP7B* gēna patogēno alēlisko variantu procentuālais sadalījums**

Alēliskais variants*	<i>ATP7B</i> 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.Alal135GlnfsX13)	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

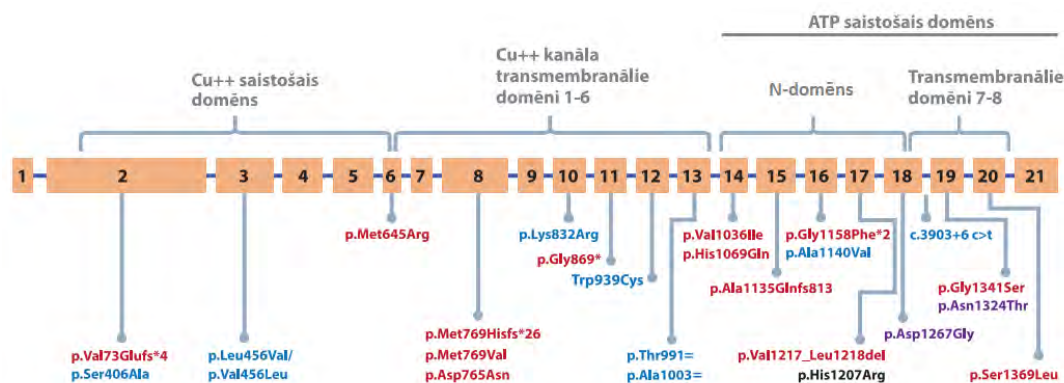
*References secības: NM_000053.3 un NP_000044.2.

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.).

Pacienti identificēto alēlisko variantu atrašanās vietu gēnā saistībā ar proteīna struktūru skat. 3.3. attēlā.



3.3. attēls. *ATP7B* gēna alēlisko variantu atbilstība proteīna struktūrai

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 sekvenču 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. 3.5. tabulu).

3.5. tabula

Alēlisko variantu kaitīguma pārbaudes rezultāti

Alēliskais variants (pēc HGVS nomenklatūras)		Alēliskā variantā kaitīguma paredzēšanas rīki			
Reference: NM_00005 3.3	Reference: NP_00004 4.2	<i>Polyphen-2</i>	<i>Mutation Taster</i>	<i>SIFT</i>	<i>Panther software</i>
		Prognoze	Prognoze	Prognoze	Prognoze
c.3800A>G	p.Asp1267 Gly	Iespējams, patogēns	Slimību izraisošs	Patogēns	Iespējams, patogēns
c.3971A>C	p.Asn1324 Thr	Iespējams, patogēns	Slimību izraisošs	Patogēns	Iespējams, patogēns

Abi jaunie varianti tika pārbaudīti arī kontroles grupai. Neaprakstītais 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. 3.6. un 3.7. tabulā.

3.6. tabula

Neaprakstītā *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 UNIPROTKB_HUMAN, n.d.)	
PM2 (pierādījums izpildās)	Konkrētais variants netika atrasts <i>1000 genome project</i> datubāzē (NCBI, n.d.)	
PM5 (pierādījums izpildās)	Atrasti patogēni varianti VS datubāzē (University of Alberta, n.d.): c.3800A>C (p.Asp1267Ala) un c.3800A>T (p.Asp1267Val)	
PP3 (pierādījums izpildās)	Četri kaitīguma 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	
Slēdziens: 3 vidēji kritēriji (PM1+PM2+PM5) + 2 atbalstoši (PP3+PP4) = visdrīzāk, patogēns (likely pathogenic)		

3.7. tabula

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 UNIPROTKB_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 izraisīšu (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 (<i>likely pathogenic</i>)	

3.3.2. *ATP7B* gēna promotera analīze

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

3.3.3. *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. eksona kopiju skaita izmaiņām (duplikāciju) vienam pacientam (relatīvā fluorescentā signāla koeficients = 1,31), kā arī par 18. un 19. eksona kopiju skaita izmaiņām (duplikāciju) citam pacientam (relatīvā fluorescentā signāla koeficients = 1,34). Iegūtie rezultāti tika pārbaudīti, izmantojot *qPCR*.

3.3.4. *ATP7B* gēna pārbaude ar *qPCR*

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

3.3.5. *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 nomaiņas varianti (nesinonīmā viena nukleotīda nomaiņa) 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. 3.8. tabulā.

Salīdzinot viena nukleotīda nomaiņu 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.

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

Salīdzinot H1069Q alēliskā variantā klātbūtni genotipā ar citiem variantiem, statistiski nozīmīga atšķirība tika atrasta starp vairāk samazinātu ceruloplazmīna līmeni asinīs un ne-H1069Q alēliskā variantu genotipā (skat. 3.9. 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

3.4. *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 brīvpiecejas 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 analīzē, jo tam ar lielāko varbūtību nav ietekmes uz *ATOX1* gēna ekspresiju.

3.5. *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. 3.10. tabulā.

3.10. tabula

***COMMD1* gēnā atrastie varianti VS pacientiem**

Variants	NM_152516.3	NP_689729.1	Atrašanās vieta <i>COMMD1</i>	MAF *	MAF **	p vērtība
rs569267407	c.-68_67 del TT	-	1. introns	0,0088	0,0020	0,1469
rs55677935	c.358 C>T	p.Arg 120Trp	2. eksons	0,0440	0,0215	0,1553
rs9096	c.492 C>T	p.Asp 164=	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. 3.11. tabulā).

3.11. 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. 3.12. tabulā.

3.12. tabula

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

Variants	A1 *	A2 **	Modelis	Neiroloģiskie simptomi n = 7	Hepatoloģiskie simptomi n = 42	p vērtība
rs55677935	C	T	Genotipu (TT/TC/CC)	0/0/7	1/2/39	0,9999
	C	T	Alēliskais (T/C)	0/14	4/80	0,9999
	C	T	Dominantais (TT+TC/CC)	0/7	3/39	0,9999
	C	T	Recesīvais (TT/TC+CC)	0/7	1/41	0,9999
rs9096	T	C	Genotipu (CC/CT/TT)	0/1/6	1/6/35	0,9999
	T	C	Alēliskais (C/T)	1/13	8/76	0,9999
	T	C	Dominantais (CC+CT/TT)	1/6	7/35	0,9999
	T	C	Recesīvais (CC/CT+TT)	0/7	1/41	0,9999
Variants	A1 *	A2 **	Modelis	Ne-VS*** n = 13	VS**** n = 49	p vērtība
rs55677935	T	C	Genotipu (TT/TC/CC)	0/1/12	1/2/46	0,6202
	T	C	Alēliskais (T/C)	1/25	4/94	0,9999
	T	C	Dominantais (TT+TC/CC)	1/12	3/46	0,9999
	T	C	Recesīvais (TT/TC+CC)	0/13	1/48	0,9999
rs9096	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.

Starp alēļu un genotipu biežumiem un VS pirmajām klīniskajām izpausmēm netika atrastas statistiski nozīmīgas atšķirības. Salīdzinot abu variantu sastopamības biežumu (pēc

dominantā iedzimšanas modeļa) un pirmo simptomu parādīšanās vecumu, netika novērotas atšķirības (rs9096 – $p = 0,112$; rs55677935 – $p = 0,146$).

3.6. *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. 3.13. tabulā). Tā kā pirmie seši no minētajiem variantiem pārmantojas kopā un starp to alēļu biežumiem netika novērotas atšķirības (alēļu biežumu skat. 3.13. tabulā), tad analīzei tika izvēlēts viens no tiem – rs66508328, kā arī rs11708215, kuru biežums atšķīrās no pārējiem minētajiem variantiem.

3.13. tabula

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. 3.14. 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.

3.7. *HFE* gēna variantu pārbaude

HFE gēnā tika analizēti divi patogēnie varianti: C282Y un H63D. Genotipu sadalījumu skat. 3.15 tabulā.

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 – vīrietiņiem attiecīgi 0,054 g/L, bet sievietei – 0,089 g/L (pie normas > 0,2 g/L).

***HFE* genotipu sadalījums VS pacientiem atkarībā no pirmajiem slimības izpausmes simptomiem**

Genotips pēc <i>HFE</i> variantiem	VS pirmās izpausmes (n = 61)			
	Hepatoloģiskie	Neirolōģiskie	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

Veicot klīnisko un bioķīmisko datu salīdzināšanu ar *HFE* gēna genotipiem, statistiski nozīmīgas atšķirības netika atrastas (rezultātus skat. 3.16. 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.

4. Diskusija

Darba mērķis bija izpētīt VS raksturojošos ģenētiskos faktorus, kā arī noteikt to asociāciju ar slimības klīniskajām izpausmēm. Darba rezultāti liecina, ka VS Latvijā ir sastopama salīdzinoši bieži, to izraisa dažādi patogēnie alēliskie varianti *ATP7B* gēnā, 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 aptuvens, 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 izglītotību 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 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 veseliem indivīdiem, sekvenējot *ATP7B* gēnu. Latvijas VS pacienti tika diagnosticēti sākotnēji pēc klīniskajiem simptomiem vai tikai molekulāri starp pacientu radniekiem, 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 jebkuram 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 et al* 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 sibiēm. 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 sekvenču 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 analizē.

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 meta-analīzes 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). Citos pētījumos, savukārt, 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 izraisošo variantu un klīniskajiem simptomiem vai slimības pirmo izpausmju vecumu.

Citā pētījumā *Gromadzka* 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* (2005) 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* 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 variantu 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 variantu 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 variantu 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 (< 5mg/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. Neiroloģiskie 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., 2015b), 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. 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., 2015).

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.

Klīniskās rekomendācijas

1. Visiem pacientiem ar klīniski apstiprinātu Vilsona slimību vai aizdomām par to, sākotnēji veikt biežākā alēliskā variantā 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 genotipu *ATP7B* gēnā 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* gēna 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.

Publikācijas

Publikācijas starptautiska mēroga recenzējamās izdevumos (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.

Ziņojumi kongresos un konferencēs (15)

1. **Zariņa A.**, Kreile M., Tolmane I., Černušenko A., Čerņevska G, Puķīte I., Krūmiņa Z., Gailīte L. 2018. *Vilsons slimība Latvijā: 17 gadu pieredze molekulārajā diagnostikā*. RSU Zinātniskā konference. Rīga, 242.
2. **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.
3. **Zariņa A.**, Tolmane I., Černušenko A., Puķīte I., Čerņevska G., Krūmiņa Z., Kreile M., Piekuse L. 2017. *ATOX1 gēna variantu ietekme uz Vilsons slimības klīnisko gaitu*. RSU Zinātniskā konference. Rīga, 292.
4. **Zariņa A.**, Piekuse L., Kreile M., Tolmane I., Čerņevska G., Puķīte I., Krūmiņa Z., Keihs J. 2016. *Vilsons slimības pirmās klīniskās izpausmes bērniem vecumā līdz 18 gadiem Latvijas populācijā*. RSU Zinātniskā konference. Rīga, 162.
5. **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.
6. **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.

7. **Zariņa A.**, Piekuse L., Kreile M., Tolmane I., Keiņš J., Čerņusenko A., Čerņevska G., Puķīte I., Krūmiņa Z., Krūmiņa A. 2015. *Kritēriji Vilsona slimības klīniskajai un molekulārajai diagnostikai.* RSU Zinātniskā konference. Rīga. 173.
8. **Zarina A.**, Piekuse L., Kreile M., Steinberga Z., Tolmane I., Keiss J., Chernusenko A., Sondore V., Cernevska G., Krumina Z., Krumina A. 2014. *Mutations in genes HFE, SERPINAI, CFTR in Wilson's disease patients in Latvia.* European Journal of Human Genetics. ESHG Conference, Abstracts. 22, Suppl.1, 397.
9. **Zariņa A.**, Piekuse L., Kreile M., Tolmane I., Keiņš J., Sondore V., Čerņusenko 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.
10. **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.
11. **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.
12. **Zariņa A.**, Kreile M., Piekuse L., Čerņevska G., Keiņš J., Mičule I., Krūmiņa A. 2010. *Vilsona slimības izraisošās mutācijas H1069Q biežums bērniem līdz 18 gadu vecumam Latvijas populācijā.* RSU Zinātniskā konference, Rīga. 240.
13. **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.
14. **Zariņa A.** 2008. *Vilsona slimības fenotipiski genotipiskā struktūra Latvijā.* RSU 57. Medicīnas nozares studentu zinātniskā konference, Rīga. 21.-22.
15. 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.

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
- Arioz, C. Y. L., and Wittung-Stafshede, P. 2017. The Six Metal Binding Domains in Human Copper Transporter, ATP7B: Molecular Biophysics and Disease-Causing Mutations. *BioMetals*. 10, 1-18. DOI: 10.1007/s10534-017-0058-2
- Arredondo, M., Munoz, P., Mura, C. V. and Nunez, M. T. 2003. DMT1, a Physiologically Relevant Apical Cu¹⁺ transporter of Intestinal Cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 284(6), 1525-1530. DOI: 10.1152/ajpcell.00480.2002
- Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Migliardi, M., Natile, G., Nushi, F. and Rosato, A. 2009. Solution Structures of the Actuator Domain of ATP7A and ATP7B, the Menkes and Wilson Disease Proteins. *Biochemistry*. 48(33), 7849-55. DOI: 10.1021/bi901003k
- Bauerly, K. A., Kelleher, S. L. and Lonnerdal, B. 2005. Effects of Copper Supplementation on Copper Absorption, Tissue Distribution, and Copper Transporter Expression in an Infant Rat Model. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 288(5), G1007-G1014. DOI: 10.1152/ajpgi.00210.2004

- Beinhardt, S., Leiss, W., Stattermayer, A. F., Graziadei, I. et al. 2014. Long-Term Outcomes of Patients With Wilson Disease in a Large Austrian Cohort. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 12(4), 683-689. DOI: 10.1016/j.cgh.2013.09.025
- 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
- Bie, P. de, Muller, P., Wijmenga, C. and Klomp, L. W. J. 2007. Molecular Pathogenesis of Wilson and Menkes Disease: Correlation of Mutations with Molecular Defects and Disease Phenotypes. *Journal of Medical Genetics*. 44(11), 673-88. DOI: 10.1136/jmg.2007.052746
- 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.].
- Bost, M., Piguet-Lacroix, G., Parant, F. and Wilson, C. M. R. 2012. Molecular Analysis of Wilson Patients: Direct Sequencing and MLPA Analysis in the ATP7B Gene and Atox1 and COMMD1 Gene Analysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 26(2-3), 97-101. DOI: 10.1016/j.jtemb.2012.04.024
- Braiterman, L. T., Arnab Gupta, Raghothama Chaerkady, Cole, R. N., and Hubbard, A. L. 2015. Communication between the N and C Termini Is Required for Copper-Stimulated Ser/Thr Phosphorylation of Cu(I)-ATPase (ATP7B). *The Journal of Biological Chemistry*. 290(14), 8803-8819. DOI: 10.1074/jbc.M114.627414
- Brewer, G. J., and Askari, F. K. 2005. Wilson's Disease: Clinical Management and Therapy. *Journal of Hepatology*. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.11.013
- 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.
- Bull, P. C., Gordon R. T., Rommens, J. M., Forbes, J. R. and Wilson Cox, D. 1993. The Wilson Disease Gene Is a Putative Copper Transporting P-type ATPase Similar to the Menkes Gene. *Nature Genetics*. 5(4), 327-37. DOI: 10.1038/ng1293-13327
- Burstein, E., Hoberg, J. H., Wilkinson, A. S., Rumble, J. M., Csomos, R. A., Komarck, C. M.,

- Maine, G. N., Wilkinson, J. C., Mayo, M.W. and Duckett, C. D. 2005. COMMD Proteins, a Novel Family of Structural and Functional Homologs of MURR1. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(23), 22222-22232. DOI: 10.1074/jbc.M501928200
- 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
- Chen, C., Shen, B., Jia-Jia Xiao, Wu, R., Duff Canning, S. J. and Xiao-Ping Wang. 2015. Currently Clinical Views on Genetics of Wilson's Disease. *Chinese Medical Journal*. 128(13), 1826-1830. DOI:10.4103/0366-6999.159361
- Cobine, P. A., Pierrel, F. and Winge, D. R. 2006. Copper Trafficking to the Mitochondrion and Assembly of Copper Metalloenzymes. 1763(7), 759-772. DOI:10.1016/j.bbamcr.2006.03.002
- 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
- Collet, C., Laplanche, J. L., Page, J., Morel, H., Woimant, F. and Poujois, A. 2018. High Genetic Carrier Frequency of Wilson's Disease in France: Discrepancies with Clinical Prevalence. *BMC Med Genet*. 19(1), 143. DOI: 10.1186/s12881-018-0660-3
- Concilli, M., Iacobacci, S., Chesi, G., Carissimo, A. and Polishchuk, R. 2016. A Systems Biology Approach Reveals New Endoplasmic Reticulum-Associated Targets for the Correction of the ATP7B Mutant Causing Wilson Disease. *Metallomics*. 8(9), 920-930. DOI: 10.1039/C6MT00148C
- Cope-Yokoyama, S., Finegold, M. J., Sturniolo, G. C., Kim, K., Mescoli, C., Rugge, M. and Medici, V. 2010. Wilson Disease: Histopathological Correlations with Treatment on Follow-up Liver Biopsies. *World Journal of Gastroenterology*. 16(12), 1487-1494. DOI: 10.3748/WJG.V16.I12.1487
- 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.].

- 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
- Culotta, V. C., Yang, M. and O'Halloran, T.V. 2006. Activation of Superoxide Dismutases: Putting the Metal to the Pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1763(7), 747-758. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.003
- 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
- Dedoussis, G. V. Z., Genschel, J., Sialvera, T-E., Bochow, B., Manolaki, N., Manios, Y., Tsafantakis, E. and Schmidt, H. 2005. Wilson Disease: High Prevalence in a Mountaineous Area of Crete. *Annals of Human Genetics*. 69(3), 268-274. DOI: 10.1046/J.1469-1809.2005.00171.x
- Dong, Y., Ni.W., Chen, W-J., Wan, B., Zhao, G-X. et al. 2016. Spectrum and Classification of ATP7B Variants in a Large Cohort of Chinese Patients with Wilson's Disease Guides Genetic Diagnosis. *Theranostics*. 6(5), 638-649. DOI: 10.7150/thno.14596
- 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

- Eisenbach, C., Sieg, O., Stremmel, W., Encke, J. and Merle, U. 2007. Diagnostic Criteria for Acute Liver Failure Due to Wilson Disease. *World Journal of Gastroenterology*. 13(11). DOI: 10.3748/wjg.v13.i11.1711
- Ensembl Genome Browser 94. [N.d.] Available from: <https://www.ensembl.org/index.html>[viewed 21.10.2018.].
- 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
- Ferenci, P., Sluis, B. van de, Burstein, E., Berghe, P. V. van de, et al. 2011. Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase as Disease Modifier - a Déjà-vu in Wilson Disease? *Journal of Hepatology*. 55(4), 753-755. DOI:10.1016/j.jhep.2011.02.025
- Ferenci, P., Steindl-Munda, P., Vogel, W., Jessner, W. et al. 2005. Diagnostic Value of Quantitative Hepatic Copper Determination in Patients With Wilson's Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 3(8), 811-818. DOI:10.1016/S1542-3565(05)00181-3
- Fontaine, S. L. L., Firth, S. D., Camakaris, J., Englezou, A. et al. 1998. Correction of the Copper Transport Defect of Menkes Patient Fibroblasts by Expression of the Menkes and Wilson ATPases. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(47), 31375-31380. DOI:10.1074/JBC.273.47.31375
- Forbes, J. R. and Cox, D. W. 1998. Functional Characterization of Missense Mutations in ATP7B: Wilson Disease Mutation or Normal Variant? *The American Journal of Human Genetics*. 63(6), 1663-1674. DOI: <https://doi.org/10.1086/302163>
- 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

- Gow, P. J., Smallwood, R. A., Angus, P. W., Smith, A. L., Wall, A. J. and Sewell, R. B. 2000. Diagnosis of Wilson's Disease: An Experience over Three Decades. *Gut*. 46(3), 415-419. DOI: 10.1136/gut.46.3.415
- 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>
- Hamza, I., Faisst, A., Prohaska, J., Chen, J., Gruss, P. and Gitlin, J. D. 2001. The Metallochaperone Atox1 Plays a Critical Role in Perinatal Copper Homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(12), 6848-6852. DOI: 10.1073/pnas.111058498
- Hamza, I., Schaefer, M., Klomp, L. W. and Gitlin, J. D. 1999. Interaction of the Copper Chaperone HAH1 with the Wilson Disease Protein Is Essential for Copper Homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(23), 13363-13368. DOI: 10.1073/pnas.96.23.13363
- Hamza, I., Prohaska, J. and Gitlin, J. D. 2003. Essential Role for Atox1 in the Copper-Mediated Intracellular Trafficking of the Menkes ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(3), 1215-1220. DOI: 10.1073/pnas.0336230100
- Harris, Z. L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., MacGillivray, R. T. and Gitlin, J. D. 1995. Aceruloplasminemia: Molecular Characterization of This Disorder of Iron Metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(7), 2539-2543. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7708681>
- 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.].
- Hochstrasser, H., Bauer, P., Walter, U., Behnke, S. et al. 2004. Ceruloplasmin Gene Variations and Substantia Nigra Hyperechogenicity in Parkinson Disease. *Neurology*. 63(10), 1912-1917. DOI: 10.1212/01.wnl.0000144276.29988.c3
- 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.].
- Hussain, F., Olson, J. S. and Wittung-Stafshede, P. 2008. Conserved Residues Modulate Copper Release in Human Copper Chaperone Atox1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), 11158-11163. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0802928105.
- Huster, D. 2010. Wilson Disease. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. 24(5), 531–39. DOI: 10.1016/j.bpg.2010.07.014
- Huster, D., Kühne, A., Bhattacharjee, A., Raines, L. et al. 2012. Diverse Functional Properties of Wilson Disease ATP7B Variants. *Gastroenterology*. 142(4), 947-956.e5. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.12.048
- Huster, D., Purnat, T. D., Burkhead, J. L., Ralle, M., Fiehn, O., Stuckert, F., Olson, N. E., Teupser, D. and Lutsenko, S. 2007. High Copper Selectively Alters Lipid Metabolism and Cell Cycle Machinery in the Mouse Model of Wilson Disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(11), 8343–8355. DOI:10.1074/jbc.M607496200
- Inesi, G., Pilankatta, R. and Tadini-Buoninsegni, F. 2014. Biochemical Characterization of P-Type Copper ATPases. *The Biochemical Journal*. 463(2), 167-176. <https://doi.org/10.1042/BJ20140741>
- Jang, Ja-H., Taeheon L., Sunghee Bang, Young-Eun K. and Eun-Hae Cho. 2017. Carrier Frequency of Wilson's Disease in the Korean Population: A DNA-Based Approach. *Journal of Human Genetics*. 62(9), 815-818. <https://doi.org/10.1038/jhg.2017.49>
- 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>

- Kato, J., Yutaka Kohgo, Naoki Sugawara, Shinichi Katsuki, Naoaki Shintani, Kohshi Fujikawa, Etsu Miyazaki, Masayoshi Kobune, Noritoshi Takeichi and Yoshiro Niitsu. 1993. Abnormal Hepatic Iron Accumulation in LEC Rats. *Japanese Journal of Cancer Research*. 84(3), 219-222. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1993.tb02859.x>
- Kim, Byung-Eun, Tracy Nevitt and Dennis J Thiele. 2008. Mechanisms for Copper Acquisition, Distribution and Regulation. *Nature Chemical Biology*. 4(3), 176-185. <https://doi.org/10.1038/nchembio.72>
- Klomp, A. E. M., van de Sluis, B., Klomp, L. W. J. and Wijmenga, C. 2003. The Ubiquitously Expressed MURR1 Protein Is Absent in Canine Copper Toxicosis. *Journal of Hepatology*. 39(5), 703-709. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568250>
- Knopf, M. and Solioz, M. 2002. Characterization of a Cytochrome B558 Ferric/Cupric Reductase from Rabbit Duodenal Brush Border Membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 291(2), 220-225. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6423>
- Kodama Hiroko, Yoshiko Murata, and Masaaki Kobayashi. 1999. Clinical Manifestations and Treatment of Menkes Disease and Its Variants. *Pediatrics International*. 41(4), 423-429. <https://doi.org/10.1046/j.1442-200x.1999.01095.x>
- Krijt, J., Dutá, A. and Kozich, V. 2009. Determination of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine by LC-MS/MS and Evaluation of Their Stability in Mice Tissues. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 877(22), 2061-2066. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.039>
- Kucinskas, L., Jeroch, J., Vitkauskienė, A., Sakalauskas, R., Petrenkienė, 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>
- Kuo, Y. 1997. Developmental Expression of the Mouse Mottled and Toxic Milk Genes Suggests Distinct Functions for the Menkes and Wilson Disease Copper Transporters. *Human Molecular Genetics*. 6(7), 1043-1049. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.7.1043>
- Kuo, Y-M., Gybina, A. A., Pyatskowitz, J. W., Gitschier, J. and Prohaska, J. R. 2006. Copper Transport Protein (Ctr1) Levels in Mice Are Tissue Specific and Dependent on Copper Status. *The Journal of Nutrition*. 136(1), 21-26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365053>

- 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
- Le, A., Shibata, N. M., French, S. W., Kyoungmi Kim, Kharbanda, K. K., Islam, M. S., LaSalle, J. M., Halsted, C. H., Keen, C. L. and Medici, V. 2014. Characterization of Timed Changes in Hepatic Copper Concentrations, Methionine Metabolism, Gene Expression, and Global DNA Methylation in the Jackson Toxic Milk Mouse Model of Wilson Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(5), 8004-8023. <https://doi.org/10.3390/ijms15058004>
- Lebron, J. A., Bennett, M. J., Vaughn, D. E., Chirino, A. J., Snow, P. M., Mintier, G. J., Feder, J. N. and Bjorkman, P. J. 1998. Crystal Structure of the Hemochromatosis Protein HFE and Characterization of Its Interaction with Transferrin Receptor. *Cell*. 93(1), 111-123. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81151-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81151-4)
- 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
- LeShane, E. S., Shinde, U., Walker, J. M., Barry, A. N., Blackburn, N. J., Ralle, M. and Lutsenko, S. 2010. Interactions between Copper-Binding Sites Determine the Redox Status and Conformation of the Regulatory N-Terminal Domain of ATP7B. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(9), 6327-6336. DOI:10.1074/jbc.M109.074633
- Linder, M. C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R. and Lomeli, N. 1998. Copper Transport. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 67(5 Suppl), 965S-971S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9587137>
- Litwin, T., Gromadzka, G. and Czlonkowska, A. 2012. Gender Differences in Wilson's Disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 312(1-2), 31-35. DOI: 10.1016/j.jns.2011.08.028
- Litwin, T., Gromadzka, G., Czlonkowska, A., Lin, R. C. and et al. 2012. Apolipoprotein E Gene (APOE) Genotype in Wilson's Disease: Impact on Clinical Presentation. *Parkinsonism & Related Disorders*. 18(4), 367-369. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.12.005>
- Liu, Xiao-Qing, Ya-Fen Zhang, Tze-Tze Liu, Kwang-Jen Hsiao, Jian-Ming Zhang, Xue-Fan

- Gu, Ke-Rong Bao, Li-Hua Yu, and Mei-Xian Wang. 2004. Correlation of ATP7B Genotype with Phenotype in Chinese Patients with Wilson Disease. *World Journal of Gastroenterology*. 10(4), 590-593. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i4.590>
- 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
- Ludwig, J., Moyer, T. P. and Rakela, J. The liver biopsy diagnosis of Wilson's disease. *Methods in pathology. Am J Clin Pathol*. 1994.102(4), 443-446. DOI:10.1093/ajcp/102.4.443
- Lutsenko, S., Barnes, N. L., Bartee, M. Y. and Dmitriev, O. Y. 2007. Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiological Reviews*. 87(3), 1011- 1046. DOI: 10.1152/physrev.00004.2006
- Maine, G. N. and Burstein, E. 2007. COMMD Proteins and the Control of the NF Kappa B Pathway. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. 6(6), 672-676. DOI: 10.4161/cc.6.6.3989
- Mann, J. R., Camakaris, J. and Danks, D. M. 1979. Copper Metabolism in Mottled Mouse Mutants: Distribution of ^{64}Cu in Brindled (Mobr) Mice. *Biochemical Journal*. 180(3), 613-619. DOI: 10.1042/bj1800613
- Medici, V., Shibata, N. M., Kharbanda, K. K., LaSalle, J. M. et al. 2013. Wilson's Disease: Changes in Methionine Metabolism and Inflammation Affect Global DNA Methylation in Early Liver Disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 57(2), 555-565. DOI:10.1002/hep.26047
- Merle, U., Schaefer, M., Ferenci, P. and Stremmel, W. 2007. Clinical Presentation, Diagnosis and Long-Term Outcome of Wilson's Disease: A Cohort Study. *Gut*. 56(1), 115-120. DOI: 10.1136/gut.2005.087262
- Meyer, L. A., Durley, A. P., Prohaska, J. R. and Harris, Z. L. 2001. Copper Transport and Metabolism Are Normal in Aceruloplasminemic Mice. *The Journal of Biological*

- Chemistry*. 276(39), 36857-36861. DOI: 10.1074/jbc.M105361200
- 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., Raguenes, 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.].
- Nicastro, E., Ranucci, G., Vajro, P., Vegnente, A. and Iorio, R. 2010. Re-Evaluation of the Diagnostic Criteria for Wilson Disease in Children with Mild Liver Disease. *Hepatology*. 52(6), 1948-1956. <https://doi.org/10.1002/hep.23910>
- Oh, B., Kim, H., Park, H., Shim, Y., Choi, J., Park, C. and Park, Y.N. 2007. DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *International Journal of Molecular Medicine*. 20, 65-73. <https://doi.org/10.3892/ijmm.20.1.65>
- Okada, T., Shiono, Y., Hayashi, H., Satoh, H. et al. 2000. Mutational Analysis Of ATP7B and 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
- Olivieri, S., Conti, A., Iannaccone, S., Cannistraci, C. V. et al. 2011. Ceruloplasmin Oxidation, a Feature of Parkinson's Disease CSF, Inhibits Ferroxidase Activity and Promotes Cellular Iron Retention. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 31(50), 18568-18577. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3768-11.2011

- OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. [N.d.] Available from:
<https://www.omim.org/> [viewed 19.10.2018.].
- Pantopoulos, K. 2008. Function of the Hemochromatosis Protein HFE: Lessons from Animal Models. *World Journal of Gastroenterology*. 14(45), 6893-6901.
 DOI:10.3748/wjg.14.6893
- Patel, B. N., Dunn, R. J., Young Jeong, S., Qinzhang Zhu, Julien, J-P. and David, S. 2002. Ceruloplasmin Regulates Iron Levels in the CNS and Prevents Free Radical Injury. *Journal of Neuroscience*. 22(15), 6578-6586. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06578.2002
- Payne, A. S., Kelly, E. J. and Gitlin, J. D. 1998. Functional Expression of the Wilson Disease Protein Reveals Mislocalization and Impaired Copper-Dependent Trafficking of the Common H1069Q Mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(18), 10854-10859. DOI: 10.1073/pnas.95.18.10854
- Petrukhin, K., Lutsenko, S., Chernov, I., Ross, B. M., Kaplan, J. H. and Gilliam, T. C. 1994. Characterization of the Wilson Disease Gene Encoding a P-Type Copper Transporting ATPase: Genomic Organization, Alternative Splicing, and Structure/Function Predictions. *Human Molecular Genetics*. 3(9), 1647-1656. DOI: 10.1093/hmg/3.9.1647
- 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.
- Poon, Kok-Siong, Karen Mei-Ling Tan, and Evelyn Siew-Chuan Koay. 2016. Targeted Next-Generation Sequencing of the ATP7B Gene for Molecular Diagnosis of Wilson Disease. *Clinical Biochemistry*. 49(1-2), 166-171. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.10.003
- Prashanth, L. K., Sinha, S., Taly, A. B. and Vasudev, M. K. 2010. Do MRI Features Distinguish Wilson's Disease from Other Early Onset Extrapyrmidal Disorders? An Analysis of 100 Cases. *Movement Disorders*. 25(6), 672-678.
<https://doi.org/10.1002/mds.22689>.
- Primer3 Input (Version 0.4.0). [N.d.] Aivailable from: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>
 [viewed 19.10.2018.].
- Prohaska, J. R., and Gybina, A. A. 2004. Intracellular Copper Transport in Mammals. *The Journal of Nutrition*. 134(5), 1003-1006.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113935>
- Punter, F. A. and Glerum, D. M. 2003. Mutagenesis Reveals a Specific Role for Cox17p in

- Copper Transport to Cytochrome Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(33), 30875-30880. doi:10.1074/jbc.M302358200
- Ralle, M., Lutsenko, S. and Blackburn, N. J. 2003. X-Ray Absorption Spectroscopy of the Copper Chaperone HAH1 Reveals a Linear Two-Coordinate Cu(I) Center Capable of Adduct Formation with Exogenous Thiols and Phosphines. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(25), 23163-23170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303474200>
- 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>.
- Riera-Romo, M. 2018. COMMD1: A Multifunctional Regulatory Protein. *Journal of Cellular Biochemistry*. 119(1), 34-51. <https://doi.org/10.1002/jcb.26151>
- Roberts, E. A. and Schilsky, M. L. 2003. A Practice Guideline on Wilson Disease. *Hepatology*. 37(6), 1475-1492. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50252>
- 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.].
- Schilsky, M. L. Wilson Disease: Epidemiology and Pathogenesis. UpToDate. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/wilson-disease-epidemiology-and-pathogenesis> [viewed 28.01.2020.].
- Seniow, J., Bak, T., Gajda, J., Poniatowska, R. and Czlonkowska, A. 2002. Cognitive Functioning in Neurologically Symptomatic and Asymptomatic Forms of Wilson's Disease. *Movement Disorders*. 17(5), 1077-1083. DOI: 10.1002/mds.10195
- Silva, D. M. de, Askwith, C. C. and Kaplan, J. 1996. Molecular Mechanisms of Iron Uptake in Eukaryotes. *Physiological Reviews*. 76(1), 31-47. DOI:10.1152/physrev.1996.76.1.31
- 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.

- 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>
- Stevenson, T. C., Ciccotosto, G. D., Xin-Ming Ma, Mueller, G. P., Mains, R. E. and Eipper, B. A. 2003. Menkes Protein Contributes to the Function of Peptidylglycine α -Amidating Monooxygenase. *Endocrinology*. 144(1), 188-200. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220716>
- 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>
- Svetel, M., Potrebic, A., Pekmezovic, T., Tomic, A., Kresojevic, N., Jesic, R., Dragasevic, N. and Kostic, V. S. 2009. Neuropsychiatric Aspects of Treated Wilson's Disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 15(10), 772-775. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.01.010>
- Tao, J., Yang, M., Chen, Z., Huang, Y., et al. 2008. Decreased DNA Methyltransferase 3A and 3B mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Increased Plasma

- SAH Concentration in Adult Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Journal of Clinical Immunology*. 28(5), 432-439. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9223-2>
- Torsdottir, G., Sveinbjornsdottir, S., Kristinsson, J., Snaedal, J. and Johannesson, T. 2006. Ceruloplasmin and Superoxide Dismutase (SOD1) in Parkinson's Disease: A Follow-up Study. *Journal of the Neurological Sciences*. 241(1-2), 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.10.015>
- Tsivkovskii, R., Efremov, R. G. and Lutsenko, S. 2003. The Role of the Invariant His-1069 in Folding and Function of the Wilson's Disease Protein, the Human Copper-Transporting ATPase ATP7B. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(15), 13302-13308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300034200>
- 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>
- Walker, J. M., Tsivkovskii, R. and Lutsenko, S. 2002. Metallochaperone Atox1 Transfers Copper to the NH₂-Terminal Domain of the Wilson's Disease Protein and Regulates Its Catalytic Activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(31), 27953-27959. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203845200>
- Wang, Li-H., Ye-Qing Huang, Xuan Shang, Quan-Xi Su, Fu Xiong, Qing-Yun Yu, Hui-Ping Lin, Zhi-Sheng Wei, Ming-Fan Hong, and Xiang-Min Xu. 2011. Mutation Analysis of 73 Southern Chinese Wilson's Disease Patients: Identification of 10 Novel Mutations and Its Clinical Correlation. *Journal of Human Genetics*. 56(9), 660-665. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.76>
- Wassenaar-van Hall, H. N. van, Heuvel, A. G. van den, Algra, A., Hoogenraad, T. U. and Mali, W. P. 1996. Wilson Disease: Findings at MR Imaging and CT of the Brain with Clinical Correlation. *Radiology*. 198(2), 531-536. <https://doi.org/10.1148/radiology.198.2.8596862>
- 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>

- Weitzman, E., Pappo, O., Weiss, P., Frydman, M., Haviv-Yadid, Y. and Ari, Z. B. 2014. Late Onset Fulminant Wilson's Disease: A Case Report and Review of the Literature. *World Journal of Gastroenterology*. 20(46), 17656-17660.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i46.17656>
- Werle, E., Schneider, C., Renner, M., Völker, M. and Fiehn, W. 1994. Convenient Single-Step, One Tube Purification of PCR Products for Direct Sequencing. *Nucleic Acids Research*. 22(20), 4354-4355. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7937169>
- Wernimont, A. K., Yatsunyk, L. A. and Rosenzweig, A. C. 2004. Binding of Copper(I) by the Wilson Disease Protein and Its Copper Chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(13), 12269-12276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311213200>
- Wilson disease mutation database. University of Alberta. [N.d.]
<http://www.wilsonsdisease.med.ualberta.ca/database.asp> [viewed 11.02.2019.].
- Wu, F., Wang, J., Pu, C., Qiao, L. and Jiang, C. 2015. Wilson's Disease: A Comprehensive Review of the Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(3), 6419-6431. <https://doi.org/10.3390/ijms16036419>
- Wu, Zhi-Ying, Ning Wang, Min-Ting Lin, Ling Fang, Shen-Xing Murong, and Long Yu. 2001. Mutation Analysis and the Correlation Between Genotype and Phenotype of Arg778Leu Mutation in Chinese Patients With Wilson Disease. *Archives of Neurology*. 58(6), 971. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.6.971>
- 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>

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. Zītai 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 karejeras 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 Grīnfeldei 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.

PIELIKUMI

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Brīvības iela 72, Rīga, LV-1011 • Tālr. 67876182 • Fakss 67876071 • E-pasts: vm@vm.gov.lv

Rīgā

15.09.2016. Nr.1/15-09-16

Rīgas Stradiņa Universitātes
Molekulārās Ģenētikas
Zinātniskajai laboratorijai

*Atzinums par pētījuma pieteikumu
„Vilsona slimības klīnisko gaitu ietekmējošo
ģenētisko faktoru identificēšana”*

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2016.gada 31.martā ir izskatījusi Rīgas Stradiņa Universitātes Molekulārās Ģenētikas Zinātniskās laboratorijas iesniegto pētījuma pieteikumu „*Vilsona slimības klīnisko gaitu ietekmējošo ģenētisko faktoru identificēšana*”.

Pamatojoties uz Centrālās medicīnas ētikas komitejas 2016.gada 31.marta sēdes protokola Nr.2016-2 punktu Nr.5 un iesniegtajiem pētījuma pieteikuma papildinājumiem, tiek izsniegts atzinums, ka Rīgas Stradiņa Universitātes Molekulārās Ģenētikas Zinātniskās laboratorijas pētījums „*Vilsona slimības klīnisko gaitu ietekmējošo ģenētisko faktoru identificēšana*” nav pretrunā ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas
komitejas priekšsēdētāja



E.Pole

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Brīvības iela 72, Rīga, LV-1011 • Tālr. 67876182 • Fakss 67876071 • E-pasts: vm@vm.gov.lv

Rīgā

29.07.2011. Nr.01-29.1/18

Rīgas Stradiņa universitātes
Molekulārās ģenētikas zinātniskajai
laboratorijai

*Atzinums Nr.01-29.1/18 par pieteikuma
projektu „Ksenobiotiķu metabolisma gēnu
polimorfie varianti Latvijas populācijā
un to saistība ar patoloģiju”*

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2011.gada 29.jūlijā izskatīja Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas iesniegto pieteikuma projektu „Ksenobiotiķu metabolisma gēnu polimorfie varianti Latvijas populācijā un to saistība ar patoloģiju”.

Pamatojoties uz Centrālā medicīnas ētikas komitejas 2011. gada 29.jūlija protokola Nr.3 punktu 2, tiek izsniegts atzinums, ka Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas iesniegtais pieteikuma projekts „Ksenobiotiķu metabolisma gēnu polimorfie varianti Latvijas populācijā un to saistība ar patoloģiju” nav pretrunā ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas
komitejas priekšsēdētājs



J.Bundulis

A. Valdmane, 67876097
antra.valdmane@vm.gov.lv

Pielikums Nr. 3

APSTIPRINĀTS

ar SIA „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes
slimnīca” valdes

2014. gada 17. aprīļa lēmumu Nr. V1/01-01/14/192

aslimnīca
RĪGAS AUSTRUMU KLĪNISKĀ UNIVERSITĀTES SLIMNĪCA

SIA Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca
Reģistrācijas Nr.: 40003951628
Hipokrāta iela 2, Rīga, LV-1038, Latvija
Tālr.: 67 042 400, fakss: 67 042 786
E-pasts: aslimnica@aslimnica.lv, www.aslimnica.lv

Rīgā

Centrālajai medicīnas ētikas komitejai
Brīvības iela 72, Rīga, LV-1011, Latvija

2016. gada 28. jūlijā
Nr. A1/1.1-07/16/1588

PIEKRIŠANA AKADEMISKĀ PĒTĪJUMA VEIKŠANAI

Esam informēti par akadēmiskā pētījuma „*Vilsona slimības klīnisko gaitu ietekmējošo ģenētisko faktoru identificēšana*”, atbildīgā pētnieka Dr. Ievas Tolmanes vadībā, veikšanu SIA „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca”.

Pētījumu veic RSU doktorantūras nodaļas 3. gada doktorante Agnese Zariņa stacionārā „Latvijas Infektoloģijas centrs”.

Apstiprinām minētā pētījuma veikšanu Sabiedrības stacionārā „Latvijas Infektoloģijas centrs”.

Pētījums uzsākams pēc Ētikas komitejas atzinuma saņemšanas, atzinuma kopijas iesniegšanas Zinātnes daļā.

Valdes loceklis



Valdes loceklis

Viesturs Boka

Kaspars Plūme

Sagatavoja:
Zinātnes daļas biroja administrators
Ita Sprukule
67040258
Ita.sprukule@aslimnica.lv



Bērnu klīniskā universitātes slimnīca

PĒTNIECISKĀ DARBA PIETEIKUMS

Vārds, uzvārds, kontakti (tālruna numurs, e-pasts)	Agnese Zariņa, tel. 26438568; e-pasts: zarina.agnese@gmail.com
	 darba iesniedzēja paraksts
Izglītības iestāde	Rīgas Stradiņa universitāte, Doktorantūras nodaļa
Pētnieciskā darba tēma	„Vilsons slimības klīnisko gaitu ietekmējošo ģenētisko faktoru identificēšana.”
Pētījuma mērķis	Pētījuma zinātniskais mērķis ir varā metabolisma iedzimtā traucējuma – Vilsons slimības (VS) ģenētikas izpētē raksturojot slimību izraisošo mutāciju spektru un biežumu Latvijā, to korelāciju ar slimības klīniskajām izpausmēm, palielināt Vilsons slimības diagnosticēto pacientu skaitu, pārbaudot mutācijas arī iespējamām riska grupām (pacientiem ar neiroloģiskiem/ psihiatriskiem traucējumiem), kā arī citu iespējamo Vilsons slimību ietekmējošo ģenētisko faktoru identificēšana.
Pētījuma darba metode	Pētījuma uzdevumi: 1) Veikt biežākās Vilsons slimību izraisošās <i>ATP7B</i> gēna mutācijas H1069Q noteikšanu ar PCR-BiPA metodi pacientiem ar klīniski apstiprinātu Vilsons slimību; 2) Veikt <i>ATP7B</i> gēna tiešo sekvenēšanu pacientiem ar klīniski apstiprinātu Vilsons slimību; 3) Veikt mutāciju skrīningu, salīdzināt klīniskos datus molekulāri apstiprināto pacientu ar Vilsons slimības ģimenes locekļiem; 4) Molekulāri apstiprinātajiem pacientiem ar Vilsons slimību veikt mutāciju noteikšanu, kas varētu ietekmēt Vilsons slimības klīnisko gaitu: a) <i>ATOX1</i> gēna tiešā sekvenēšana; b) <i>COMMD1 (MURR1)</i> gēna tiešā sekvenēšana c) <i>SLC31A1 (CTRI)</i> gēna tiešā sekvenēšana d) <i>HFE</i> gēna mutācijas: C282Y un H63D noteikšana ar PCR un <i>RFLP</i> e) <i>SERPINA1</i> gēna mutācijas – PIZ un PIS noteikšana ar PCR un <i>RFLP</i> f) <i>CFTR</i> gēna mutāciju – F508del ar PCR

KS/V-738-01/201

Pētnieciskā darba mērķa grupa	Pētījuma ietvaros būs nepieciešami sekojoši resursi: 1) Pacientu ar Vilsons slimības klīniskajiem simptomiem perifēro asiņu paraugs, no kura tiks izdalīta DNS tālāko molekulāro metožu pielietošanai; 2) Medicīniskās dokumentācijas dati, kuri ietver slimības anamnēzi, slimības attīstības gaitu, dažādu laboratoro izmeklējumu (bioķīmisko, morfoloģisko, attēlu diagnostikas u.c.) rezultātus utt. 3) Pacientu kontaktinformācija – ņemot vērā, ka Vilsons slimība ir pārmantojama, tad pie pozitīvu molekulāro analīžu rezultātiem ir nepieciešamība sazināties ar pacienta radniekiem, tā kā reizēm ar molekulārām metodēm ir iespējams diagnosticēt Vilsons slimību asimptomātiskajā periodā.
Pētījuma laiks	01.09.2016.-01.09.2021.
Darba vadītājs (vārds, uzvārds, iestāde, amats, kontakti)	Zita Krūmiņa, BKUS Medicīniskās ģenētikas un prenatalās diagnostikas ār. e-pasts: zita.krumina@gmail.com
	 10.09.2016 darba vadītāja paraksts

19.09.16

15.09.2016

KS/V-738-01/201