

MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA METABOLICKÝCH NEMOCÍ JATER

Milan Jirsa

Laboratoř Experimentální Hepatologie IKEM
Ústav Lékařské Biochemie a Laboratorní Diagnostiky UK 1.LF



Monogenní metabolické nemoci jater

Wilsonova choroba

Hereditární hemochromatóza

Jaterní porfyrie

Deficit alfa1-antitrypsinu

Jaterní postižení u cystické fibrózy

Vrozené cholestatické syndromy

Familiární cholelitiáza

Vrozené žloutenky

Monogenní metabolické nemoci jater

Wilsonova choroba

Hereditární hemochromatóza

Jaterní porfyrie

Deficit alfa1-antitrypsinu

Jaterní postižení u cystické fibrózy

Vrozené cholestatické syndromy

Familiární cholelitiáza

Vrozené žloutenky

WILSONOVA CHOROBA

- Autosomálně recesivně dědičný deficit ATPasy ATP7B
- Porucha sekrece Cu^{2+} do žluče a neschopnost vestavět Cu^{2+} do apoceruloplasminu
- Prevalence 1/30 000 – 1/40 000
- Masívní depozice Cu^{2+} v játrech, mozku, oku aj.
- Obsah Cu^{2+} v játrech a pankreatu je zvýšen 5-30x
- Choroba je důsledkem toxického působení nahromaděné Cu^{2+}

Příčinou poškození tkání je:

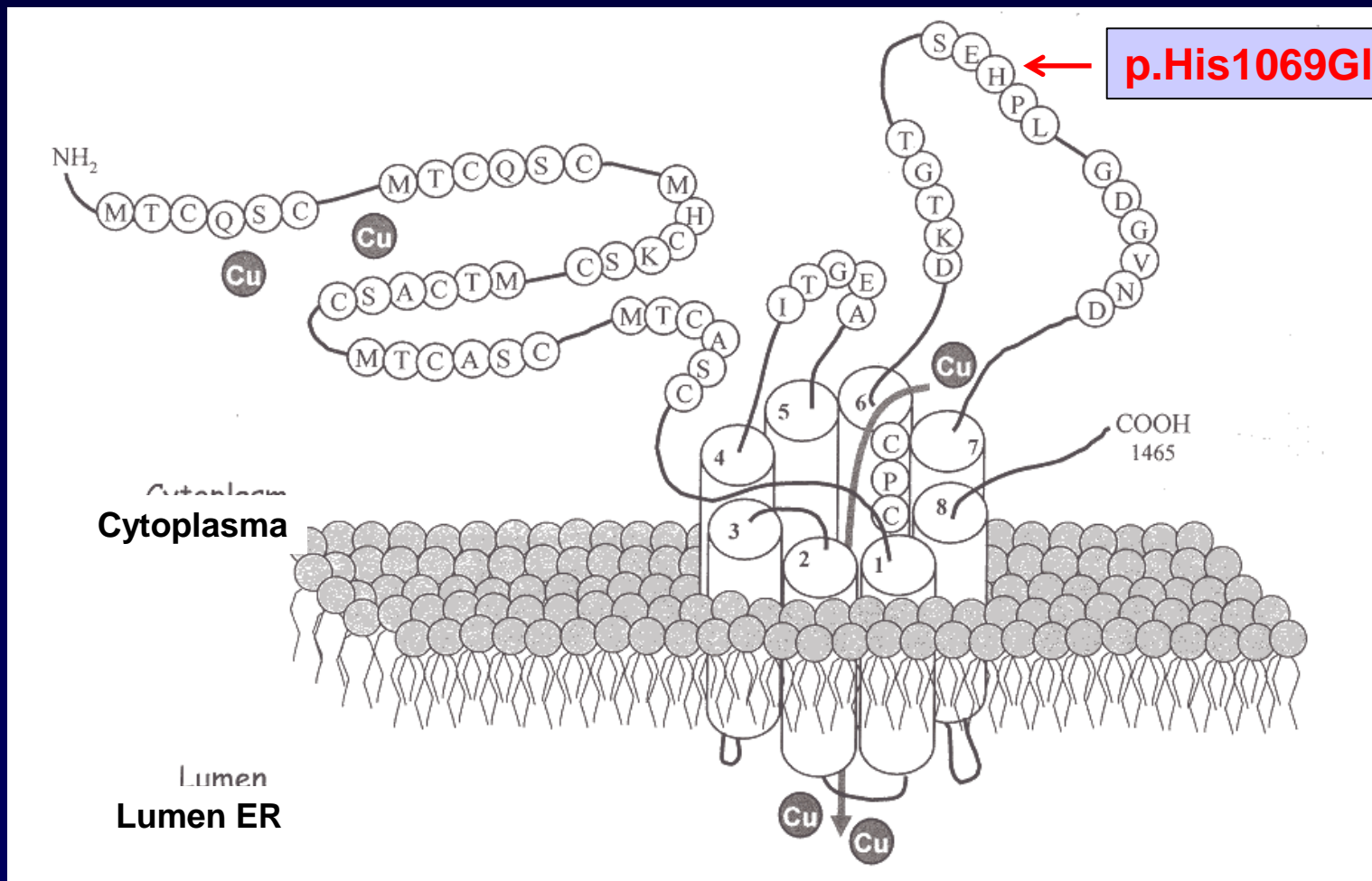
- 1) disrupce mědi přeplněných lysosomů
- 2) peroxidace lipidů membrán buněčných organel
- 3) alterace funkce intracelulárních proteinů

Laboratorní hodnoty metabolismu mědi

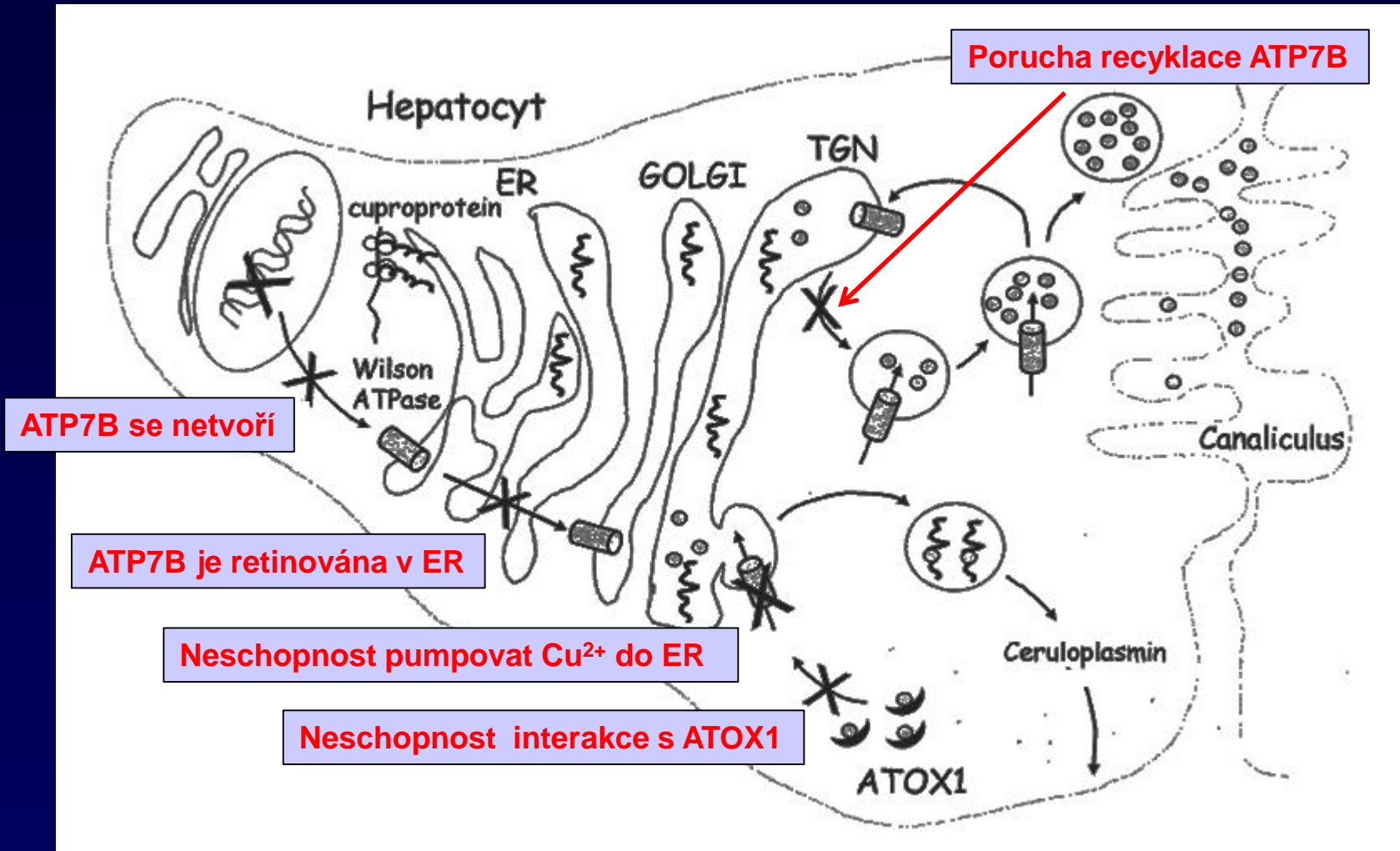
Vyšetření	normální hodnoty	Wilsonova nemoc
S-celková Cu^{2+}	13 – 23 $\mu\text{mol/l}$	<13 $\mu\text{mol/l}$
S-volná Cu^{2+}	< 2 $\mu\text{mol/l}$	> 2 $\mu\text{mol/l}$
S-ceruloplasmin	> 0,2 g/l	< 0,2 g/l
U-odpad Cu^{2+}	< 0,75 $\mu\text{mol}/24\text{h}$	> 1,5 $\mu\text{mol}/24\text{h}$
Penicilaminový test	< 2 (5) $\mu\text{mol}/24\text{h}$	> 5 $\mu\text{mol}/24\text{h}$
Cu^{2+} v játrech	< 50 $\mu\text{g/g}$ sušiny	> 250 $\mu\text{g/g}$

Poznámka: vyšetření ceruloplasminu je **nespolehlivé**, neboť v 5-10% případů Wilsonovy choroby normální ceruloplasmin a u 20% heterozygotů, dětí do 6 měsíců, u dekomp. cirhózy a zvýšených proteinových ztrát je ceruloplasmin snížený

Membránový transportér pro měď ATP7B



Molekulární patogeneze Wilsonovy choroby



Molekulární diagnostika

- V genu *ATP7B* popsáno přes 500 mutací
<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp>
- Přímá diagnostika: screening prevalentních mutací - v naší populaci p.His1069Gln, c.3402delC, p.Trp449X, p.Arg778Gly, c.1340_1343del (*Vrábelová S, et al. Mol Genet Metab 2005;86:277-85*) a cílené sekvenování DNA
- Nepřímá diagnostika pomocí genových markerů - historie
- Vyšetření rodiny !!!

HFE HEMOCHROMATÓZA

- Autosomálně recesivně dědičná
- Frekvence heterozygotů v Evropské populaci 5-10%
- Prevalence zvýšené saturace transferinu asi 1:400
- Manifestní chorobu rozvine 1% homozygotů (prevalence 1:30 000)
- Masivní depozice Fe v játrech, pankreatu, myokardu, hypofýze aj.
- Obsah Fe v játrech a pankreatu je zvýšen 50-100x, v myokardu 5-25x

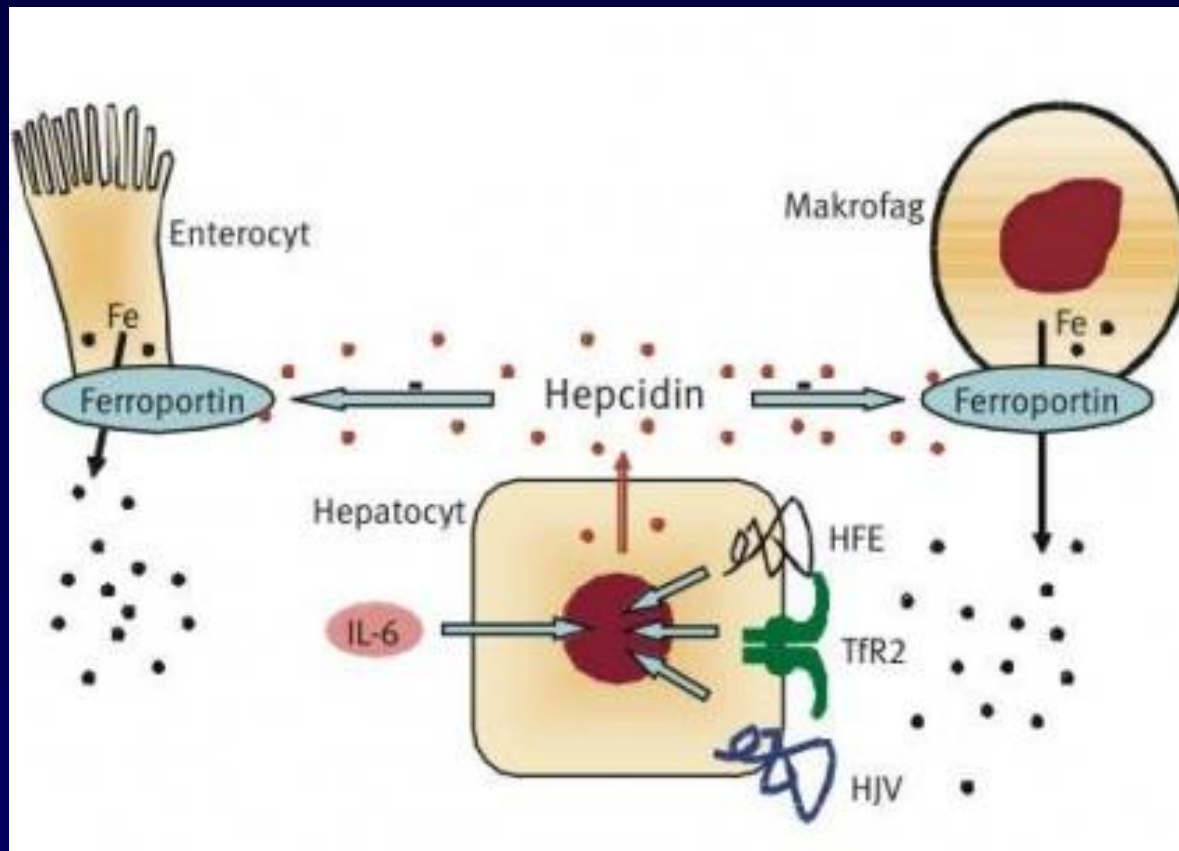
Choroba je důsledkem toxického působení nahromaděného Fe, příčinou poškození tkání je:

- 1) disrupce železem přeplněných lysosomů
- 2) peroxidace lipidů membrán buněčných organel
- 3) stimulace syntézy kolagenu

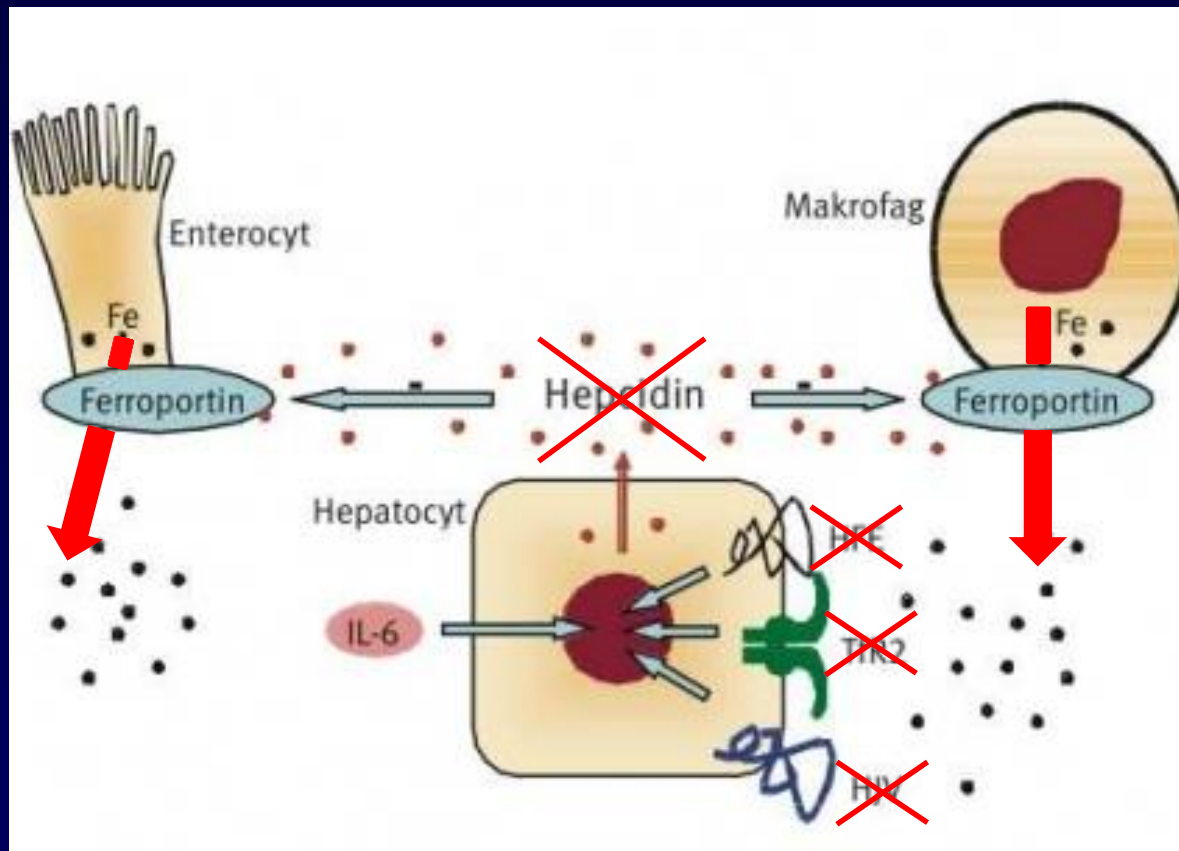
Laboratorní hodnoty metabolismu železa

Vyšetření	normální hodnota	hemochromatóza
S-Fe	6 – 26 $\mu\text{mol/l}$	32 – 54 $\mu\text{mol/l}$
TIBC	45 – 66 $\mu\text{mol/l}$	36 – 54 $\mu\text{mol/l}$
Saturace transferinu	22 – 45 %	50 – 100 %
S-ferritin	muži 40 – 450 ng/ml ženy 7 – 70(150) ng/ml	400 – 6000 ng/ml 250 – 6000 ng/ml
Desferroxaminový test	< 2 mg/24h	9 – 23 mg/24h
Železo v játrech	300 – 1400 $\mu\text{g/g}$ suš.	6000 – 18000 $\mu\text{g/g}$ sušiny

Regulace vstřebávání železa



HFE a non-HFE hemochromatóza



Typ 2B

Typ 1

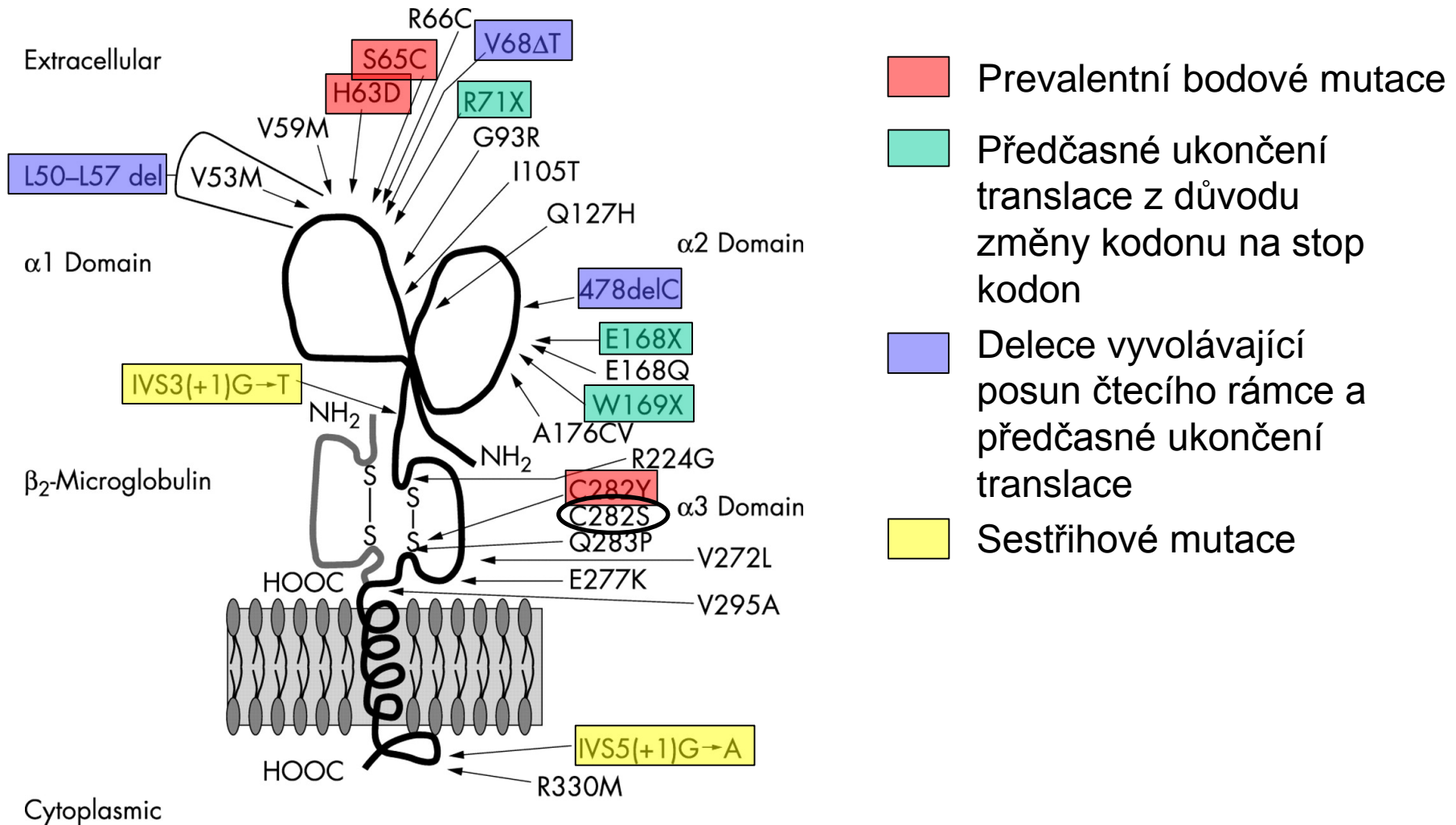
Typ 3

Typ 2A

Molekulární diagnostika

- Indikace: saturace transferinu >50% a ferritin >1000 ng/ml
- Přímá diagnostika: prevalentní mutace vedoucí k záměnám p.Cys282Tyr a p.His63Asp popř. p.Ser65Cys v proteinu HFE
- **Diagnostický význam:** homozygoti pro p.Cys282Tyr nebo složení heterozygoti pro p.Cys282Tyr a p.His63Asp
- V cca 5% unikátní mutace
- Vyšetření rodiny !!!

Zjevně patogenní mutace v HFE



Non-HFE hemochromatóza

- Juvenilní hemochromatóza z deficitu hemojuvelinu (gen *HJV*, typ 2A)
- Juvenilní hemochromatóza z deficitu hepcidinu (gen *HAMP*, typ 2B)
- Mutace v genu *TfR2* (typ 3)
- Ferroportinová nemoc z deficitu ferroportinu (gen *SLC40A1*, typ 4)
- Digenní formy

DEFICIT alfa₁-ANTITRYPSINU

- Autosomálně recesivně dědičný deficit serinové proteázy A₁AT (dříve Pi – protease inhibitor), gen *SERPINA1*
- A₁AT inhibuje elastázu neutrofilů a dalších sérových proteáz
- Prevalence deficitu A₁AT 1:5000
- Klinické formy: plicní a jaterní
- Laboratorně: pokles hladiny A₁AT pod 0,4 g/l u homozygotů
- IEF+IF: normální alela M (var. M1A, M1V, M2, M3 a M4), nejčastější patologické alely PiS (p.Glu264Val) a PiZ (p.Glu342Lys)
- **Jaterní chorobu vyvolává depozice variant Z a M (Malton) (p.Phe52del) A₁AT v hepatocytech ve formě PAS+ granul**
- Diagnostika: IEF + IF, molekulárně genetické vyšetření

INTRAHEPATÁLNÍ CHOLESTÁZA

Hepatocelulární: Poruchy sekrece žlučových lipidů
Poruchy biosyntézy žlučových kyselin
Polékové cholestázy

Duktulární: Malformace duktální ploténky
Primární záněty (PBC, PSC)
Vrozené poruchy cholangiocyტů
(FHCA, ILVASC)

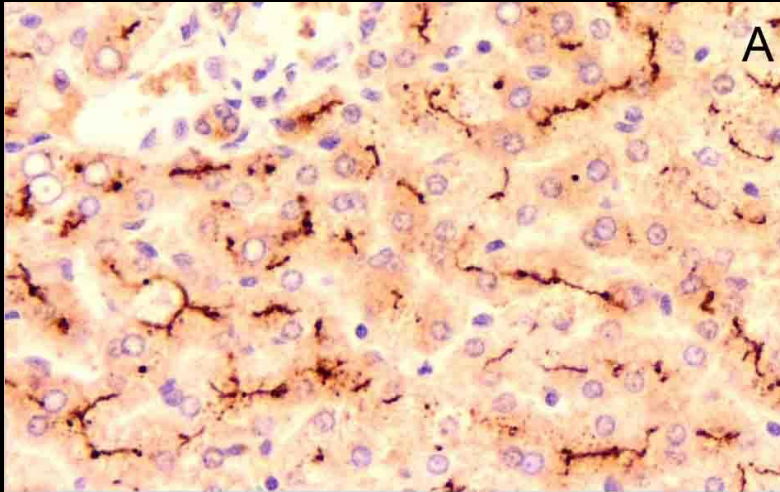
Familiární cholestázy s nízkou aktivitou GGT

gen/protein	choroba vyvolaná jeho defektem
<i>ATP8B1</i> / <i>FIC1</i>	PFIC1 = progresivní familiární intrahepatální cholestáza 1. typu, dříve Bylerova choroba Grónská familiární cholestáza BRIC1 = benigní rekurentní intrahepatální cholestáza
<i>ABCB1</i> / <i>BSEP</i>	PFIC2 a BRIC2
<i>TJP2</i> /Tight junction protein 2	PFIC4 – jen nonsense mutace!
Enzymy dráhy syntézy žlučových kyselin	Obrovskobuněčná neonatální hepatitida
<i>BAAT</i> /Bile acid CoA amino acid acyltransferase	FHCA = Familiální hypercholanémie
<i>VPS33B</i> /Yeast homologue of Vacuolar Protein Sorting 33B	ARC = Arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis

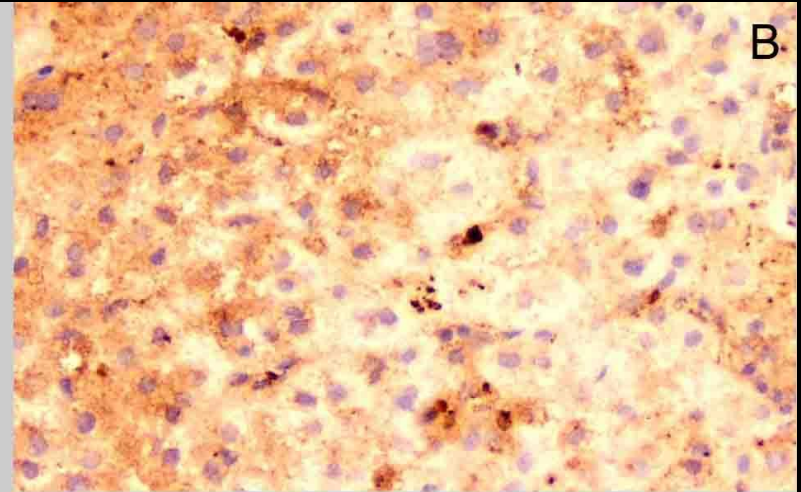
Klinická a laboratorní charakteristika PFIC s nízkou aktivitou GGT (typ 1 a 2)

- Permanentní intrahepatální cholestáza
 - Manifestace v prvních letech života
 - Intenzivní pruritus
 - Malabsorpce tuků a v tukách rozpustných vitaminů → neprospívání, chronické průjmy, epistaxe, koagulopatie
 - Žlučové kameny, cholecystitis, pancreatitis, poruchy sluchu (typ 1)
- Elevace sérových žluč. kyselin, konjugovaná hyperbilirubinémie, elevace aktivity aminotransferas
 - Normální sérová aktivita GGT a koncentrace cholesterolu
 - Normální nález na žlučových cestách

BSEP kontrola



BSEP pacient

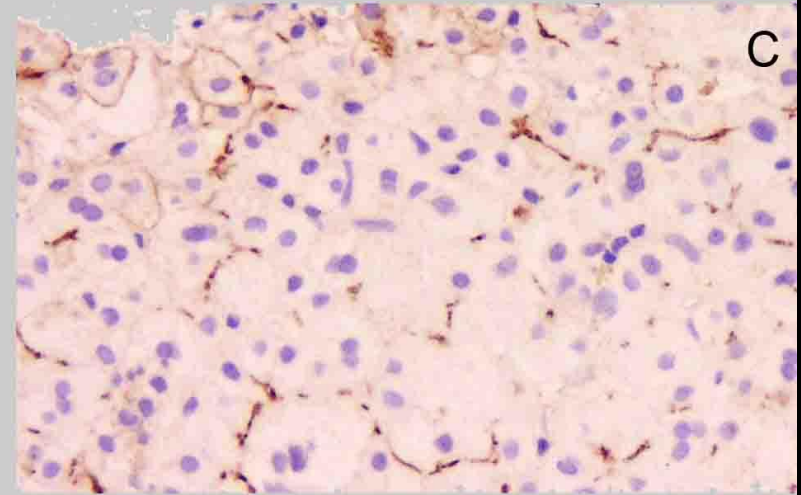


© Alex S. Knisely, King's College, London

Mutace v ABCB11:

c.937C>A (p.Arg313Ser)

c.1445A>G (p.Asp482Gly)



MRP2 pacient

Mutace v *ABCB11* v rodinách s PFIC2

Proband	Země původu	Mutace 1	Mutace 2
65	ČR	c.937C>A (p.Arg313Ser)	c.1445A>G (p.Asp482Gly)
68	ČR	c.851T>C (p.Val284Ala)	c.1468A>G (p.Asn490Asp)
194	Ukrajina	c.1445A>G (p.Asp482Gly)	c.3458G>T (p.Arg1153Leu)
199	Thajsko	c.90_93delGAAA (p.Lys30AsnfsX31)	c.249_250insT (p.Gly84TrpfsX9)
209	ČR	c.1445A>G (p.Asp482Gly)	c.1757C>T (p.Thr586Ile)
215	Řecko	c.1409G>A (p.Arg470Gln)	c.1677_1679delinsAAA (p.Met559_Ser560delinsIleAsn)
231	Nový Zéland	g.13171G>A	c.2343+1G>T
239	Řecko	c.1381A>G (p.Lys461Glu)	c.3148C>T (p.Arg1050Cys)
253	Austrálie	c.179G>A (p.Trp60X)	c.179G>A (p.Trp60X)
261	Řecko	c.673A>C (p.Thr225Pro)	c.677C>T (p.Ser226Leu)
273	ČR	c.731delT (p.Ile245LeufsX17)	c.1445A>G (p.Asp482Gly)
488	ČR	c.1202C>G (p.Pro401Arg)	c.3457C>T (p.Arg1153Cys)

Benigní rekurentní intrahepatální cholestáza (BRIC, syndrom Summerskill-Walsheův)

- Epizodická familiární intrahepatální cholestáza
- Manifestace před koncem 2. dekády
- Trvání ataky týdny až mnoho měsíců
- 2 - 30 atak za život
- Elevace sérových žlučových kyselin, bilirubinu a ALP
- Normální sérová aktivita GGT a koncentrace cholesterolu
- Dobrá prognóza, progresse do end stage liver disease vzácná

Mutace nalezené v rodinách s BRIC

Proband	Země původu	ATP8B1		ABCB11		BRIC typ
		Mutace 1	Mutace 2	Mutace 1	Mutace 2	
2	ČR	c.1982T>C (p.Ile661Thr)	c.3122del5/ins20	gen nevyšetřen		1
24	ČR	-	-	c.403G>A (p.Glu135Lys)	c.1757C>T (p. Thr586Ile)	2
53	ČR	-	-	c.2316T>A (p.Tyr772X)	c.3589CT>GG (p.Leu1197Gly)	2
101	ČR	-	-	c.667C>T (p.Arg223Cys)	-	2?
109	Polsko	gen nevyšetřen		c.23G>C (p.Arg8Pro)	IVS24 -3C>G	2
110	Polsko	c.208G>A (p.Asp70Asn)	-	-	-	1?
111	Polsko	c.134A>C (p.Asn45Thr)	c.1805G>A (p.Arg602Gln)	gen nevyšetřen		1
112	Polsko	c.134A>C (p.Asn45Thr)	-	c.851T>C (p.Val284Ala)	c.1445A>G (p.Asp482Gly)	1+2?
119	ČR	c.1982C>T (p.Ile661Thr)	c.1982C>T (p.Ile661Thr)	-	-	1
429	ČR	-	-	c.2629G>A (p.Gly877Arg)	c.2495G>A (p.Arg832His)	2

Familiární cholestáza s vysokou aktivitou GGT

gen/protein	choroba vyvolaná jeho defektem
<i>ABCB4</i> / <i>MDR3</i>	PFIC3 Cholestatická cirhóza dospělých Intrahepatální pozdně těhotenská cholestáza (ICP) Familiární cholesterolová cholelitiáza (syndrom LPAC) Familiární poléková cholestáza (CIC)
<i>TJP2</i> / <i>TJP2</i>	FHCA = Familiární hypercholanémie
<i>CLDN1</i> / <i>Claudin 1</i>	ILVASC: Ichthyosa - leukocytární vakuolizace - sklerozující cholangitida

Klinické & laboratorní známky PFIC3

- Permanentní intrahepatální cholestáza
- Manifestace do konce 2. dekády
- Žloutenka a intenzivní svědění
- Hepatomegalie, splenomegalie, portální hypertenze
- Elevace sérových žlučových kyselin, převážně konjugovaná hyperbilirubinémie, zvýšená aktivita aminotransferas
- Elevace sérové aktivity GGT, normální konc. cholesterolu, chybí LpX
- Intaktní žlučové cesty x častá cholelitiáza

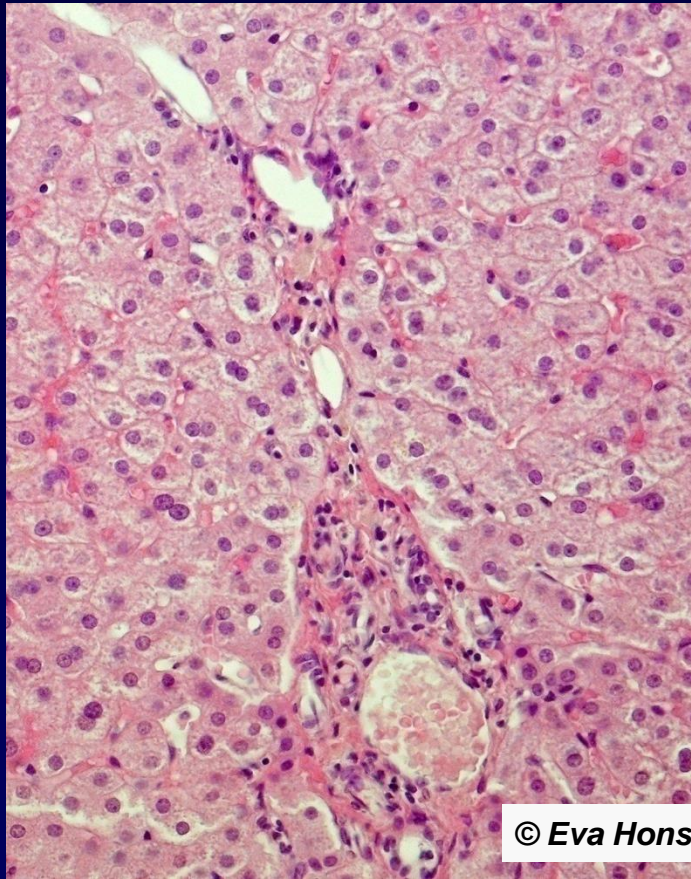
Klinické & laboratorní známky

Low Phospholipid Associated Cholelithiasis

**Anamnéza symptomatické cholelitiázy
+ alespoň 1 z následujících malých kritérií:**

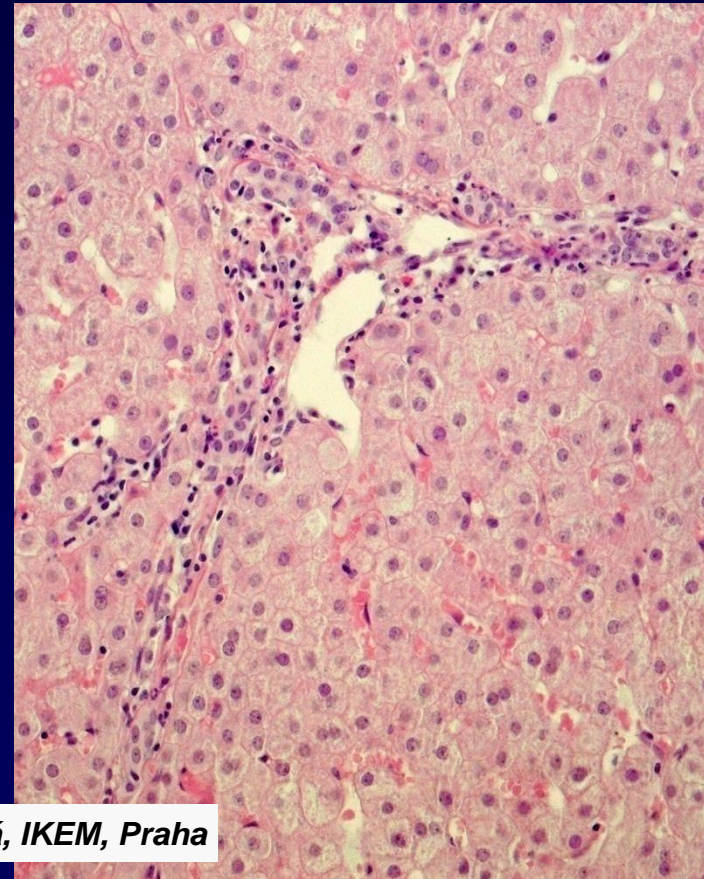
- Věk do 40 let při začátku symptomů
- Rekurence po cholecystektomii
- Intrahepatální hyperechogenní ložiska s topografií odpovídající lipidním depositům v nitrojáterních žlučových cestách
- Intrahepatální sludge
- Mikrolitiáza
- Rodinná anamnéza cholelitiázy u příbuzných 1. stupně
- Anamnéza intrahepatální cholestázy těhotných

Histologie jater u Low Phospholipid Associated Cholelithiasis



© Eva Honsová, IKEM, Praha

22 let, c.1371delG (p.Gly457GlyfsX8)



19 let, c.3608C>G (p.Ser1203X)

Ženy s pozitivním nálezem v *ABCB4/MDR3*

Věk (let)	CHE (let)	ICP (let)	(peri)portál. fibróza (let)	Mutace 1	Mutace 2	CIC (let)
28	20	np	19	c.3608C>G (p.Ser1203X)	-	18 Minisiston 22 Mercilon
30	17	np	21	c.1501G>T (p.Glu501X)	-	18 Tri-regol
35	22	30	22	c.1371delG (p.G457GfsX8)	c.523A>G (p.Thr175Ala)	20-22 Cilest
41	28	np	normální histologie	c.523A>G (p.Thr175Ala)	-	28 Tri-regol 39-41 Lunafem
35	20	23, 32	20	c.523A>G (p.Thr175Ala)	-	19 ? 24-31 Marvelon 32-35 Mirena