

**UNIVERSITETI I MJEKËSISË TIRANË
FAKULTETI I MJEKËSISË
DEPARTAMENTI I LABORATORËVE**

**IDENTIFIKIMI I TË SËMURËVE ME
HEMOKROMATOZË NË POPULLATËN SHQIPTARE
NËPËRMJET ANALIZËS SË GJENIT HFE DHE
PËRDORIMI I ANALIZAVE BIOKIMIKE TË
MBINGARKESËS SË HEKURIT PËR DIAGNOSTIKIMIN E
HERSHËM TË SËMUNDJES**

**DISERTANTI:
SUELA LELI(TOLE):**

**UDHËHEQËS SHKENCOR:
PROF.DR GJERGJI MINGA**

TIRANË 2023

**UNIVERSITETI I MJEKËSISË TIRANË
FAKULTETI I MJEKËSISË
DEPARTAMENTI I LABORATORËVE**

**IDENTIFIKIMI I TË SËMURËVE ME HEMOKROMATOZË NË POPULLATËN
SHQIPTARE NËPËRMJET ANALIZËS SË GJENIT HFE DHE PËRDORIMI I
ANALIZAVE BIOKIMIKE TË MBINGARKESËS SË HEKURIT PËR
DIAGNOSTIKIMIN E HERSHËM TË SËMUNDJES**

**Disertacion
Për Marrjen e Gradës Shkencore**

DOKTOR

DISERTANTI: SUELA LELI(TOLE)

UDHËHEQËS SHKENCOR: PROF.DR GJERGJI MINGA

TIRANË 2023
REPUBLIKA E SHQIPËRISË
UNIVERSITETI I MJEKËSISË TIRANË
FAKULTETI I MJEKËSISË



UNIVERSITETI I MJEKËSISË, TIRANË

DISERTACION
I PARAQITUR NGA

Znj. Suela LELI

PËR MARRJEN E GRADËS SHKENCORE

DOKTOR

SPECIALITETI: LABORATOR KLINIK – BIOKIMIK

**TEMA: “IDENTIFIKIMI I TË SËMURËVE ME HEMOKROMATOZË NË
POPULLATËN SHQIPTARE NËPËRMJET ANALIZËS SË GJENIT HFE DHE
PËRDORIMI I ANALIZAVE BIOKIMIKE TË MBINGARKESËS SË HEKURIT
PËR DIAGNOSTIKIMIN E HERSHËM TË SËMUNDJES”**

MBROHET NË DATË: 18/12/2023. PARA JURISË:

- | | |
|----------------------------|------------------|
| 1. Prof. Anyla Bulo | KRYETAR |
| 2. Prof. Etleva Refatllari | ANËTAR (OPONENT) |
| 3. Prof. Ndok Marku | ANËTAR (OPONENT) |
| 4. Prof. Mihal Tase | ANËTAR |
| 5. Prof.As. Edite Sadiku | ANËTAR |

PERMBAJTJE

<i>Parathënie</i>	iii
Falenderime.....	x
I .HYRJJE.....	xii
1.0 Patologjia e hemokromatozës	xii
1.1 Rëndësia e hekurit në organizëm	xiii
1.2 Baza molekulare e mbingarkesës së Fe	xiv
1.3 Tipet e Hemokromatozës	xv
1.4 Tiparet klinike të hemokromatozës së trashëguar (HT).....	xvii
2.0 Hemokromatoza si sëmundje gjenetike autozomale reçesive.....	xix
2.1 Gjeni HFE	xx
2.2 Struktura e proteinës HFE.....	xxi
2.3 Trashëgimia gjenetike	xxiv
3.0 Analizat laboratorike biokimike për të evidentuar hemokromatozën.....	xxvi
3.1 Ferritina e Serumit (SF)	xxvi
3.2 Transferrina e Saturuar (TS)	xxvi
3.3 Testi i enzimave të mëlçisë	xxvii
3.4 Biopsia e heparit	xxvii
3.5 Imazhi radiologjik i heparit.....	xxvii
4.0 Analizat gjenetike për mutacionet C282Y dhe H63D të gjenit HFE.....	xxvii
4.1 Testi diagnostik gjenetik	xxvii
4.2 Analizat gjenetike për mutacionet C282Y dhe H63D të gjenit HFE.....	xxviii
5.0 Gjeografia e mutacioneve C282Y dhe H63D	xxx

5.1 Prevalenca e mutacioneve C282Y, H63D dhe S65C në Europë	xxx
II METODOLOGJIA	
2.1 Qëllimi	xxxiv
2.2 Objektivat.....	xxxiv
2.3 Materiali dhe Metodot.....	xxxv
2.4 Metodot për përcaktimin e parametrave biokimikë	
2.5 Metodot e analizimit gjenetik.....	xxxvii
2.6 Metodologjia e analizës statistikore.....	lvii
III REZULTATE	lviii
IV DISKUTIM.....	lxxvii
V PERFUNDIME	lxxxii
VI REKOMANDIME.....	lxxxiv
VII BIBLIOGRAFIA.....	

Lista e tabelave

Tabela 1. 1 Simptomat e Sëmundjes.....	xii
Tabela 1. 2 Tipet e Hemokromatozës	xv
Tabela 1. 3 Gjendja e hekurit në pacientë me hemokromatozë dhe në pacientë normalë	xvii
Tabela 1. 4 Tabela e kodit gjenetik standart	xix
Tabela 1. 5 Frekuencat e mutacioneve të gjenit HFE në vendet kryesore të Europës ...	xxix
Tabela 2. 1 Pamje skematike e strukturës së studimit	xxxiv
Tabela 2. 2 Tabela e identifikimit të individëve mbartës të mutacionit të gjenit HFE	xli
Tabela 3. 1 Karakteristikat demografike të pacientëve.....	lviii
Tabela 3. 2 Vlerat mesatare të ferritinës, sideremisë dhe transferrinës së saturuar	lx
Tabela 3. 3 Vlerat mesatare të ferritinës, sideremisë dhe transferrinës së saturuar sipas grupmoshës	lxii
Tabela 3. 4 Frekuenca e gjenotipeve tek personat e shëndetshëm (n=50).....	lxiv
Tabela 3. 5 Gjenotipet HFE dhe indekset mesatare të hekurit në serum për popullatën e studiuar (N=70).....	lxxii
Tabela 3. 6 Frekuenca e rritjes së indekseve të hekurit tek heterozigotët.....	lxxv
Tabela 4.1 Frekuencat e mutacioneve të gjenit HFE në vendet kryesore të Europës përfshirë dhe studimi ynë	lxvii

Lista e figurave

Figura 1. 1 Hemokromatoza e trashëguar	x
Figura 1. 2 Gjenet e përfshira në tipet e HT	xiv
Figura 1. 3 Sasia e hekurit dhe lidhja me shenjat klinike	xvi
Figura 1. 4 Pozicioni i gjenit HFE në kromozomin 6	xviii
Figura 1. 5 Struktura e dy molekulave të proteinës HFE.....	xx
Figura 1. 6 Paraqitja skematike e shfaqjes së mutacionit C282Y.....	xx
Figura 1. 7 Paraqitja skematike e trashëgimisë autozomike reçesive të HT.....	xxii
Figura 2. 1 Aparati Cobas 6000	xxxiv
Figura 2. 2 Aparati MiniVidas	xxxiv
Figura 2. 3 Paraqitja skematike e Metodës ELFA	xxxiv
Figura 2. 4 Mikrocentrifuga Eppendorf	xxxiv
Figura 2. 5 Aparati PCR Termocikler ABI 9700.....	xxxviii
Figura 2. 6 Kontrolli i amplifikimit në xhel agarози 2% i produkteve të PCR.....	xxxix
Figura 2. 7 Pajisja e Elektroforezës në xhel agarози.....	xlii
Figura 2. 8 Aparati Thermo - Shaker PST-60HL	xxxiv
Figura 2. 9 Metodat e përdorura për identifikimin e mutacioneve të gjenit HFE.....	xlix
Figura 3. 1 Shpërndarja e rasteve sipas gjinisë	lviii
Figura 3. 2 Histogrami i moshës së pacientëve.....	lix
Figura 3. 3 Shpërndarja e rasteve sipas grupmoshës	lix
Figura 3. 4 Krahasimi i vlerave mesatare të ferritinës sipas gjinisë	lx
Figura 3. 5 Krahasimi i vlerave mesatare të sideremisë sipas gjinisë.....	lxi
Figura 3. 6 Krahasimi i vlerave mesatare të transferrinës së saturuar sipas gjinisë.....	lxi
Figura 3. 7 Korrelacioni i ferritinës me sidereminë	lxii
Figura 3. 8 Krahasimi i vlerave mesatare të ferritinës sipas grupmoshës.....	lxiii
Figura 3. 9 Krahasimi i vlerave mesatare të sideremisë sipas grupmoshës	lxiii
Figura 3. 10 Krahasimi i vlerave mesatare të transferrinës së saturuar sipas grupmoshës lxiv	
Figura 3. 11 Frekuenca e gjenotipeve tek personat e shëndetshëm	lxv
Figura 3. 12 Frekuenca e gjenotipeve tek 10 pacientët me mbingarkesë të hekurit dhe ferritinës	lxxi
Figura 3. 13 Kartela klinike e pacientit.....	lxxiii
Figura 3. 14 Stripi i hibridizuar dhe i koloruar i pacientit	
Figura 3. 15 Mutacionet në grupin e 50 pacientëve	
Figura 3. 16 Frekuenca e gjenotipeve tek 10 pacientët e grupit të parë	
Figura 3.17 Frekuenca e gjenotipeve tek 10 pacientët e grupit të dytë me mbingarkesë të hekurit, ferritinës dhe transferrinës së saturuar.....	lxxiii
Figura 3. 18 Foto e 10 pacientëve të analizuar	lxxiii
Figura 3. 19 Gjenotipet HFE për popullatën e studiuar (n=70)	lxxiii
Figura 3. 20 Përqëndrimi i hekurit në serum ($\mu\text{mol/L}$).....	lxxiv

Figura 3. 21 Transferrina e saturuar (%) në serum	lxxiv
Figura 3. 22 Përqëndrimi i ferritinës në serum (ng/ml)	lxxv
Figura 3. 23 Frekuenca e rritjes së transferrinës tek heterozigotët	lxxvi
Figura 3. 24 Rritja e përqëndrimit të ferritinës në serum.....	lxxvi
Figura 4. 1 Strategjia Diagnostikuese	lxiv

Abstrakt

Qëllimi i këtij studimi është identifikimi i të sëmurëve dhe bartësve me hemokromatozë në popullatën shqiptare, nëpërmjet analizës së gjenit HFE dhe përdorimi i analizave biokimike të mbingarkesës së hekurit për diagnostikimin e hershëm të sëmundjes.

Materialet dhe metodat:

Në studim u morën 140 individë: 50 individë të shëndetshëm dhe 90 (77 meshkuj dhe 13 femra) pacientë me sëmundje të heparit (cirrozë, steatozë) të hospitalizuar në klinikën e Gastrohepatologjisë në QSUT. Individët e shëndetshëm u analizuan për gjenotipet e gjenit HFE. Pacientët janë analizuar për parametrat e mbingarkesës së hekurit, ferritin dhe transferrinën e saturuar duke përdorur 5ml gjak venoz nga çdo pacient. 80 nga pacientët janë analizuar dhe për analizën molekulare të gjenit HFE duke përdorur 5ml gjak të marrë me tub K3 EDTA.

Metodat:

Analizat biokimike. Nga serumi i gjakut është analizuar hekuri duke përdorur metodën kolorimetrike me chromazurol B dhe analizatorin Minitcno. Ferritina është analizuar duke përdorur VidasFerritin kit, test automatik kuantitativ që përdor metodën ELFA. Transferrina është analizuar me metodën imunoturbidimetrike, aparatit Cobas 6000. TS është llogaritur me formulë. Analizat gjenetike janë analizuar me PCR-RFLP dhe Strip Assay. Ekstraktimi i ADN me QIAGEN dhe INVITROGEN DNA kit.

Rezultatet: Në 50 individët e shëndetshëm frekuenca e mutacioneve C282Y është 3% dhe frekuenca e H63D është 10%. Këto vlera janë të krahasueshme me mesataren e Europës. Në grupin e pacientëve u gjetën 38 (47,5%) me mutacione dhe 42 pa mutacione. Nga këto 18 janë C282Y heterozigotë (25,7%), 5 H63D heterozigotë (7,1%), 2 S65C heterozigotë (2,2%) dhe 13 (18,6%) përbërje heterozigote. Të tre grupet e gjenotipeve me mutacion kishin përqëndrime mesatare më të larta të Fe dhe TS në serum sesa 42 subjektet pa mutacione. Shumica e subjekteve kishin një ngopje fillestare të TS më të madhe se 55%. Nuk u gjetën gjenotipë homozigotë C282Y/C282Y që shkaktojnë sëmundjen. Kjo ka lidhje me stilin e jetesës.

Fjalët kyç: HFE, hemokromatoza, ferritin, Fe, transferrin e saturuar, C282Y, H63D, S65C.

Abstract

The purpose of this study is to identify patients and carriers with hemochromatosis in the Albanian population, through the analysis of the HFE gene and the use of biochemical analyzes of iron overload for the early diagnosis of the disease.

Materials and methods:

The study included 140 individuals: 50 healthy individuals and 90 (77 males and 13 females) patients with liver disease (cirrhosis, steatosis) hospitalized in the Gastrohepatology clinic at QSUT. Healthy individuals were analyzed for HFE gene genotypes. Patients were analyzed for parameters of iron overload, ferritin and saturated transferrin using 5ml of venous blood from each patient. 80 of the patients were also analyzed for the molecular analysis of the HFE gene using 5 ml blood with K3 EDTA.

Methods: Biochemical analyses. Iron was analyzed from the blood serum using the colorimetric method with chromazurol B and the Minitcno analyzer. Ferritin was analyzed using the VidasFerritin kit, an automatic quantitative test that uses the ELFA method. Transferrin was analyzed with the immunoturbidimetric method and the Cobas 6000 equipment. TS was calculated with the formula. Genetic analyzes were analyzed with PCR-RFLP and Strip Assay. DNA extraction with QIAGEN and INVITROGEN DNA kit.

Results: In 50 healthy individuals the frequency of C282Y mutations is 3% and the frequency of H63D is 10%. These values are comparable to the European average. In the group of patients, 38 (47.5%) with mutations and 42 without mutations were found. Of these, 18 are C282Y heterozygous (25.7%), 5 H63D heterozygous (7.1%), 2 S65C heterozygous (2.2%) and 13 (18.6%) heterozygous compounds. All three groups of single-mutation genotypes had higher mean serum Fe and TS concentrations than the 42 subjects without mutations. Most subjects had an initial TR saturation greater than 55%. No disease-causing C282Y/C282Y homozygous genotypes were found. This has to do with lifestyle.

Keywords: HFE gene, Hemochromatosis, Ferritin, Iron, Transferrin saturation, C282Y, H63D, S65C

Parathënie

Hemokromatoza (HK) është një sëmundje e trashëguar autozomale, reçesive e metabolizmit të hekurit. Ajo shkaktohet si rezultat i grumbullimit në një masë të madhe të hekurit në organizëm, që shkakton dëmtime tek disa organe të rëndësishme si në mëlçi, pankreas dhe në zemër.

Hemokromatoza shkaktohet nga një ndryshim gjenetik që provokon një absorbim të tepruar të hekurit nga intestini me pasojë grumbullimin e hekurit në organe dhe inde të tjera, që prek një person në 300-350 individë në Evropë.^[1]

Sëmundja transmetohet gjenetikisht sipas rregullave të sëmundjeve autozomale reçesive, pra individi tregon simptomat e sëmundjes vetëm nëse ka një ndryshim në të dyja kopjet e gjenit.

Çdo popullatë ka një frekuencë të caktuar të mutacioneve C282Y dhe H63D si dhe të mbartësve të këtyre mutacioneve. Prandaj është e rëndësishme të njihen mutacionet dhe frekuenca e tyre në popullatën shqiptare në përgjithësi, si një parametër i domosdoshëm për çdo program parandalimi të kësaj sëmundje gjenetike.

Zbulimi i gjenit HFE në vitin 1996^[31] mundësoi përfshirjen e analizave molekulare në strategjinë diagnostikuese të hemokromatozës hereditare.^[2]

Megjithë mosshfaqjen e hershme të shenjave të sëmundjes, dhe pse tejngarkesa me hekur është e lidhur edhe me çrregullime të tjera, përcaktimi i parametrave biokimik të mbingarkesës së hekurit mund të shërbejnë si indikatorë të zbulimit të hershëm të sëmundjes. Analiza gjenetike e mutacioneve C282Y dhe H63D të gjenit HFE është përcaktuese në diagnostikimin e hemokromatozës.

Mutacioni i tretë më i rrallë i gjenit HFE është S65C. Ky mutacion është në përgjithësi benign. Genotipi i tij mund të sjellë një rritje të lehtë të rrezikut të sëmundjes, duke kontribuar në një fenotip të lehtë të hemokromatozës.^{[29],[37],[42]}

Aktualisht analiza gjenetike për HK nuk bëhet në vendin tonë, prandaj analiza e gjenit HFE për të përcaktuar mutacionet C282Y dhe H63D, dhe përdorimi i analizave biokimike të mbingarkesës së hekurit është një kërkesë e domosdoshme për diagnostikimin e hershëm të hemokromatozës, përpara se sëmundja të shkaktojë dëme të pariparueshme në organizëm.

Falenderime

Falenderimet e mia shkojnë në rradhë të parë për stafin e Laboratorit Klinik- Biokimik të “SUOGJ “Mbretëresha Geraldinë”, për mbështetjen dhe gadishmërinë e treguar. Mbetem shumë mirënjohëse profesorit të ndjerë dhe të paharruar Grigor Zoraqi, për bashkëpunimin e jashtëzakonshëm në kryerjen dhe realizimin e analizës molekulare pa të cilin do të ishte e pamundur realizimi i punimit.

Falenderime të veçanta për Prof. Adriana Babameto, për gadishmërinë dhe mbështetjen që më krijoi mundësinë e mbledhjes së kampioneve në Shërbimin e Gastrohepatologjisë në QSUT.

Falenderime të sinqerta udhëheqësit tim shkencor Prof. Gjergji Minga megjithë pamundësinë shëndetsore, për mbështetjen e vazhdueshme profesionale e njerëzore.

Shumë falenderuese dhe mirënjohëse pafund për Prof. Anyla Bulo, për këmbënguljen e motivimin që më dha për të përfunduar punimin. Një falenderim i veçantë për shoqen time Dr. Irena Korita që më ka këshilluar e mobilizuar për të çuar punën përpara.

Dhe mirënjohja më e madhe shkon për familjen time që gjithmonë më ka dhënë kurajo e mbështetje të pakursyer.

Shkurtesa

HFE	Gjeni i hemokromatozës
HK	Hemokromatoza
HT	Hemokromatoza e Trashëguar
Fe	Hekuri
FERR	Ferritin
SF	Ferritina e serumit
TRF ose Tf	Transferrina
TS	Transferrina e saturuar
C282Y	Mutacioni i gjenit HFE
H63D	Mutacioni i gjenit HFE
S65C	Mutacioni i gjenit HFE

I. HYRJE

1.0 Patologjia e hemokromatozës

Hemokromatoza (HK) është një sëmundje që shkaktohet si rezultat i grumbullimit në një masë të madhe të hekurit në organizëm, që shkakton dëmtime tek disa organe të rëndësishme si në mëlçi, pankreas dhe në zemër.

Hemokromatoza është një sëmundje që shoqërohet me një absorbim të tepruar të Fe në zorrë dhe me një depozitim të sasive të mëdha të Fe në mëlçi dhe pankreas.

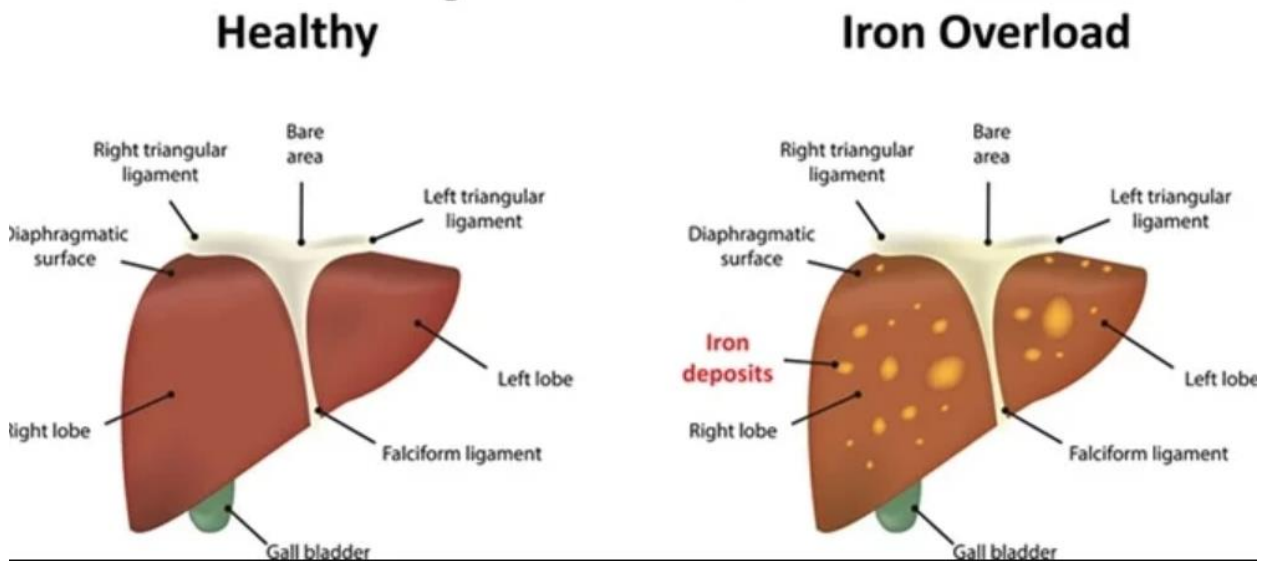


Figura 1.1 Pamja e heparit normal dhe me dëmtime nga mbingarkesa e Fe

Hemokromatoza e trashëgueshme (HT) është çrregullimi më i zakonshëm, ku përgjegjës është një gjen i vetëm në popullsinë e bardhë në përgjithësi. 1 në 250 deri 300 persona të popullsisë së bardhë janë homozigotë për mutacionin e gjenit të hemokromatozës, si dhe afërsisht 1 në 10 persona është mbartës për këtë mutacion. (Merryweather-Clarke AT, et al.1997)^{[1],[2]}; Hanson EH, Imperatore G, Burke W, A Huge Review August 2001).^[3] Deri tani, një numër studimesh në popullatë kanë treguar se gjenotipi homozigotë është më i zakonshmi i gjenit HFE, që është i lidhur me HK dhe që manifeston fenotipin me mbingarkesë të Fe.(Le Gac, G., Ferec, C. Eur J Hum Genet 13,1172-1185, 2005); (Papanikolaou G, et al. Nat Genet 2004); Jacolot S, et al. Blood 2004)^{[51],[52], [53]} Tre janë genotipet më frekvente të raportuara në Kaukazanët C282Y, H63D, S65C. Genotipi C282Y homozigotë manifeston fenotipin me mbingarkesë të Fe dhe subjektet do të shfaqin parametra anormale të Fe, ndërsa vetëm një pjesë e pacientëve manifestojnë shenjat klinike.(Pietrangelo A. Blood Cells Mol Dis 2004; 32: 131-138. Cazzola M. Haematologica 2003; 88: 721-724)^{[54],[55]}

1.1 Rëndësia e hekurit në organizëm

Fe është një nutrient thelbësor i kërkuar nga qeliza. **Fe** shërben si transportues për **O₂** dhe elektronet dhe si katalizues për proceset e oksigjenimit, hidroksilimit apo procese të tjera metabolike, për shkak të ciklit të tij reversibël midis gjendjeve (**Fe²⁺**) dhe (**Fe³⁺**). **Fe** jonik mund të marrë pjesë në një sërë reaksionesh për të prodhuar radikale të lira, të cilat në kthim dëmtojnë pjesët përbërëse të qelizës. (Pietrangelo A, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002).^[4]

Për pasojë nëse grumbullohet shumë Fe, tejkalohet kapaciteti i organizmit për një transport të sigurt dhe depozitim si dhe toksiciteti i Fe mund të dëmtojë organin e të shkaktojë dhe vdekje.

Përqëndrimi i Fe në organizëm është normalisht 40-50 mg Fe/kg për peshë të organizmit, ku gratë kanë nivele të ulëta të Fe ndërsa meshkujt kanë nivele më të larta.

Pjesa më e madhe e Fe kërkohe për aktivitetin metabolik, por rreth 5-6mg Fe/kg tek femrat dhe 10-12mg Fe/kg tek meshkujt është një depozitim në formë ferritine kryesisht në hepatocitet dhe makrofagët e mëlçisë, në palcën e kockave, në muskujt duke shërbyer si rezervë në momentet e humbjes së gjakut. Mbingarkesa e Fe shkaktohet nga kushte të cilat ndryshojnë kontrollin normal të përmbajtjes së Fe në sajë të rregullimit të përthithjes së Fe nga intestini. I derivuar nga një përthithje e rritur e Fe dietik ose nga transfuzioni i qelizave të kuqe të gjakut grumbullimi progresiv i Fe mbingarkon kapacitetin e organizmit për një depozitim të sigurt. (Siah SW, Trinder D, Olynyk JK. Clin Chim Acta 2005).^[5]

Pacientët mund të tregojnë shfaqje karakteristike të mbingarkesës së Fe si në sëmundjen e mëlçisë me zhvillimin e cirrozës, karcinomën hepatike, diabetin mellitus, (Ronald T. Acton et al. 2006)^[45] pamjaftueshmëri gonadale, çrregullime endokrine, rritje të pigmentimit të lëkurës si dhe induktimi i Fe tek kardiomiopatia mund të jetë letal. (Papanikolau G, Pantopoulos K. 2005).^[6]

Simptomat e sëmundjes

- Dhimbje e kyçeve
- Lodhje, mungesë energjie
- Dhimbje e abdomenit
- Sëmundje në zemër
- Dëmtime të gjendrës adrenale (Adams PC, Deugnier Y, Moirand R, Brissot P. Hepatology 1997).^[7]

Tabela 1. 1 Simptomat e sëmundjes sipas sistemeve të organeve

Neurologjike	Ataksia Depresion Humbje të memories Lodhje kronike Debulesë
Gastrointestinale	Dhimbje abdominale Cirrozë Karcinoma hepatoqelizore Hepatomegali
Muskuloskeletale	Artralgjia Artriti Kondrokalcinoza
Dermatologjike	Hiperpigmentim Rënie të flokëve
Endokrine	Diabet Gjinekomastia Hipogonadizëm Impotencë Atrofi testikulare
Kardivaskulare	Kardiomiopati Infarkt Insuficiencë renale

1.2 Baza molekulare e mbingarkesës së Fe

Njohuritë në lidhje me kompleksitetin e metabolizmit të Fe është rritur dukshëm në dy dekadat e fundit dhe klasifikimi i sëmundjes së mbingarkesës së Fe është bërë më i detajuar.

Numri i molekulave që luajnë rol në homeostazën e Fe është rritur dhe tashmë njihen ndërveprimet komplekse midis enterociteve, molekulave rregullatore të Fe dhe masave të Fe. Hecidina njihet si qendra rregulluese që vepron duke zvogëluar përthithjen e Fe duke u lidhur me ferroportinën dhe duke shkaktuar në këtë mënyrë degradimin e saj. Funkcioni i ferroportinës është të eksportojë Fe përmes membranës qelizore të enterociteve dhe makrofaqëve në hapësirën ndërqelizore, me qëllim të reduktojë masën e Fe. Rregullimi i hecidinës kontrollohet ndjeshëm në përgjigje me proceset fiziologjike dhe patologjike.

Shprehja e hepcidinës reduktohet kur kërkesa e Fe rritet, në kushtet e pamjaftueshmërisë së Fe. Një gjë e tillë prodhon një rritje të Fe të absorbuar përmes mukozës së duodenit si dhe një lirim të madh të Fe nga makrofagët, duke shkaktuar një eritropoezë të vazhdueshme. Konsumimi i alkoolit gjithashtu zvogëlon transkriptimin e hepcidinës dhe ky efekt duket se shfaqet përmes induktimit të stresit oksidativ. Ndërkohë që inflamacioni shkakton një rritje të transkriptimit të hepcidinës dhe redukton Fe, ndërsa një inflamacion i zgjatur mendohet se përbën shkakun e sëmundjes së anemisë kronike. Akumulimi i Fe në sëmundjen e hemokromatozës përbën një humbje të kontrollit të një feedback-u negativ me një dështim të rregullimit të shprehjes së hepcidinës krahas shprehjes së tepruar të Fe.

Gjeni HFE është shprehur në mënyrë dominante në qelizat e heparit , të cilat njihen si vendi i prodhimit të hepcidinës. Kështu psh në një studim të realizuar me minj është treguar se tek minjtë me HFE të shkatëruar ka treguar se një gjendje e tillë e gjenit HFE nuk ndryshon homeostazën e Fe. Ndërsa minjtë të cilët kishin mungesë të shprehjes normale të HFE zhvilluan fenotipin e hemokromatozës, duke demonstruar se hepari luan rolin e qendrës kontrolluese të Fe.

HFE ndërvepron me receptorët e transferrinës TfR1 dhe TfR2. Normalisht HFE konkuron me transferrinën për tu lidhur me TfR1 dhe një ndërprerje që mund të shkaktohet në lidhjen HFE-TfR1 shkakton rritje të nivelit të hepcidinës dhe pakësim të Fe. Ndërveprimi midis HFE dhe TfR2 ndryshon sepse në këtë rast HFE nuk konkuron me transferrinën dhe karakterizohet nga rritje e TfR2 në mëlçi.

Kompleksi HFE-TfR2 ndërvepron me proteinën hemojuvenile dhe proteinën morfogenetike të kockës (BMP) duke u lidhur me receptorët e qelizave të mëlçisë, duke aktivizuar shprehjen e hepcidinës nëpërmjet rrugës SMAD.

Mutacionet në gjenet që kodojnë për HFE, TfR2, hemojuvenil dhe hepcidinën lidhen me uljen e aktivitetit të hepcidinës dhe me rritjen e përthithjes së Fe duke rezultuar me sindromën e hemokromatozës. (Parkkila S, Niemela O, Britton R, Fleming R, Waheed A, Bacon B. et al, 1997).^[8]

1.3 Tipet e Hemokromatozës

Hemokromatoza prezantohet në dy forma:

Hemokromatoza primare (e trashëguar)

Hemokromatoza sekondare (jo e trashëguar).

(Solis Herruso JA, Munos P. 2005).^[9]

Hemokromatozat e trashëgueshme, janë të ndara në varësi të gjeneve të përfshirë, dhe gjeni HFE është i përfshirë në hemokromatozën primare.

a) **Hemokromatoza primare:**

Gjeni HFE është gjeni që kodon për proteinën që transporton Fe. Mutacionet e këtij gjeni janë të pranishme në 25% të pacientëve me hemokromatozë.

b) **Hemokromatoza juvenile e tipit 2A:** përgjegjës është **gjeni HJV** që kodon për hemojuvelinën, e cila është një proteinë modulatore e prodhimit të hormonit hepcidinë.

c) **Hemokromatoza juvenile e tipit 2B:**

përgjegjës është **gjeni HAMP** që kodon për proteinën e hepcidinës (hepcidina është një hormon hepatic që vepron në nivelin e enterociteve të mëlçisë dhe makrofagëve, të cilët rregullojnë çlirimin e Fe në gjak. Një rritje e Fe në gjak stimulon sekretimin e hepcidinës, i cili inhibon transportin e hekurit nga enterociti në hepar apo në sistemin retikulo – endotelial në gjak. (Verga Falzacappa MV, Muckenthaler MU. Gene 2005).^[10]

d) **Hemokromatoza e tipit 3:**

përgjegjës është **gjeni Tfr2** që kodon për receptorin 2 të transferinës. Tfr2 është një glikoproteinë transmembranore që ka pjesën jashtëqelizore, e cila bashkohet me transferrinën, e cila nga ana e saj transporton Fe. Kjo është hyrja fillestare e Fe në qeliza e lokalizohet kryesisht në hepar ose në qelizat e duodenit.

e) **Hemokromatoza e tipit 4:**

përgjegjës është **gjeni SLC40A1** që kodon për ferroportinën, transportuese e hekurit. (Hanson EH, Imperatore G, Burke W. Am J Epidemiol 2001).^[11]

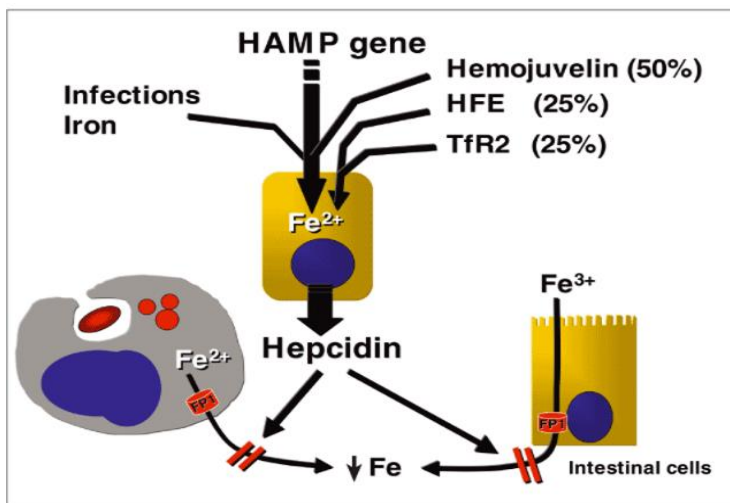


Figura 1.2 Gjenet e përfshira në tipet e HT

Gjenet e përfshirë në tipet e hemokromatozës së trashëguar dhe ndërveprimet e tyre janë të paraqitura në figurën 1. 2.

Në tabelën e mëposhtme janë paraqitur përmbledhtazi tipet e ndryshme të hemokromatozës, ndër të cilat tipi 1, paraqet formën klasike të sëmundjes, ku përgjegjës është gjeni HFE. (Hanson EH, Imperatore G, Burke W, Am J Epidemiol, 2001)^[12]

Tabela 1. 2. Tipet e hemokromatozës

	Tipi 1	Tipi 2A	Tipi 2B	Tipi 3	Tipi 4
Emri	HT klasike	HT juvenile	HT juvenile	HT e lidhur me TfR2	Mbingarkesa e Fe lidhur me ferroportinën
Gjeni	HFE	HJV	HAMP	TfR2	SLC40A1
Proteina e prodhuar	HFE	Hemojuvelin	Hepcidinë	Receptori 2 i transferinës	Ferroportina (proteinë rregullatore e Fe)
Trashëgimia	autosomike reçesive	autosomike reçesive	autosomike reçesive	autosomike reçesive	autosomike dominante
Funksioni	ndërprerja e lidhjes transferinë-Fe, modifikimi i mundshëm i rregullimit të hepcidinës	e panjohur; modifikimi i mundshëm i hepcidinës	rregullimi i lirit të Fe në qelizat intestinale dhe në qelizat e gjakut	ndërrhyrje e mundshme në marrjen e Fe nga qelizat e heparit	ndërrhyrje e mundshme në eksportin e Fe nga zorret, hepari dhe qelizat e placentës
Demtimi i organit	variabël	i lartë	i lartë	variabël	i ulët

1.4 Tiparet klinike të hemokromatozës së trashëguar (HT)

Personat me hemokromatozë të trashëguar absorbojnë sasi të pakta mg Fe në ditë për nevojat metabolike. Shenjat klinike shfaqen mbas moshës 40 vjeç, kur depozitimet e Fe në organizëm kanë arritur sasinë 15 deri 40 gr, ndërsa normalisht sasia e Fe është rreth 4 gr.

Lidhja midis sasive të Fe në organizëm dhe tipareve klinike tregohen në figurën 1. 3.

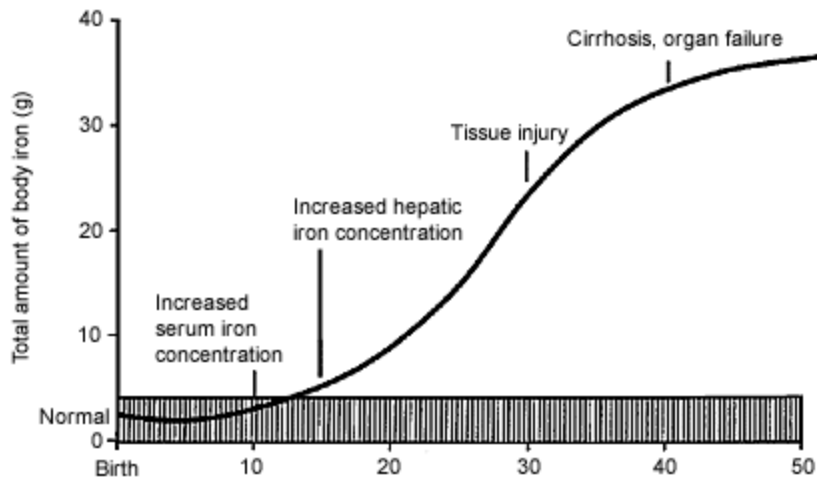


Figura 1. 3. Sasia e hekurit dhe lidhja me shenjat klinike

Shfaqja e sëmundjes mund të ndodh më shpejt në disa persona se në disa të tjerë. Shenjat klinike influencohen nga mosha, seksi, Fe dietik, alkooli, humbja e gjakut gjatë menstruacioneve dhe gjatë shtatzanisë. Edhe pse femrat janë homozigotë për mutacionin e hemokromatozës aq shpesh sa dhe meshkujt, ato e shfaqin sëmundjen më pak. Kuadri klinik tek gratë para menopauzës është 10 herë më pak frekuent.(Rochete J et al. 1999).^[13] Faktorë të tillë si abuzimi me alkoolin dhe hepatiti C mund të përshpejtojnë shfaqjen e sëmundjes.

Diagnoza e hemokromatozës bazohet në kombinimin e kriterëve klinike, laboratorike dhe patologjike duke përfshirë një rritje me tepri të transferrinës së saturuar si dhe një rritje të përqëndrimit të ferritinës në serum. Gjendja e tepruar e transferrinës(TS) të serumit llogaritet si më poshtë:

$$100 X (\text{përqëndrimi i Fe} / \text{kapacitetin total të lidhjes me Fe})$$

Gjendja e Fe në pacientë me hemokromatozë të trashëguar dhe në pacientë normalë është paraqitur në tabelën 1. 3.

Tabela 1. 3. Gjendja e Fe në pacientë me HT dhe në pacientë normale

Fe	Hemokromatoza	Gjendja normale
Përqëndrimi i Fe	151 - 250 mg / dL (27 - 45 μ mol / L)	Meshkuj : 50-150 mg / dL (9 - 27 μ mol / L)femrat: 35-145 mg / dL (6 -26 μ mol /L)
Kapaciteti total i lidhjes së Fe	200 - 300 mcg / dL (36 - 54 μ mol / L)	250 to 400 mcg / dL (45 - 72 μ mol / L)
Saturimi i transferrinës	51% - 100%	14% - 50%
Përqëndrimi i serumit të ferritinës		
Meshkuj	300 - 6,000 ng / mL (300 to 6,000 mcg / L)	20 to 300 ng / mL (20 - 300 mcg / L)
Femra	200 - 6,000 ng / mL (200 to 6,000 mcg per L)	20 to 200 ng / mL (20 - 200 mcg / L)
Përqëndrimi i Fe në hepar	5,000 - 30,000 mcg / g (89 deri 550 μ mol / g)	100 to 2,200 mcg / g (5 - 27 μ mol / g)

Edhe pse mbingarkesa e serumit të transferrinës mund të jetë si një shenjë fillestare për të diagnostikuar hemokromatozën, rezultati është paraprak dhe për më tepër përqëndrimi i serumit të ferritinës dhe mbingarkesës së transferrinës mund të rritet në 30 deri 50 % të pacientëve që vuajnë nga hepatiti kronik viral dhe sëmundja alkolike e mëlçisë.

Përqëndrimi i serumit të ferritinës përbën një matje të ndjeshme të mbingarkesës së Fe, por është gjithashtu dhe një fazë akute që pëson një rritje në disa infeksione të ndryshme dhe në kushte inflamatore. Në këtë mënyrë përqëndrimi i serumit të ferritinës nuk mund të përdoret si një test diagnostikues për të detektuar hemokromatozën e trashëgueshme. (Norbert Gatteman, Heinrich Heine, Moorenstr Dusseldorf, 2009).^[14]

2.0 Hemokromatoza si sëmundje gjenetike autozomike, reçesive.

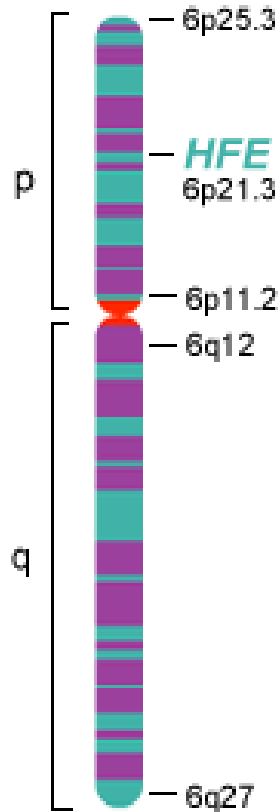
Sëmundja e hemokromatozës është një sëmundje gjenetike, autosomike reçesive, pra individit tregon simptomat e sëmundjes vetëm nëse ka një mutacion në të dyja kopjet e gjenit.

Personi, i cili ka vetëm një kopje të gjenit normal, dhe një të ndryshuar është një mbartës i shëndetshëm, pra nuk paraqet ndonjë simptomë të sëmundjes. Kështu që mund të ketë sëmundjen ai që ka dy alele difektoze të gjenit, të marrë prej të dy prindërve, të dy mbartës të ndryshëm të aleleve të gjenit HFE.

Të gjithë fëmijët e një pacienti të diagnostikuar janë mbartës të shëndetshëm, n.q.se prindi tjetër është normal, pra jo mbartës i ndonjë aleli defektoz.

Bazuar në frekuencën e mbartësve të shëndetshëm, që është mesatarisht rreth 10%, probabiliteti që të dy prindërit të jenë mbartës është $1/10 \times 1/10 = 1/100$. Ndërsa probabiliteti që të lindë një fëmijë i prekur nga hemokromatoza, nga dy prindër mbartës është 25% ose $1/4$ për çdo lindje. (Merryweather-Clarke AT, Feder JN, Br J haematol, 1997).^[15] Në të gjitha familjet ku kanë qenë të pranishme raste me hemokromatozë, pjesëtarët e familjes (prindërit, vëllezërit dhe motrat e pacientit) duhet ti nënshtrohen analizave për të verifikuar parametrat e Fe, dhe analizave gjenetike pasi të jenë identifikuar mutacionet tek pacienti familjar.

Chromosome 6



2.1 Gjени HFE

Pozicioni i këtij gjeni në kromozomin 6 është paraqitur në figurën 1.4, dhe ndodhet në krahun e shkurtër, (p) të kromozomit 6, në pozicionin qëndror p21.3.

Simboli zyrtar i gjenit është HFE, ndërsa simboli alternativ: HLA-H. Emri i produktit të gjenit: proteina e hemokromatozës së trashëgueshme. Lokusi: 6p21.3

Gjени HFE lokalizohet në krahun e shkurtër të kromozomit 6 në pozicionin 21.3 në kariotipin e njeriut. Gjени HFE ka 7 rajone koduese (egzone), të cilët janë të përhapur në 10.000 çifte bazash të ADN-së gjenomike. Egzonet e translatuara në proteinën HFE lidhen me segmentet e ADN-së jokoduese (intronet). Mbas transkriptimit intronet bashkohen, ndërsa egzonet janë vendosur së bashku për të formuar transkriptin e mRNA-së me një gjatësi prej 2700 bp. mRNA-ja më pas translatohet në një sekuencë prej 343 aminoacidesh të proteinës të hemokromatozës së trashëgueshme.

Figura 1. 4. Pozicioni i gjени HFE në kromozomin 6.

Sekuencat e 'mARN' të marra nga databasi i bankës së gjeneve NCBI janë komplementare me sekuencat e cADN-së të gjeneruar nga transkriptet e mRNA-së të ekstraktuar nga qelizat. Sekuencat e ADN-së gjenomike të organizmave eukariotë përmbajnë egzonet të shpërndarë me intronet. Gjatë transkriptimit intronet lidhen bashkë

dhe egzonet bashkohen për të formuar ARN-në mesazhere (mARN). Nukleotidet translatohen në sekuenca aminoacidesh të një proteine të veçantë, mARN-ja gjithashtu përmban disa rajone të patranslatuara të sekuencës koduese. Sekuencat e intronit të lirë të cADN-së të sintetizuara nga mARN-ja gjithashtu përmbajnë rajone të patranslatuara.

Tabela e kodit gjenetik standart për të gjetur kodonin fillestar (ATG) dhe 9 kodonet e tjerë në sekuencën e nukleotidit HFE, tregohet si më poshtë:

10 aminoacidet e para të proteinës së hemokromatozës së trashëgueshme janë si më poshtë:

Tabela 1.4 Kodi gjenetik standart

M G P R A R P A L L
1 ggggacactg gatcacctag tgttcacaa gcaggtacct tctgctgtag gagagagaga
61 actaaagtgc tgaagacct gttgctttc accaggaagt ttactgggc atctctgag
121 cctaggcaat agctgtaggg tgacttctgg agccatcccc gttccccgc ccccaaaaag
181 aagcggagat ttaacgggga cgtgcggcca gagctgggga aatgggcccg cgagccaggc
241 cggcgtctct cctctgatg ctttgcaga ccgcggtcct gcagggggcgc ttgctgcgt

2.2 Struktura e proteinës HFE

Proteina HFE përmban domenet jashtëqelizore alfa-1 dhe alfa-2 të cilat qëndrojnë në majë të proteinës së imunoglobulinës si dhe domeni alfa-3, i cili rrethon membranën e qelizës dhe lidhet me proteinën beta-2-mikroglobulinë.

Mutacioni më i zakonshëm përgjegjës për hemokromatozën e trashëgueshme është C282Y. Mbetja e cisteinës është pjesë e urës disulfide dhe formon një lak në domenin alfa-3 të proteinës HFE.

Kur cisteina 282 ka humbur, ura disulfide nuk mund të formohet dhe domeni alfa-3 i proteinës HFE nuk është më i aftë të formojë kompleks me beta-2-mikroglobulinën e cila shërben si faktor stabilizues. Si rezultat proteina HFE me mutacion degradohet para se të inkorporohet në membranën qelizore.

Qelizat bëhen me mbingarkesë Fe kur nuk është gjeni HFE i cili në mënyrë negative bën që Fe të drejtohet në citoplazmën e qelizës. Me kalimin e kohës mbingarkesa e Fe në këto qeliza mund të dëmtojë indet dhe organet duke sjellë ndërlikime të tjera të shoqëruara me hemokromatozë.

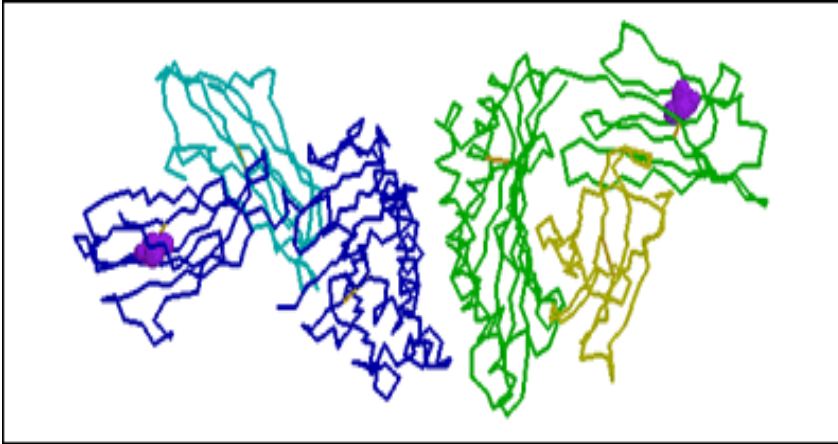


Figura 1. 5. Strukturat e dy molekulave të proteinës HFE.

Zinxhirët me ngjyrë blu dhe jeshile përfaqësojnë proteinën HFE, ndërsa zinxhirët me ngjyrë të verdhë përfaqësojnë molekulat e beta-2 mikroglobulinës. Radikalet me ngjyrë vjollcë tregojnë se ku lokalizohet cisteina në pozicionin 282 në çdo zinxhir të proteinës HFE. Një mutacion në pozicionin 282 të cisteinës përbën shkakun e shfaqjes së hemokromatozës së trashëgueshme. (Bacon BR, Olynyk JK, Brunt EM, Briton RS, Wolff RK, 2008).^[16]

Në figurën 1. 6 tregohet modifikimi që ndodh në nivelin nukleotidik, që përcakton shfaqjen e mutacionit C282Y.

Wild Type HFE Sequence							
Nucleotide	AGA	TAT	ACG	TGC	CAG	GTG	GAG
Amino Acid	Arg	Tyr	Thr	Cys	Gln	Val	Glu
	279			282			285

HFE Sequence with C282Y Mutation							
Nucleotide	AGA	TAT	ACG	TAC	CAG	GTG	GAG
Amino Acid	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Val	Glu
	279			282			285

Figura 1. 6. Paraqitja skematike e shfaqjes së mutacionit C282Y

Gjeni HFE i përket familjes së klasës së parë HLA të molekulave të histokompatibilitetit. Kodifikon për një proteinë me 343 aminoacide, të lokalizuar në membranën plazmatike të disa qelizave, është e ndërtuar nga 3 njësi jashtëqelizore (domenet $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), nga një njësi transmembranore dhe një pjesë citoplazmatike.

Ajo bashkëvepron me receptorët e transferinës në një zonë midis njësive $\alpha 1$ dhe $\alpha 2$ dhe nëpërmjet një ure tioli midis 2 cisteinave me njësinë $\alpha 3$, e cila është kritike për lidhjen e mikroglobulinës $\beta 2$ ($\beta 2MG$) dhe për vendosjen e saj në sipërfaqe të qelizës.

Kjo proteinë luan rol në metabolizmin e Fe. Eksperimentet kanë treguar se në kulturat qelizore në të cilat u fut plasmidi që mbarte gjenin HFE dhe mundësonte prodhimin e proteinës, u vëzhgua kalimi i Fe në këto qeliza dhe më pas kur qelizat me Fe dhe përmbajtje ferritine u pakësuan, numri i receptorëve të transferinës u rrit. Duket se HFE shndërrohet në një rregullator negativ për funksionimin e TfR1 dhe bllokues për pasazhin e Fe në qeliza. Është sugjeruar se HFE kompleton së bashku me transferrinën (Tf) në lidhjen e TfR1. Kur kemi mbishprehje të dy proteinave HFE dhe $\beta 2MG$, ndodh që tek qelizat përmbajtja e Fe dhe ferritinës të rritet, pra HFE shndërrohet në një lehtësues për pasazhin e Fe në qeliza. Mutacionet tek gjeni HFE që përfshihen në rajonin tek lidhja me TfR1 bëjnë që të bllokohet formimi i kompleksit Tf/TfR1/HFE. Janë sugjeruar dy mekanizma me anë të të cilave HFE mund të rregullojë përthithjen e Fe nga zorrët. I pari lidhet me rolin që i atribuohet qelizave të brendshme të duodenit si sensorë për sasinë totale të Fe në organizëm. HFE është gjetur në membranën bazale të këtyre qelizave bashkë me $\beta 2MG$ dhe TfRs. Tf (transferrina) e mbingopur me Fe bashkohet me kompleksin HFE/ $\beta 2MG$ /Tf i cili më pas do të përfshihet brenda një endosome. Tf liron Fe në qelizat e brendshme të duodenit. Këto qeliza më pas maturohen në enterocyte duke inhibuar sintezën e këtyre proteinave e duke favorizuar pasazhin e Fe dhe në kushte të tilla përthithja e Fe në zorrë rritet. Gjithashtu është sugjeruar se sinteza e hepcidinës, një hormon me origjinë nga mëlçia që ngadalëson përthithjen e Fe nga zorra, mund të stimulohet nga HFE ose nga një infeksion. TfR2 dhe HFE favorizojnë pasazhin e Fe në qelizat e mëlçisë të cilat do të ishin përgjegjëse për inductimin e hepcidinës. Dhe një HFE normale duhet të ngadalësojë përthithjen e Fe nga intestini mbas inductimit të sintezës së hepcidinës. (Waheed A, Parkkila S, Zhou X, Tomatsu S, Tsuchihashi Z, Feder J, Schatzman R, Briton R, Bacon B and Sly W. 1997).^[17]

Roli i hepcidinës në homeostazën normale të Fe: me rritjen e Fe shkaktohet një rritje në prodhimin e hepcidinës. Hepcidina e rritur inhibon kalimin e Fe në plazëm nga makrofagët, në hepatocyte dhe në duoden. Duke qenë se Fe i plazmës vazhdon të konsumohet nga sinteza e hemoglobinës, nivelet e Fe zvogëlohen dhe sasia e ulët e hepcidinës kompleton humbjen homeostatike.

Gjeni HFE në personat e prekur nga hemokromatoza, ka mutacione që ndryshojnë funksionin. Dy mutacionet kryesore që janë identifikuar në këtë gjen janë: C282Y dhe H63D

Mutacioni C282Y jep si rezultat zëvendësimin e cisteinës me tirozinën në kodonin 282 të egzoni 4, dhe shkaktohet nga mutacioni i nukleotidit G në pozicionin 845 në A, pra (845 G>A).

Mutacioni H63D jep si rezultat zëvendësimin e histidinës me ac.aspartik në kodonin 63 të egzoni 2 dhe shkaktohet nga mutacioni i nukleotidit C në pozicionin 187 në G, pra (187 C>G). (Feder, J N: Penny D M, Irrinki A, Lee V K, Lebron J A, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman P J, Schatzman R C, 1998).^[18]

Mutacioni i tretë i zakonshëm i gjenit HFE është S65C: 193-T zëvendësim në ekzonin 2. Ky mutacion është në përgjithësi benign. Gjenotipi C282Y/S65C mund të sjellë një rritje të lehtë të rrezikut të sëmundjes, duke kontribuar në një fenotip të lehtë të hemokromatozës. (Rochette et al, 1999 AM J Hum Genet. 64: 1056-1062. Oliveira et al. (2009). US preventive Services Task Force 2006).^{[29], [37],[42]}

2.3 Trashëgimia gjenetike

Kombinimet e trashëgimisë për gjenin HFE (trashëgimia autosomike reçesive)

- 1- N.q.se të dy prindërit kanë njërin mutacion C282Y për gjenin HFE të hemokromatozës, për çdo shtatzani egziston një mundësi 25% për të trashëguar 2 kopje normale të gjenit dhe pasardhësi është i shëndetshëm, një mundësi prej 50% për të trashëguar një kopje me mutacion dhe pasardhësi është mbartës, dhe 25% mundësi për të trashëguar dy kopje me mutacion dhe pasardhësi është i sëmurë. (Figura 1. 7).

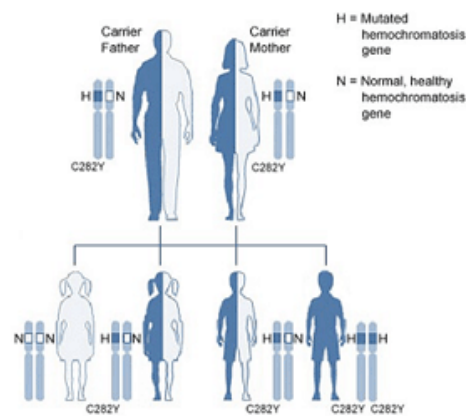


Figura 1. 7. Paraqitja skematike e trashëgimisë autozomike reçesive të hemokromatozës.

- 2- N.q.se njëri prind është i sëmurë, homozigotë me dy kopje të mutacionit për gjenin HFE, dhe prindi tjetër është normal atëherë ekziston mundësia prej 100% që çdo shtatzani mund të trashëgojë një kopje me mutacion dhe tjetër kopje normale, që do të thotë se të gjithë pasardhësit janë mbartës të detyrueshëm.
- 3- N.q.se njëri prind është i sëmurë, homozigotë me dy kopjet e mutacionit C282Y për gjenin HFE, dhe prindi tjetër është mbartës për njërin mutacion C282Y, për çdo shtatzani ekziston mundësia 50% për të trashëguar një alel me mutacion dhe një alel normal dhe në këtë rast kemi të bëjmë me mbartës , dhe 50% mundësi për të trashëguar dy alele me mutacion dhe ky person është i sëmurë.
- 4- N.q.se njëri prind është i sëmurë me dy kopjet e mutacionit C282Y për gjenin HFE dhe prindi tjetër është mbartës për mutacionin H63D, për çdo shtatzani ekziston mundësia 50% për të trashëguar një kopje me mutacion C282Y dhe një kopje normale dhe pasardhësi është mbartës si dhe 50% mundësi për të trashëguar 2 kopje me mutacion (një me mutacion C282Y dhe një tjetër me H63D) dhe pasardhësi është i sëmurë.
- 5- N.q.se njëri prind është i sëmurë me dy kopje me mutacion (C282Y dhe H63D) për gjenin HFE, dhe prindi tjetër është normal, atëherë ekziston mundësia 100% që çdo shtatzani të trashëgojë një kopje me mutacion dhe një kopje normale që tregon se të gjithë pasardhësit janë mbartës të detyrueshëm; 50% e pasardhësve do të jenë mbartës të C282Y dhe 50% e pasardhësve do të jenë mbartës të H63D.
- 6- N.q.se njëri prind është i sëmurë me 2 kopje të mutacionit (një C282Y dhe H63D) për gjenin HFE, dhe prindi tjetër është mbartës për mutacionin C282Y për çdo shtatzani është mundësia 50% për të trashëguar një kopje me mutacion (ose C282Y ose H63D) dhe një kopje normale , pasardhësi është mbartës, si dhe 50% mundësi për të trashëguar 2 kopje me mutacion (ose dy kopje C282Y, ose një C282Y dhe një H63D) dhe pasardhësi është i sëmurë.
- 7- N.q.se njëri prind është i sëmurë me dy kopje të mutacionit (një C282Y dhe një H63D) për gjenin HFE, dhe prindi tjetër është mbartës për mutacionin H63D për çdo shtatzani: është mundësia për të trashëguar një kopje me mutacion (ose C282Y ose H63D), një kopje normale dhe pasardhësi është mbartës; 50% mundësi për të trashëguar dy kopje me mutacion (ose dy kopje me H63D, ose një C282Y dhe një H63D) dhe pasardhësi është i sëmurë . (Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, Capron D, Viprakasit V, Miller A, et al, 2003).^[19]

3.0 Analizat laboratorike biokimike për të evidentuar hemokromatozën.

Tepria e transferrinës dhe testet e ferritinës të serumit

Testet e hemokromatozës nuk janë pjesë e kontrollit të përgjithshëm mjekësor. Në mënyrë specifike këto teste bëhen me kërkesë nga laboratorit i gjakut. Mjeku mund të urdhërojë kryerjen e testeve të Fe të tilla si : Fe i serumit, ferritinën, transferrinën, transferrinën e saturuar ose kapaciteti total i lidhjes së Fe. Një rëndësi të madhe ka përcaktimi i sasisë së transferrinës dhe ferritinës. Matjet e transferrinës dhe ferritinës tregojnë se sa Fe ndodhet në organizëm dhe, Fe që është transportuar dhe depozituar.

Testet biokimike të gjakut

3.1 Ferritina e Serumit (SF)

Rezultati i transferrinës të serumit ndryshon në varësi të gjinisë dhe moshës. Një nivel jonormal i lartë i ferritinës të serumit vihet menjëherë në dukje në testin e laboratorit si një rezultat jashtë normës. Teste pasuese janë të nevojshme për të parë nëse vlerat rritëse të ferritinës vazhdojnë me kalimin e kohës. Një nivel i ferritinës më i lartë se 200ng/ml për femrat dhe 300ng/ml për meshkujt konsiderohet si jashtë norme, por në rastin e një organi të dëmtuar niveli i ferritinës është 1000ng/ml.

3.2 Transferrina e saturuar (Saturimi, ngopja e transferrinës)(TS)

Një rezultat normal është 25-40% tepri transferrine. Nëse ka një rritje më të madhe se 45% kërkohet një vëzhgim më i thellë .

Nëse vlerat e ferritinës dhe transferrinës janë të larta atëherë testet e ekzaminimit të gjakut duhet të përsëriten për siguri. Testet diagnostike shtesë duhet të bëhen për të konfirmuar për praninë e hemokromatozës, teste si testi gjenetik për gjenin HFE.

Nivelet e larta të ferritinës dhe transferrinës mund të dedektohen para se simptomat të jenë të dukshme. Rezultatet e vazhdueshme në nivele të larta të ferritinës dhe transferrinës janë quajtur mbingarkesa biokimike të Fe dhe kjo konsiderohet si shenja e parë e hemokromatozës.

Në shtesë me testet e tjera ekzaminuese biokimike të gjakut, janë dhe teste të tjera të cilat rekomandohen si ndihmë për të vlerësuar rrezikshmërinë dhe të monitorojnë dëmtimin e organeve të veçanta.

3.3 Testi i enzimave te heparit

Kryhet gjithmonë për të analizuar dëmtimin e mëlçisë. Matjet e enzimave të mëlçisë shërbejnë për të kthyer në normalitet me anë të eliminimit të Fe. N.q.se nuk ndodh kjo duhet shpjeguar, psh cirroza mund të jetë e pranishme, ose pacienti mund të ketë një sëmundje tjetër të mëlçisë.

3.4 Biopsia e heparit

Shërben për të treguar shkallën e dëmtimit të mëlçisë. Mund të kryhet, por nuk është e nevojshme për të përcaktuar diagnozën në pjesën më të madhe të pacientëve me hemokromatozë. (Dadone MM, Kushner JP, Edwards CQ, Bishop DT, Skolnick MH. August 1982).^[20]

3.5 Imazhi radiologjik i heparit

Gjithashtu kërkohet imazhi radiologjik që jep një pamje të strukturës së heparit dhe mund të vlejë për gjetjen e cirrozës apo për komplikacione të tjera. Në pjesën më të madhe pacientët me cirrozë, shpesh ekzaminohen për kancerin primar të heparit (hepatoma / HCC) një ndërlikim që ndodh në 25% të pacientëve me cirrozë të rezultuar nga hemokromatoza. Shumë prej pacientëve duhen regjistruar në një program për diagnostikimin e hepatomës që konsiston në një alfa-fetoproteinë (test gjaku) dhe në një procedurë radiologjike, kryesisht një ultratingull ose një skanim trifazik, çdo 6-12 muaj. (Harris EL, McLaren CE, Reboussin DM, Gordeuk VR, Barton JC, Acton RT, et al, 2007).^[21]

4.0 Analizat gjenetike për mutacionet C282Y dhe H63D të gjenit HFE.

4.1 Testi diagnostik gjenetik

Testi gjenetik i gjenit HFE konfirmon diagnozën e hemokromatozës. Merret një mostër gjaku për testin gjenetik, me anë të së cilës kontrollohet gjeni HFE për mutacionet C282Y dhe H63D, për tipin e parë të hemokromatozës.

Kombinimet positive të mundshme që rezultojnë nga testi gjenetik i HFE-së janë:

C282Y / C282Y – homozigotë për gjenin HFE të tipit të parë të hemokromatozës. Pjesa më e madhe e individëve me hemokromatozë kanë këtë kombinim, me mbingarkesë Fe të pranishme tek pothuajse të gjithë individët.

C282Y / H63D - heterozigotë të përbërë për gjenin HFE të tipit të parë të hemokromatozës. Mbingarkesa sinjifikante e Fe ndodh në 15% të individëve. Ndërsa tek 85% e individëve të tjerë mbingarkesa e Fe është më pak e ashpër.

H63D / H63D – homozigotë për gjenin HFE të tipit të parë të hemokromatozës. Mbingarkesa e Fe është e pazakonshme, me pak shanse për dëmtim të organit, edhe pse mund të luajnë rol faktorë të tjerë gjenetikë apo mjedisorë.

Një test gjenetik pozitiv i HFE do të përfshijë dhe pjestarë të tjerë të familjes të cilët duhen testuar. Të afërmit e shkallës së parë (prindërit, vëllezërit dhe fëmijët) mund të jenë mbartës të gjenit HFE, ose mund të trashëgojnë të dyja kopjet jonormale të gjenit HFE dhe të kenë hemokromatozën. Bashkëshortët duhet të testohen nëse kanë fëmijë të vegjël në mënyrë që të vlerësojnë shkallën e rrezikut.

Nëse testi gjenetik është negativ duke qenë se mutacionet C282Y dhe H63D nuk janë dedektuar në gjenin HFE, atëherë do të ketë një arsye tjetër që shpjegon mbingarkesën e Fe, një sëmundje tjetër ose një formë tjetër e hemokromatozës e shkaktuar nga një gjen tjetër. (Whitlock EP et al, Intern Med 2006; Qassem A et al, 2005).^[22]

4.2 Analizat gjenetike për mutacionet C282Y dhe H63D të gjenit HFE

Çdo mostër ADN-je testohet për praninë e mutacionit të hemokromatozës me njërën nga metodat e mëposhtme si:

- 1. Amplifikimi alel specifik.** Kjo metodë zbatohet duke përdorur kitin Genespector HFE. Për PCR, 5µl ADN amplifikohen me 12.5 µl primer mix, 2.5 µl dNTP, 2.25µl H₂O, 2.5µl bufer dhe 0.25 µl Taq-polimerazë për 5 minuta në 94°C, 35 cikle për 30 sekonda në 94°C, 30 sekonda në 58°C dhe 30 sekonda në 72°C të ndjekur nga inkubimi përfundimtar në 5 minuta në 72°C.
- 2. Hibridizimi i oligonukleotideve alel specifike.** (Metoda Reverse Dot Blot). Dy metodat e oligonukleotideve alel specifike janë:
Metoda 2A dhe metoda 2B. Të dyja këto metoda kërkojnë PCR dhe hibridizim të produkteve të PCR në sondat e oligonukleotideve të lidhura në breza të ngushtë.
Metoda 2A: Realizohet duke përdorur kitin LBP-prototip. ADN-ja (5µl) shtohet në 45µl të kompleksit HFE PCR dhe amplifikohet në këto kushte: 9 minuta në 95°C, 40 cikle për 45 sekonda në 95°C, 45 sekonda në 60°C dhe 1 minutë në 72°C, të ndjekur nga inkubimi i fundit të 4 minutave në 72°C. Procedura e hibridizimit të vetvetishëm revers realizohet në aparatit AUTO-LIPA dhe konsiston në hibridizimin, zhvillimin e ngjyrës duke përdorur protokolle dhe kimikate sipas inogjenetikës. Prania e formës tip i egër dhe mutacioneve tregohet nëpërmjet sinjaleve me ngjyrë të testit me breza. Brezat do të përmbajnë oligonukleotide specifike për mutacionet C282Y, H63D dhe S65C, po ashtu si dhe për tipin e egër dhe kontrollin e lidhur.
Metoda 2B: Përdor kitin GmbH. PCR me 5µl ADN, 35µl primer (duke përfshirë dNTPs), 2.7µl H₂O, 2µl MgCl₂, 5µl 10x bufer-PCR dhe 0.3µl Taq-polimerazë konsiston me 15 minuta në 95°C, 10 cikle me 30 sekonda në 95°C, 40 sekonda në

58°C, 40 sekonda në 70°C dhe 25 cikle në 25 sekonda në 95°C, 40 sekonda në 70°C të ndjekur nga 8 minuta në 70°C. Hibridizimi, larja dhe dedektimi i ngjyrës realizohen në aparatën Tecan profiblot. (Jeffrey GP, Chabkrabarti S, Hegele RA, Adams PC, Bassett ML, Leggett BA, Halliday JW, Web S, Powell LW, J Hepatol, 1997)^[23]

- 3. PCR-RFLP.** Polimorfizmi i fragmenteve të përfuara tregon për praninë apo për mungesën e sekuencave të njohura nga enzimët e restriksionit në një rajon të caktuar të ADN-së që duam të analizojmë.

PCR realizohet nëpërmjet amplifikimit enzimatik të sekuencave target të ADN-së të kufizuar nga dy oligonukleotide specifike (primer). Njëri prej tyre i korrespondon skajit 5' (primer sens) dhe i dyti skajit 3' (primer antisens). Mbas denatyrimit me temperaturë të lartë të dy vargjeve të ADN-së, primeret hibridizohen me vargjet komplementare dhe fillon zgjatja e vargjeve të rinj në praninë e një ADN-polimerazë të qëndrueshme ndaj temperaturës (TAQ polymerasë). Ky reaksion përsëritet 20-40 herë, sipas një programi që përcakton kohëzgjatjen dhe temperaturën e çdo hapi. Temperatura dhe kushtet e çdo hapi duhet të përcaktohen sipas sekuencës së fragmentit të ADN-së që do amplifikohet (% GC) dhe çiftit të primereve të zgjedhur. Ciklet e përsëritura të denatyrimit në temperaturë të lartë, hibridizimit të primereve dhe sintezës enzimatike të ADN-së rezultojnë në një amplifikim eksponencial.

Endonukleazat e restriksionit janë enzima me origjinë bakteriale që copëtojnë ADN-në duke e ndarë atë në sekuenca specifike. Endonukleazat e restriksionit përdoren për të analizuar ADN-në duke e prerë atë në fragmente me madhësi të parashikuar. Jo të gjitha mutacionet çojnë në krijimin apo zhdukjen e një siti restriksioni çka përbën dhe kufizimet e kësaj teknike. Prania ose mungesa e siteve të njohjes nga enzimët përcaktohet nga profili i fragmenteve të përfuara nga digjestionit që paraqitet në elektroforezën në xhel agaroze ose poliakrilamidi. (Merryweather Clarke AT, Pointon JJ, Shearman J D and Robson K J 1997).^[24]

Standartet europiane 2016 për diagnostikimin molekular të hemokromatozës së trashëgueshme (HT)

HT është një grup sëmundjesh gjenetike autozomale reçesive të karakterizuar nga akumulimi i hekurit në organet parenkimatoze, kryesisht mëlçi, i cili mund të rezultojë në dëmtimin e strukturës dhe funksionit të organit. Vitet e fundit, hepcidina është identifikuar si hormoni kyç që kontrollon saturimin e transferrinës së plazmës me hekur (transferrin saturation). Mungesa e hepcidinës shkakton rritjen e saturimit të transferrinës, i cili është tipari i përbashkët dhe parametri biokimik kryesor i të gjitha formave të HT.

Mutacionet homozigotë ose heterozigotë të përbërë për gjenin e hepcidinës (*HAMP*) dhe të gjeneve që stimulojnë prodhimin e hepcidinës, sic janë *HFE*, *HJV* dhe *TRF2* janë të shoqëruara me hemokromatozë. Sëmundja e Ferroportinës nuk klasifikohet si hemokromatozë. Ajo nuk shoqërohet me nivel të lartë të saturimit të transferrinës (TS) ose me përqëndrim të ulët të hepcidinës. Ferroportina është një sëmundje gjenetike dominante e shkaktuar nga një difekt gjenetik në gjenin *SLC40A1*, i cili në formën e tij klasike, shoqërohet me humbjen e funksionit të tij eksportues (nxjerrjen jashtë të hekurit) dhe për rrjedhojë me mbingarkesë të hekurit në mëlçi dhe shpretkë. Në raste të rralla, mbingarkesa e hekurit mund të ndodhë në pacientë që mbartin një mutacion në gjenin *SLC40A1*, i cili shton aftësinë për të eksportuar hekurin. Në këtë rast të ferroportinës jo klasike, pacientët mund të paraqesin një fenotip hemokromatoze dhe klasifikohen si HT. Penetranca e kësaj sëmundje është e ulët, duke prekur kryesisht meshkuj në moshën 40 deri 60 vjeç. Megjithëse individët mund të kenë një gjenotip homozigotë për HT, shprehja klinike është e ndryshme, 78-85% e individëve homozigotë për mutacionin C282Y nuk zhvillojnë sëmundjen. Kryesisht studimet janë përqëndruar në HT të lidhur me gjenin *HFE*.

5.0 Gjeografia e mutacioneve C282Y dhe H63D

5.1 Prevalenca e mutacioneve C282Y, H63D dhe S65C në Europë

Frekuencat e alelit C282Y në popullatën e përgjithshme janë të shpërndara nëpërmjet një rritjeje nga Europa veriore në atë jugore me një përhapje më të madhe në popullatat që kanë një komponent më tepër Kelt apo Viking. (Merryweather-Clarke AT, Pointon JP, Jouanolle AM, Rochette J, Robson KJH. *Gene Test* 2000).^[25] Është bërë një studim që ka krahasuar frekuencat e mutacioneve C282Y, H63D, S65C të vëzhguar në popullatën sllovene me frekuencat e vëzhguara në disa popullata europiane. Prevalenca e mutacionit C282Y në Republikën Sllovene ka lidhje me përqëndrimin verior dhe atë jugor si dhe me pozicionin gjeografik të Sllovenisë. (Cukjati M, Vaupotic T, Ruprecht R, Curin-Sebec 2007).^[26] Duke krahasuar me vendet me origjinë sllave frekuenca e C282Y është më e lartë por jo sinjifikante duke e krahasuar me frekuencën e mutacionit në Poloni (3.1%), në Republikën Çeke (3.4%), me Kroacinë (3.3%) dhe frekuenca më e ulët është në Bosnjë dhe Hercegovinë (4.0%). (Cimburova M, Putova I, Pinteraova D, Horak J, 2005).^[27] Frekuenca e mutacionit C282Y ndryshon dhe në vendet e tjera me origjinë sllave, si në Serbi dhe Mal i Zi që është (1.6%). Gjithashtu vihet re dhe një ndryshim i madh në frekuencën e alelit C282Y edhe midis vendeve me origjinë sllave të cilët mund të shfaqin një paraqitje të vonshme të mutacionit në popullatat sllave. Në ndryshim me këtë frekuenca e C282Y në Slloveni është më e lartë sesa në rajonin Modena në Itali. Ndërsa mutacioni H63D është më shumë frekuent dhe më i shpërndarë në mënyrë uniforme midis vendeve europiane. Frekuenca më e lartë e mutacionit H63D është gjetur

tek katalanet e Spanjës, (de Diego et al. 8; 263-267 2004).^[28] duke sugjeruar se ky mutacion mund të ketë origjinën nga popullatat e Europës Perendimore përpara ekspansionit indo-europian. (Rochette et al, 1999, Hum Genet. 64:1056-1062) ^[29].

Në Spanjë është treguar se rreth 85% e të sëmurëve me hemokromatozë janë homozigotë për mutacionin C282Y të gjenit HFE, ndërsa mutacionet H63D dhe S65C mund të luajnë rol në sëmundje. Është gjetur se frekuencat alelike të mutacioneve C282Y, H63D, S65C janë përkatësisht 0,03%, 0,02%, 0,01%. Ndërsa frekuenca për mutacionin C282Y tek të porsalindurit homozigotë është 0,001%, për heterozigotët C282Y/H63D dhe C282Y/S65C janë 0,01% dhe 0,002%. (Altes A, Ruis A, Barcelo MJ, Puig T, Maya AJ, Baiget M, 2004).^[30] Duke konsideruar frekuencën e alelit H63D (12.8%), Sllovenia ka frekuencë më të ulët krahasuar me Poloninë (16.2%), me Republikën Çeke (15.0%), me B& Hercegovinën që kanë një frekuencë më të ulët të alelit H63D (11.3%) edhe pse ndryshimi nuk është sinjifikant.

Frekuenca alelike e mutacionit S65C në popullatën sllovene është vlerësuar (1.8%) që është shumë e afërt me frekuencën e Kroacisë (1.8%), dhe Serbia dhe Mali i Zi (1.6%). Frekuenca alelike e S65C është e afërt me popullatën franceze në Britani (1.95%) dhe më e lartë krahasuar me rajonin Ossola në Italinë e Veriut.

Frekuencat për mutacionet e gjenit HFE në vendet kryesore të Europës janë paraqitur të përmbledhura në Tabelën 1. 5.

Tabela 1. 5. Frekuencat e mutacioneve të gjenit HFE në vendet kryesore të Europës

<i>Popullsia</i>	<i>Frekuenca e mutacionit C282Y,%</i>	<i>Frekuenca e mutacionit H63D %</i>
Mbretëria e bashkuar	6.0	12.1
Irlanda	10	18.9
Islanda	6.7	10.6
Norvegjia	6.4	11.2
Finlanda	0	11.8
Danimarka	9.5	12.2
Hollanda	2.6	29.5
Gjermania	1.9	18.9
Italia	0.5	12.6
Greqia	1.4	11.9
Turqia	0	17.7
Spanja	3.2	26.3
Europa ne total	3.8	13.6

Nuk rezultojnë të dhëna për punime të kryera brenda vendit deri tani, në institucionin tonë apo në institucione të tjera. Ndërkohë që duke filluar nga viti 1996 ^[31] kur u identifikua gjeni përgjegjës për HK, ka një numër shumë të madh studimesh për popullata të ndryshme dhe për mutacionet përkatëse, shpërndarjen e tyre. Një numër i madh punimesh kryhen aktualisht për të gjetur lidhjet midis mbingarkesës së hekurit dhe hemokromatozës. (Fedel JN, et al. 1996; Merryweather-Clarke AT, et al. 1997) ^{[31],[2]}

Nuk janë studjuar akoma të gjitha popullatat humane dhe këto studime vazhdojnë në Azi, Kinë, (Lin A, et al. 70; 252-255, 2007) ^[32], Amerikën e Jugut, por edhe në Europë. Më poshtë po paraqesim përmbledhje nga disa artikuj të kohëve të fundit të kryera në popullatat europiane.

Janë analizuar kromozomet europiane dhe janë vëzhguar frekuencat e mutacioneve C282Y dhe H63D përkatësisht 3,8 % dhe 13,6 % . Mutacioni H63D ishte i pranishëm tek të gjitha popullatat europiane të përfshira në këtë studim, ndërsa me frekuenca më të larta se 6% ky mutacion shfaqet në popullatat e Arabisë Saudite, Indisë dhe Meksikës me frekuencat respektive 8.5%, 8.4% dhe 6.5%. Me frekuenca më të ulëta ky mutacion shfaqet tek afrikanët, aziatikët dhe nuk është gjetur tek kolumbianët, australianët autoktonë, taivanezët dhe senegalezët. Në Tunizi frekuencat alelike për mutacionet C282Y dhe H63D të gjenit HFE janë përkatësisht 0,09% dhe 15,17%. (Sassi R, Hmida S, Kaabi H, Hajjaj A, Abid A, Maamar M, Mojaat N, Benhamed L, 2004). ^[33]

Mutacioni C282Y është gjetur pothuajse tek të gjithë popullatat europiane si të finlandezëve, qipriotëve grekë dhe turq me përjashtim të indianëve heterozigotë dhe xhamajkanëve heterozigotë.

Frekuencat më të larta alelike C282Y janë gjetur në Mbretërinë e Bashkuar (6.4%), duke përfshirë 10% në kromozomet irlandeze, danezët (9.6%), norvegjezët (6.4%), dhe bavarezët (5.6%). Përqindja më e lartë e heterozigotëve të mutacionit C282Y është gjetur tek popujt e Europës së Veriut dhe frekuencat e homozigotëve janë 1/100 në Irlandë, 1/278 në pjesën tjetër të Mbretërisë së Bashkuar (2/368=1/184), 1/111 në Danimarkë, 1/223 në Islandë dhe 1/244 në Norvegji. Një vlerësim paraprak i frekuencës së hemokromatozës në Danimarkë është 1/217-1/270 që konsiderohet e ulët në krahasim me frekuencën 1/111. Kjo mospërputhje ndodh për shkak të numrit të vogël të danezëve të përfshirë në këtë studim, ose mund të tregojë që një numër i madh i danezëve që mund të kenë hemokromatozë janë të pa diagnostikuar. (Pedersen et al. 87; 735-740.2008) ^[34]. Frekuenca 1/270 tregon një frekuencë alelike rreth 6.1% që përfshihet brenda kufijve të besimit 95%. Këto frekuenca alelike të vëzhguara janë të krahasueshme me vlerësimet e hershme të frekuencave në popullatat e Europës së Veriut me 1/200-1/300, në pjesën më të madhe të australianëve kaukazanë, francezëve, suedezëve dhe amerikanëve veriorë. (Pedersen et al. 2008), ^[34]. (Merryweather-Clarke AT, et al. Genet Test 2000). ^[25] Ndërsa

frekuenca të ulëta janë vëzhguar tek finlandezët, për të cilët njihet se ka një ndryshim gjenetik nga pjesa tjetër e popullatave europiane veriore.

Është identifikuar në disa popullata të Europës së Veriut prania e mutacionit C282Y i cili përbën një marker të shkëlqyer për gjenin e hemokromatozës (Merryweather-Clarke AT, et al. Genet Test 2000) ^[25]. Rajoni i Ballkanit ka një frekuencë rreth 2-3% për mutacionin C282Y, që do të thotë një frekuencë të individëve homozigotë për C282Y rreth 1/1000-1/1500. Të dhënat e popullatave të rajonit na sugjerojnë që të përqëndrohemi tek pacientët me shenja klinike për hemokromatozën për të gjetur të sëmurë me HT. Kjo është strategjia që po ndjekim në studimin tonë në popullatën shqiptare. Gjithashtu studiuesit kanë sugjeruar që është e rëndësishme të fillohet një program diagnostikimi gjenetik i ndjekur nga matjet e transferrinës dhe sasisë së hekurit të pranishëm në hepar të homozigotët për të konfirmuar llojin e sëmundjes dhe më pas të implementohet një flebotomi terapeutike e përshtatshme.

Në përfundim mund të themi se studimi që po paraqesim është një kontribut për njohjen e kësaj sëmundje gjenetike në vendin tonë si dhe për të plotësuar kuadrin European të përhapjes dhe mutacioneve të kësaj sëmundje. (Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B.) Ristic S. et al 88:99-104, (1998). Oliveira et al. (2009): 794-798. Lee SH, et al. (2009). 54: 879-886. Ferreira et al. (2008). 379-383. Neghina AM, 2009, pp. 173-176 ^[35],
[36],[37],[38],[39],[40]

II. METODOLOGJIA

2.1 Qëllimi

1. Përcaktimi i frekuencës së mutacioneve C282Y dhe H63D të gjenit HFE në një kampion përfaqësues individësh të popullatës shqiptare.
2. Aplikimi i një metode molekulare efektive të analizës së ADN-së, e përshtatshme për identifikimin e mutacioneve të gjenit HFE për hemokromatozën, me saktësi të lartë dhe me kosto të ulët.
3. Përcaktimi i mutacioneve të gjenit HFE në një grup pacientësh të ndjekur nga klinika e hepatologjisë, të cilët paraqesin sëmundje të heparit dhe mbingarkesë të hekurit.
4. Nëpërmjet përcaktimit në serum të hekurit, ferritinës dhe transferrinës së saturuar krahasuar me gjenotipin e tyre për gjenin HFE u vlerësuan nivelet e këtyre parametrave si indikator për diagnostikimin e hershëm biokimik të hemokromatozës.

2.2 Objektivat

1. Përdorimi i metodës së analizës së ADN-së për gjenin HFE, e quajtur PCR – RFLP. Amplifikimi specifik i ADN-së, copëtimi me dy enzima restriksioni dhe analiza e fragmenteve të prodhuara me elektroforezë në xhel agaroz, për përcaktimin e mbartësve heterozigotë ose homozigotë për dy mutacionet më të përhapura të gjenit HFE, C282Y dhe H63D.
2. Përcaktimi i tre mutacioneve më të përhapura përkatësisht C282Y, H63D dhe S65C të gjenit HFE duke përdorur metodën diagnostikuese Strip Assay.
3. Përcaktimi i mutacioneve C282Y dhe H63D të gjenit HFE, frekuencës së tyre dhe e mbartësve heterozigotë të këtyre mutacioneve në një grup individësh të zgjedhur rastësisht nga popullata e shëndetshme shqiptare.
4. Gjetja e bashkëlidhjeve midis gjenotipit të HFE dhe parametrave biokimik të analizuar në grupin e pacientëve të hospitalizuar në Klinikën e Hepatologjisë.
5. Përcaktimi i markuesve biokimik të saktë të mbingarkesës së hekurit si kriter për të eksploruar gjenin përgjegjës të hemokromatozës.

2.3 Materiali dhe Metodrat

Materialiet

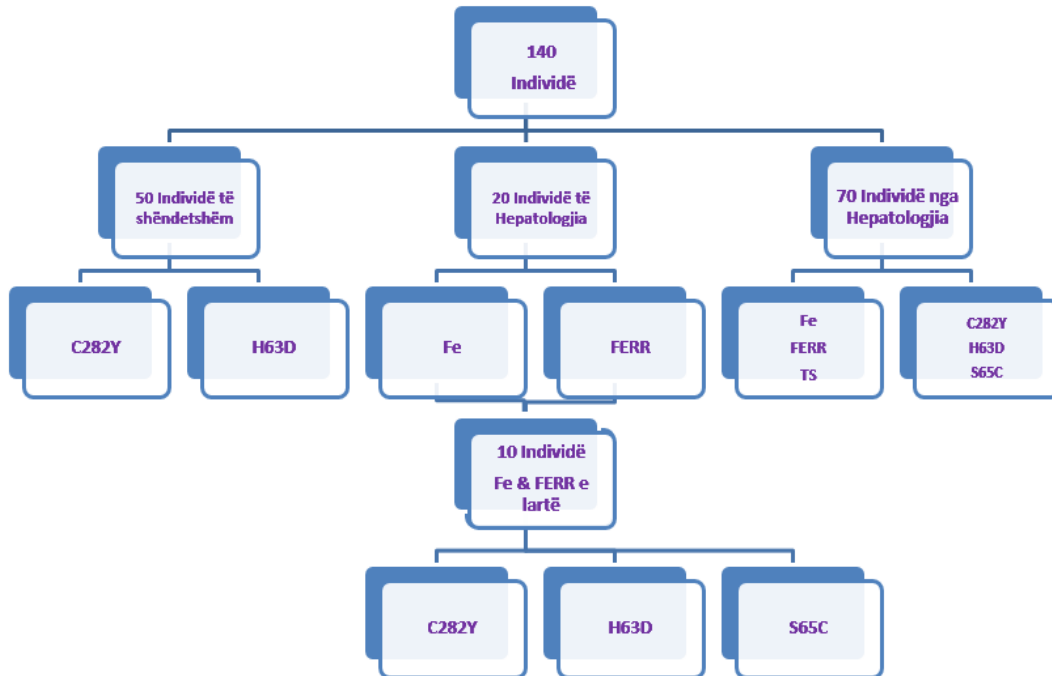
Në studim janë përfshirë 140 individë në një periudhë kohore 2010 – 2018. Prej këtyre individëve 50 individë janë të shëndetshëm dhe 90 individë të sëmurë me sëmundje të heparit. Punimi u realizua për një periudhë disa vjeçare në Spitalin Universitar Obstetrik-Gjinekologjik “Mbretëresha Geraldinë” me një bashkëpunim të ngushtë midis Laboratorit Klinik-Biokimik dhe Qendrës së Diagnostikës Molekulare dhe Kërkimeve Gjenetike. Gjithashtu vazhdoi bashkëpunimi me Klinikën e Gastrohepatologjisë në QSUT” Nënë Tereza”.

Fillimisht u bë mbledhja e kampioneve të gjakut në 50 individë të zgjedhur rastësisht nga popullata e shëndetshme, që u paraqitën në Qendrën e Dhurimit të gjakut të SUOGJ ”Mbretëresha Geraldinë” për të dhuruar gjak për njerëzit e afërm. Këta individë kryen testet e protokollit rutinë të kontrollit. Midis tyre kryen dhe analizën për hepatitet me teste diagnostikues. Individët që u morën në studim ishin me origjinë nga rajone të ndryshme të vendit. Raporti meshkuj femra i këtij kampioni ishte 1/1.

Nga këta persona është marrë nga 5ml gjak venoz me K-3EDTA, dhe është ruajtur në ngrirje -20 °C deri në ekstraktimin e ADN-së.

Më pas vazhdoi studimi me mbledhjen e mostrave të gjakut të 90 pacientëve të hospitalizuar në Klinikën e Gastrohepatologjisë me sëmundje të heparit kryesisht cirrozë, hepatit dhe steatozë. Nga këta, 90 pacientë 77 meshkuj dhe 13 femra u vlerësuan për tu marrë në studim. Mbledhja e këtyre mostrave u bë në periudha të ndryshme kohore, kjo në varësi të prezencës të pacientëve me sëmundje të mëlçisë të shtruar në klinikë. Nga këta pacientë u mor 5ml gjak venoz që u nda në dy epruveta: 2 ml në tub me K3-EDTA dhe 3ml në tub me ndarje serumi me gjel ose me granula 10x100 (test tubes with separating granules or gel) për matjen e parametrave biokimikë. Tubi me K3-EDTA është ruajtur në ngrirje -20°C deri në ekstraktimin e ADN-së. Tubi tjetër pasi është centrifiguar është përdorur për matjen direkt të parametrave biokimikë të mbingarkesës së hekurit, ferritinës dhe transferrinës së saturuar ose është ndarë serumi dhe është vendosur në ngrirje -20°C për matje të mëvonshme në një kohë tjetër.

Më poshtë jepet e përmbledhur **Strategjia dhe Struktura e Studimit**
Tabela 2.1 Pamje skematike e strukturës së studimit



-50 individë të shëndetshëm u analizuan për mutacionet C282Y, H63D.

-Në 20 prej 90 pacientëve u analizuan Fe dhe FERR dhe nga këta u përzgjedhën 10 pacientë të cilët kishin vlera të larta të Fe dhe FERR dhe u analizuan për mutacionet C282Y, H63D, S65C.

-Në 70 pacientë të tjerë u analizuan Fe, FERR dhe TS dhe përkatësisht dhe analiza molekulare për C282Y, H63D, S65C

2.4 Metodatat për përcaktimin e parametrave biokimikë

Metoda kolorimetrike

Për matjen e hekurit u përdor metoda kolorimetrike e përcaktimit të tij në serum. Fe⁺⁺ vepron me kromazurol B në temperaturën e dhomës dhe formon një kompleks të ngjyrosur intensiteti i të cilit është proporcional me koncentrimin e hekurit në analizë (serum). Metoda është end point dhe aparati për matje është Minitectno fotometër analizator.

Metoda imunoturbidimetrike.

Në këtë metodë receptori solubël i transferrinës (sTfR) është një grimcë e zgjeruar që përdor kiti në analizimin turbidimetrik në aparatit Cobas 6000 për matjen e transferrinës. Në figurën 2. 1 paraqitet aparatit Cobas 6000. Grimcat e lateksit mbulojnë ose veshin antikorpjet anti-sTfR që veprojnë me antigjenin në serum duke formuar kompleksin Ag-Ak. Në vijim ndodh aglutinacioni dhe precipitati i formuar matet fotometrikalisht. Formula që u përdor për matjen e transferrinës së saturuar është:

$$ST = \text{sideremi} \times \frac{70}{TRF \times 100}$$



Fig. 2.1 Foto e aparatit Cobas 6000

Metoda ELFA

Me këtë metodë është analizuar ferritina duke përdorur VidasFerritin kit që është test automatik kuantitativ që përdor ELFA teknikë (enzyme linked fluorescent assay). ELFA është metodë imunologjike.

Principi i analizës është kombinimi i metodës sanduiç me përcaktimim final fluoreshent. Faza solide SPR (the solid phase receptacle) në stripin e kitit e cila nga brenda është e mbuluar me imunoglobulina monoklonale anti-ferritin shërben si faza e pipetimit në aparat për analizën. Reagentët e analizës janë gati për tu përdorur dhe parapërgatiten në stripet reagent të mbyllur. Të gjitha hapat që ndiqen për kryerjen e analizës janë automatikisht të performuara nga instrumenti. Reaksioni i mesëm është i cikluar brenda dhe jashtë kohës individuale të SPR. Gjatë përcaktimit final substrakti (4- methyl - umbelliferyl) është cikluar brenda dhe jashtë SPR. Enzima e konjuguar katalizon hidrolizën e këtij substrakti brenda produktit fluoreshent, fluoreshenca e të cilit matet në 450 nm. Intensiteti i fluoreshencës është proporcional me përqëndrimin e antigjenit prezent në serum(analizë). Në fund të testimit rezultatet kalkuloohen automatikisht nga aparati në relacion ose lidhje me kurbën e kalibrimit të ruajtur në memorje. Sistemi Vidas përdor teknologjinë ELFA duke kombinuar metodën Elisa me lexues fluoreshent. Aparati që u përdor për matje është miniVidas fig.2.2.



Fig. 2.2 Foto e aparatit MiniVidas

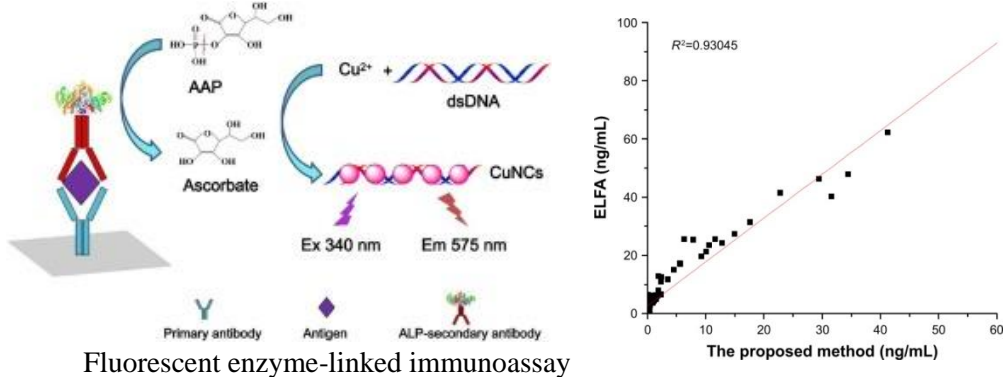


Figura 2.3 Paraqitje skematike e metodës ELFA

Parametrat biokimik të analizuar. Testet e hekurit(Fe)

Hekuri (Fe) është një komponent esencial i proteinës së hemit dhe ka si funksion transportin e oksigjenit. Pjesa më e madhe e hekurit në organizëm ndodhet në përmbajtje të hemoglobinës. Rritja e vlerave të hekurit është gjetur në aneminë hemolitike, aneminë pernicioze, helmimet me plumb, hepatitin akut nekrotik dhe një shkak mund të jetë dhe hemokromatoza.

Transferrina (TRF) Transferrina është proteinë principale e plazmës për transportin e hekurit. Ajo quhet dhe siderofilin, proteinë transportuese e madhe që rregullon absorbimin e hekurit. TRF sintetizohet në hepar dhe transporton hekurin në serum. Molekula e TRF specifike lidh Fe^{3+} duke formuar TRF- Fe^{3+} që shkon në plazëm dhe mbart Fe e depozituar në organizëm. Përcaktimi në plazmë i niveleve të TRF është përdorur për diagnozën diferenciale të anemisë, për monitorimin e trajtimit të saj dhe për të vlerësuar statusin nutricional të pacientit. Rritja e TRF mund të jetë një nga parametrat indikator për hemokromatozën. Nivelet e larta të transferrinës janë të lidhura me aftësinë e trupit të luftoj infeksionet.

Ferritina (FERR)

Ferritina është proteinë rezervë, lloji i hekurit i depozituar. Ajo është kombinimi i apoferritinës dhe hekurit Fe^{3+} , që ruajnë hekurin në formë të tretshme dhe jo toksike. Niveli i ferritinës është proporcional me hekurin total rezervë në trupin e njeriut. Ferritina është indeksi më sensitiv i deficiencës nga hekuri. Ajo ka një rol të rëndësishëm në diagnostikimin në kohë të pacientëve që kanë deficiencë të hekurit.

Në testet e Fe hyn dhe kapaciteti total lidhës i hekurit (TIBS) që lidhet me serumin e transferrinës, por lidhja nuk është lineare. Saturimi i transferrinës është indeksi më i mirë i vlerësimit të hekurit, dhe matet me formulën si më poshtë:

Saturim i Transferinës = (Serum Hekuri x 100)

KTLH (TIBS)

Rezultatet e kombinuara të transferrinës, hekurit, dhe TIBS janë të nevojshme në diagnostikimin e anemive të ndryshme, në përcaktimin e anemisë nga mungesa e hekurit, në vlerësimin e talasemisë, anemisë sideroblastike dhe hemokromatozës.

Protokolli i ndjekur për analizimin gjenetik

1. Metodatat e analizës gjenetike

Ekstraktimi i ADN-së sipas metodës Chelex-100 nga gjaku.

Për ekstraktimin e ADN-së përdoren aparate të thjeshta si mikropipeta, mikrocentrifuga eppendorf (figura 2.4), inkubatori për epruveta eppendorf 1,5 ml, block heater, përzjerës.

1. Gjaku i ngrirë në - 20°C nxirret jashtë në temperaturë ambjenti dhe lejohet të shkrihet.
2. Përgatiten epruvetat e Eppendorf 1,5 ml dhe i shënojmë.
3. Hidhet nga 1ml SSC 1x në çdo epruvetë.
4. Shtohen 400ml gjak.
5. Vorteksohet (përzihet) mirë 20sek.
6. Centrifugohet 3 min në shpejtësi maksimale (13000rrot\min në temperaturë ambjenti).
7. Hidhet supernatanti (SN) duke lënë pak në fund.
8. Lahet me 1ml SSC 1x (përzihet derisa precipitati të shkëputet nga fundi, centrifugohet 3 min në shpejtësi maksimale, hidhet gjithë SN).
9. Lahet me 1ml H₂O steril (përzihet derisa precipitati të shkëputet nga fundi dhe të tretet sa më mirë, centrifugohet 3 min në shpejtësi maksimale, hidhet i gjithë SN dhe lihet vetëm precipitati).
10. Shtohet 250 mikrolitër Chelex-100, 5%.
11. Përzihet mirë derisa precipitati të tretet.
12. Inkubohet në 56°C për 30min.
13. Vlohet për 8min.
14. Centrifugohet 3min në shpejtësi maksimale.
15. Merret SN dhe vendoset në epruveta të reja Eppendorf 1,5ml.



Figura. 2.4 Foto e mikrocentrifugës Eppendorf

2. **Metoda** e përdorur për dagnostikimin e sëmundjes së hemokromatozës është metoda PCR-RFLP.(Vandesompele J, et al 22,169:95, 2002) ^[41].

Amplifikimi i gjenit HFE me PCR

Rajonet e gjenit që përmbajnë mutacionet amplifikohen në termocikler PCR para se të bëhet analiza e RFLP. Për të gjitha produktet e PCR primerat krijohen të tillë që të përfshijnë një sit të një enzime të brendshme restriksioni për të kryer një kontroll për një copëtim të plotë të ADN-së. Reaksionet e PCR realizohen në tre temperatura denatyrimi, rinaturimi, sinteza, 95 Cx1min, 58 Cx1min, 72 Cx1min për rreth 35 cikle amplifikimi. Aparati i përdorur për PCR është paraqitur në Fig.2.5



Figura 2. 5 Foto e aparatit PCR, Termocikler ABI 9700

Kontrolli i produkteve të amplifikimit bëhet nëpërmjet elektroforezës në xhel agaroz të ADN-së. Në fig. 2. 6 është paraqitur një fotografi e xhelit të agarozit 2%, pas elektroforezës së ADN-së të amplifikuar.

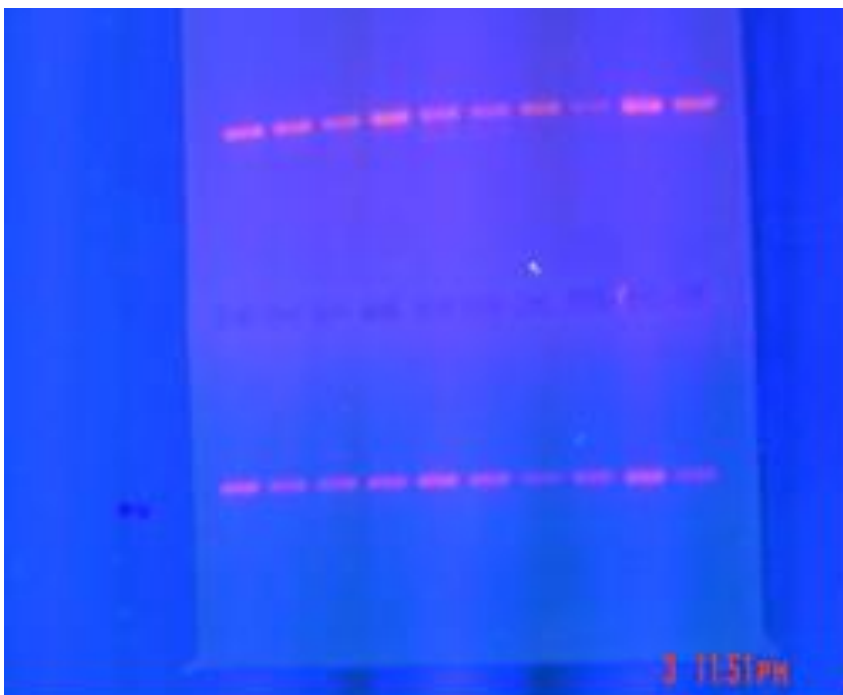


Figura 2. 6 Kontrolli i amplifikimit në xhel agaroz 2% i produkteve të PCR .

Primerat e përdorur për PCR

TTCC-3

Për amplifikimin e zonës ku ndodhet mutacioni C282Y përdoren primerat si më poshtë:

C282YF:5'- CAA GTG CCT CCT TIG GTG AAG GTG ACA CAT-3

C282YR:5'- CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC-3

Për amplifikimin e zonës ku ndodhet mutacioni H63D përdoren primerat si më poshtë:

H63DF:5'-ACA TGG TTA AGG CCT GTG GC-3°

H63DR:5'-CTI GCT GTG GTT GTG ATT

Analiza RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Enzimata e restriksionit që do të përdoren për të copëtuar 2 fragmentet e ADN-së së amplifikuar të gjenit HFE janë enzima **Rsal** (për mutacionin C282Y) dhe enzima **Mbol** (për mutacionin H63D).

Enzima Rsal është një enzimë blunt-end dhe ka si sekuenca njohëse bazat GT AC dhe pret midis bazave GT dhe AC.

Enzima Mbol është një enzimë sticky-end, ka sekuencat njohëse GATC dhe pret përpara bazave GATC.

Analiza e mutacionit C282Y nëpërmjet restriksionit

Mutacioni C282Y jep si rezultat zëvendësimin e cisteinës me tirozinën, dhe shkaktohet nga mutacioni i nukleotidit G në pozicionin 845 në A, pra (845 G>A).

Enzima Rsal ka si sekuenca njohëse bazat GT [AC dhe pret midis bazave GT dhe AC. Kur G është e zëvendësuar me A, enzima nuk njih sekuencën e saj njohëse, e cila nuk është më GTAC, por ATAC, prandaj nuk e pret fragmentin e amplifikuar të ADN-së.

Për mutacionin C282Y primerat japin një produkt prej 343 bp, si pjesë të ekzonit 4.

Pas copëtimit me enzimën RsaI fragmentet që kanë mutacionin rezultojnë me produktet prej 203, 111 dhe 29 bp dhe ato pa mutacion janë 203 dhe 140 bp.

Kur enzima RsaI nuk e copëton fragmentin në tre pjesë, pra kemi vetëm dy fragmente, me madhësi 203 dhe 140 bp, atëherë themi se kemi të bëjmë me mutacionin 845G>A, pra me mutacionin C282Y në gjendje homozigotë.

Nëse kemi tre fragmente, me madhësi 203, 111 dhe 29 bp, atëherë themi se kemi të bëjmë me formën normale wild type, me nukleotidin G në pozicionin 845, WT/WT.

Në rastin kur kemi praninë e katër fragmenteve, 203,140,111 dhe 29 kemi të bëjmë me individë heterozigotë për alelin C282Y/WT.

Analiza e mutacionit H63D nëpërmjet restriksionit

Mutacioni H63D jep si rezultat zëvendësimin e histidinës me ac.aspartik dhe shkaktohet nga mutacioni i nukleotidit C në pozicionin 187 në G, pra (187 C>G).

Për mutacionin H63D primerat japin një produkt prej 294 bp, si pjesë e ekzonit 2.

Enzima MboI ka sekuencat njohëse GATC dhe pret përpara bazave GATC. Mbas copëtimit me enzimën MboI, fragmentet që nuk kanë mutacionin, japin produktet prej 237 dhe 57 bp, ndërsa fragmentet që kanë mutacionin, mbartin një sekuence të re, GATC, në vend të sekuencës wild type, CATC.

Sekuensa e re copëtohet nga enzima MboI dhe përftohen tre fragmente restriksioni, me madhësi prej 138, 99 dhe 57 bp. Pra 237 bp copëtohet në dy fragmente, 138 bp dhe 99 bp. Këta individë janë homozigotë për mutacionin H63D/H63D.

Në rastin kur kemi të pranishëm në analizën elektroforetike katër fragmentet, 237,138, 99 dhe 57 kemi të bëjmë me individë heterozigotë për mutacionin H63D, pra kanë një alel normal dhe një të tipit H63D.

Kontrolli i produkteve të amplifikimit dhe copëtimit me enzima restriksioni është bërë nëpërmjet elektroforezës në xhel agarosi të ADN-së sipas modelit të paraqitur në literaturë (Merryweather Clarke AT, Pointon JJ, Shearman J D and Robson KJ,1997)^[24] si dhe të paraqitur skematikisht në Tabelën 2. 2

Tabela 2. 2 Tabela e identifikimit të individëve mbartës të mutacioneve të gjenit HFE

2.2.a Mutacioni H63D

Fragmentet e copëtuara	Homozigotët normalë WT/WT	Homozigotët H63D/H63D		Heterozigotët WT/H63D
237 bp			237 bp	
138 bp			138 bp	
99 bp			99 bp	
57 bp			57 bp	

2.2.b Mutacioni C282Y

Fragmentet e copëtuara	Homozigotët normalë WT/WT	Homozigotët C282Y/C282Y		Heterozigotët WT/C282Y
203 bp			203 bp	
140 bp			140 bp	
111 bp			111 bp	
29 bp			29 bp	

3. Elektroforeza në xhel agarosi e produkteve të PCR dhe RFLP. Përgatitja e xhelit të agarozit 2% për elektroforezën e ADN-së.

Solucioni tampon që përdoret është TBE (Tris-Borat-EDTA, Trizma base-Acid Borik dhe EDTA) sipas molariteteve të njohura nga literatura. Për përgatitjen e xhelit të agarozit 2% peshohen 2 gram agaroz dhe treten në 100 ml TBE. Ngrohen deri në shkrirjen e plote të agarozit.

Pas ftohjes në temperaturë ambiente të solucionit 2% të agarozit, hidhet një sasi ngjyruesi, Bromur Etidiumi, 50 g/ml dhe derdhet në formën e parapërgatitur në vaskën e elektroforezës. Kur xheli solidifikohet, ngrin, atëherë hiqen krehërat duke bërë të mundur

formimin e xhepave për ngarkimin e ADN-së. Vaska e elektroforezës mbushet me solucionin tampon TBE duke mbuluar tërësisht xhelin.

Kampionet e ADN-së që do analizohen përzjehen me një ngarkues-ngjyrues (Gel Loading Buffer) që shërben për ti futur ato në xhepat e xhelit dhe për të ndjekur zhvendosjen e bandave të ADN-së në xhel drejt polit pozitiv.

Elektroforeza kryhet në voltazh 100 volt, të prodhuar nga një ushqyes (power supply), përreth 30 minuta (varet nga fragmentet që do analizohen).

Pajisja e elektroforezës është paraqitur në figurën 2. 7. Pas përfundimit të elektroforezës, xheli merret me kujdes dhe vendoset në aparatin TRANSILUMINATOR me UV për të kontrolluar praninë dhe sasinë e ADN-së. Nën veprimin e rrezeve UV bromuri i Etidiumit i lidhur me ADN-në do të japë një ngjyrë vjollcë, prandaj bandat me ngjyrë vjollce na tregojnë praninë e ADN-së dhe mund të gjykojmë për sasinë e saj në varësi të intensitetit të ngjyrës. Gjatë kontrollit të ADN-së me elektroforezë vendoset në një nga xhepat e xhelit edhe një standart (marker) për përcaktimin e dimensioneve të fragmenteve të ADN-së së amplifikuar. Rezultatet e elektroforezës mund të dokumentohen nëpërmjet fotografimit.

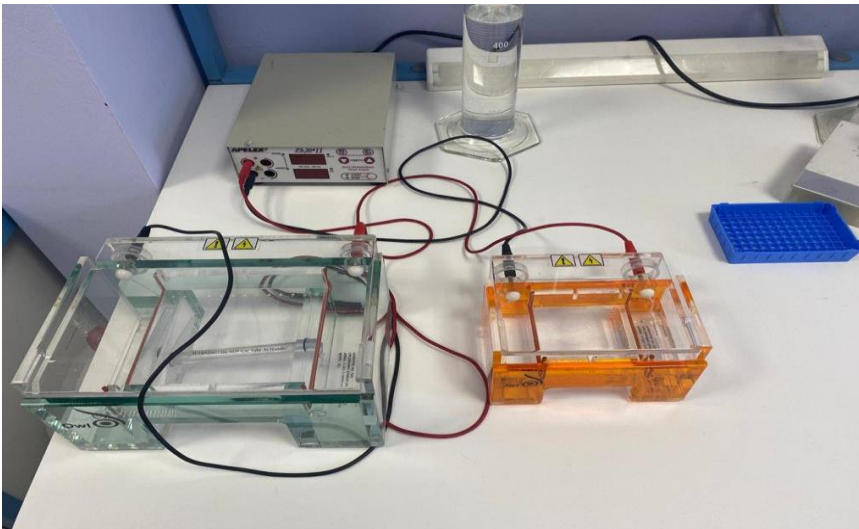


Figura 2. 7 Pajisja e elektroforezës në xhel agarozë.

Protokolli me metodën Strip Assay

Kjo metodë jep mundësinë e identifikimit të disa mutacioneve të gjenit HFE në një strip. Ky protokoll që përdoret për identifikimin e tre mutacioneve C282Y, H63D dhe S65C që shkaktajnë HK bazohet në një analizë hibridizimi në stripin e nitrocelulozës. Oligomerët që kanë sekuencat wild tip dhe sekuencat e mutacioneve për C282Y, H63D dhe S65C janë atakuar në stripin nitrocelulozë. (Vienna Lab) . Pas amplifikimit të mostrave të ADN-së me përzjerjen e primerit të afruar nga kitit, ne përdorëm ADN-në e amplifikuar për hibridizimin e stripeve, në mënyrë që të gjenim homologen me sekuencën e tipit wild ose sekuencën e mutacionit për tre mutacionet e njohura të hemokromatozës. Përshkrimi i protokollit të strip test është ofruar nga prodhuesi dhe ne e aplikuar saktësisht këtë protokoll. Aparati që u përdor për identifikimin e mutacioneve me metodën Strip Assay është Thermo-Shaker PST-60HL, që paraqitet në figurën e mëposhtme:



Fig.2.8 Foto e aparatit Thermo – Shaker PST – 60HL

Procedura e analizimit

Izolimi i ADN-së

Ekstraktimi i ADN-së është kryer duke përdorur dy metoda me kitin QIAGEN DNA extraction dhe kitin INVITROGEN DNA extraction. Përdorim gjak të freskët ose të ngrirë me EDTA ose me antikoagulant citrate duke mënjanuar përdorimin e gjakut që përmban heparinë.

Nuk e ruajmë gjakun për më shumë se 3 ditë në temperaturë dhome ose më shumë se një javë në 2-8°C përpara përdorimit. Gjaku i ngrirë për më shumë se 1 vit, ose që ka kaluar më shumë se 3 cikle ngrirje-shkrirje nuk mund të përdoret për këtë procedurë.

Fillimisht e lëmë gjakun në temperaturë dhome. Përziejme mirë tubat që e përmbajnë me kujdes disa herë. Përsërisim disa herë derisa të sigurojmë sasinë e gjakut të nevojitur. Vendosim Lysis Solution and GENxTRACT Resin në temperaturë dhome.

- Pipetojmë 1000 µl gjak në mikrotuba 1.5 ml me kapak.
- Shtojmë 1 ml Lysis Solution, mbyllim tubin dhe përziejme mirë.
- E lëmë të qëndrojë për 5 minuta në temperaturë dhome.
- Centrifugim për 5 minuta në 3000 rpm (përafërsisht 1.000 x g) në mikrocentrifugë.
- Largojmë nga pjesa e sipërme 1 ml të supernatantit.
- Shtojmë 1 ml Lysis Solution, mbyllim tubin dhe përziejme disa herë.
- Centrifugim për 5 minuta në 12.000 rpm (përafërsisht 12.000x g) në mikrocentrifugë.
- Largojmë supernatantin përveç 50 µl pellet të butë.
- Përziejme tërësisht shishen e GENxTRACT™ Resin.
- Shtojmë 200µl GENxTRACT™ Resin të pellet.
- Mbyllim tubin dhe vendosim në vortex për 10 sekonda.
- Inkubim për 20 minuta në 56°C. Vortex për 10 sekonda.
- Inkubim për 10 minuta në 98°C. Vortex për 10 sekonda.
- Centrifugë për 5 minuta në 12.000 rpm në mikrocentrifugë. Ftohja në akull.

Supernatanti përmban ADN template të përshtatshme për tu përdorur menjëherë në PCR. Për tu ruajtur më tej, supernatanti duhet të transferohet në tuba të tjerë dhe të rivendoset në frigorifer (2-8 °C, deri në një javë apo të ngrihet në -20 °C)

Amplifikimi In Vitro (PCR)

Të gjithë reagentët e PCR dhe ADN template duhen mbajtur në frigorifer. Kryejmë të gjithë hapat në akull deri në fillimin e programit të ciklit termal (0-4 °C).

- Përgatim një hollim (0.2 U/μl) të **Taq DNA polymerase** në Taq Dilution Buffer (cap transparente)
- Përgatim një tub për secilën mostër që do të amplifikohet. Vendosim në akull.
- Për secilën mostër përgatim mix final të reaksionit PCR në akull :

15 μl Amplification Mix (cap i verdhë)

5 μl Taq DNA polymerase (1U) të holluar

5 μl DNA template

Nëse përdoret ADN template e cila nuk është përgatitur sipas protokollit të kirit rekomandohet një përqëndrim i ADN-së mes 2-20 ng/μl (= 10-100 ng DNA për reaksion).

- **Mbyllim tubat me kapak. Vendosim termociklin në temperaturë 94°C.**
- **Vendosim tubat e reaksionit dhe ndjekim programin:**

Pre-PCR: 94°C/2 min.

Thermocycling: 94°C/15 sec. - 58°C/30 sec. - 72°C/30 sec. (35 cycles)

Final extension: 72°C/3 min.

Ruajmë produktet e amplifikuara në akull në temperaturë 2-8°C për përdorim të mëvonshëm.

Në disa raste kemi matur produktet e amplifikimit në xhel (psh. 3% xhel agarozë).
Gjatësia e fragmenteve: 118, 169, 183, 201, 247, 287, 310, 347 bp.

Hibridizimi (45°C; tundja në banjomari)

Përshtatim nivelin e ujit në banjomari për afërsisht sa gjysma e lartësisë së Typing Tray.

Ngrohim banjomarinë në temperaturë 45 °C (± 0.5°C). Kontrollojmë temperaturën e ujit me një termometër të kalibruar.

Parangrohim bufferin e hibridizimit dhe solucionin larës në 45°C.

Vendosim në temperaturë dhome Teststrips, DNAT, Conjugate Solution, wash Solution B dhe Color Developer. Përgatim Typing Tray.

Me anë të një piskatore largojmë Teststript në secilën mostër (duhet të largohen duke patur të veshura dorashka me patjetër). Etiketojmë shiritat jashtë vijave të shënjesit me laps.

- Pipetojmë 10 µl DNAT (cap blu) në pjesën më të ulët që do të përdoret në Typing Trays (një anë për secilën mostër).
- Shtojmë 10 µl të produktit të amplifikuar në vendet korresponduese të DNAT. Përziejmë me anë të një pipete (Solucioni do të vazhdojë të jetë ngjyrë blu).
- E lëmë të qëndrojë në temperaturë dhome për 5 minuta.
- Shtojmë 1 ml **Hybridization Buffer** (e parangrohur në 45 °C) në secilin vend. Trazojmë me kujdes, (Ngjyra blu do të zhduket).
- Vendosim **Teststrips** të shënuara nga lart.
- Inkubojmë për **30 min.** në **45°C** në platformën që tundet në banjomari.
- Në fund të inkubimit largojmë solucionet e hibridizimit me anë të aspirimit me vakum.

Larja (45°C; tundje në banjomari)

- Shtojmë 1 ml **Wash Solution A** (parangrohur në 45°C). Shpëlarje e shpejtë (10 sec.). Largojmë lëngjet me anë të aspirimit me vakum.
- Shtojmë **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubojmë në **15 min** në **45°C** në banjomari që tundet. Largojmë lëngjet me anë të aspirimit me vakum.
- Shtojmë **1 ml Wash Solution A** (45°C).
- Inkubojmë për **15 min.** në **45°C** në banjomarinë që tundet. Largojmë lëngjet me anë të aspirimit me vakum.

Ndryshimet e ngjyrës (temperaturë dhome)

- Shtojmë **1 ml Conjugate Solution.**
- Inkubojmë për **15 minuta** në temperaturë dhome në një tundës. Largojmë lëngjet përmes aspirimit me vakum.
- Shtojmë **1 ml Wash Solution B.** Shpëllajmë për 10 sekonda. Largojmë lëngjet përmes aspirimit me vakum.
- Shtojmë **1 ml Wash Solution B.**

- Inkubojmë për **5 minuta** në temperaturë dhome në një tundës. Largojmë lëngjet përmes aspirimit me vakum.
- Shtojmë **1 ml Wash Solution B**.
- Inkubojmë për **5 minuta** në temperaturë dhome në një tundës. Largojmë lëngjet përmes aspirimit me vakum.
- Shtojmë **1 ml Color Developer**.
- Inkubojmë në temperaturë dhome për 15 minuta në errësirë në një tundës. Do të shfaqet ngjyra lejla nëse reaksioni është pozitiv.
- Lajmë teststrips disa herë me ujë të distiluar. Lejojmë striptet të thahen në errësirë të mbuluar me letër.

Interpretimet e rezultateve

Gjenotipi i mostrave përcaktohet duke përdorur letra të CollectorTM. Vendosim Teststrips në vendet e caktuara duke i shënuar me ngjyrë të kuqe në pjesën e sipërme dhe ngjyrë jeshile në pjesën e poshtme, i fiksojmë ato me adeziv.

Një vlerë pozitiv i vijës së sipërme të kontrollit tregon funksionimin e saktë të Conjugate Solution dhe Color Developer. Kjo vijë duhet të jetë gjithmonë pozitive.

Për secilin reaksion polimorfik, duhet të merret njëri nga modelet e ngjyrosura.

Shënim: *Intensiteti i ngjyrimit pozitiv mund të variojë. Kjo nuk tregon rezultat domëthënës.*

	Wild type line	mutant line	genotype
NOR	Positive	negative	normal
HET	Positive	positive	heterozigotë
HOM	Negative	positive	homozigotë mutant

Disa nga mutacionet të kryera me Haemochromatosis StripAssay A ® janë të lokalizuara në brendësi të nukleotideve në gjenet e tyre respektive. Në Teststrips këto janë të paraqitura me anë të një probe/sonde, kështu që 18 mutacione mbulohen vetëm nga 13 sonda.

line	Wild type probe	mutation
19	HFE: codon 53	HFE: V53M
20	HFE: codon 59	HFE: V59M
21	HFE: codon 63 to 65	HFE: H63D; H63H, S65C
22	HFE: codon 127	HFE: Q127H
23	HFE: codon 160	HFE: P160delC
24	HFE: codon 168 to 169	HFE: E168Q, E168X, E169X
25	HFE: codon 282 to 283	HFE: C282Y, Q283P
26	TFR2: codon 60	TFR2: E60X
27	TFR2: codon 172	TFR2: M172K
28	TFR2: codon 250	TFR2: Y250X
29	TFR2: codon 594 to 597	TFR2: AVAQ594-597del
30	FPN1: codon 144	FPN1: N144H
31	FPN1: codon 162	FPN1: V162del

Mostrat që janë heterozigotë për dy nga këto mutacione (psh. H63D + S65C, C282Y + Q283P) do të kenë mungesë të sinjalit të tyre.

Për tu marrë në konsideratë

- Procedura duhet kuptuar mirë, laboratorit duhet të ketë pajisjet dhe teknikat e duhura në mënyrë që rezultatet të jenë të besueshme. Përdorimi i StripAssay për diagnozat humane in vitro kërkon staf të mirëtrajnuar.
- Mos përdorimi i komponentëve të StripAssay pas datës së skadimit.
- Shmangia e kontaminimit mikrobik apo dhe atë të kryqëzuar të reagentëve apo dhe mostrave duke përdorur pipeta sterile.
- Vija e kontrollit në secilin Teststript lejon një kontroll të sistemit të dedektimit kromogjen. Për të monitoruar dhe vërtetuar specifikën e hibridizimit dhe hapat e largjes duhet të përfshihet ADN e secilit gjenotip në eksperiment.

4. Metodatat e përdorura për llogaritjen e frekuencës së gjenotipeve dhe të aleleve C282Y dhe H63D.

Llogaritja e frekuencave të aleleve në studim mbasi kemi gjetur gjenotipet e individëve të analizuar është bërë sipas formulave standarte të mirënjohura të gjenetikës së popullatave. Frekuenca për një alel është përcaktuar si raport midis numrit të aleleve të një tipi dhe numrit total të aleleve.

Përcaktimi i gjenotipeve dhe llogaritja e frekuencës së aleleve

Gjenotipet u përcaktuan si më sipër për çdo individ të analizuar. U përcaktuan gjendja homozigotë ose heterozigotë e individëve të ndryshëm.

Mbi bazën e gjenotipeve të individëve u llogarit frekuenca e aleleve të pranishëm sipas formulave të njohura të gjenetikës së popullatave.

$$\text{Freg alelit} = \frac{\text{numri i gjenotipeve homozigotë} \times 2 + \text{numri i gjenotipeve heterozigotë}}{\text{numrin e individëve} \times 2}$$

METODAT E IDENTIFIKIMIT TE MUTACIONEVE

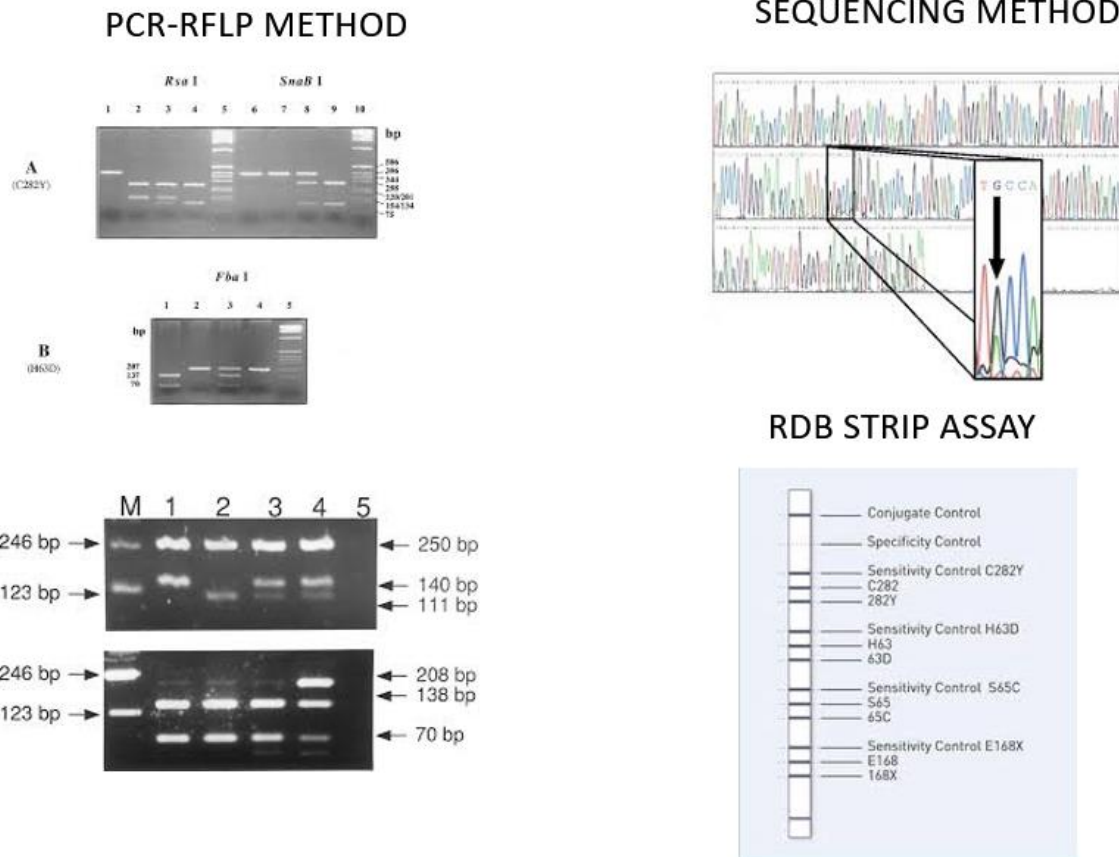


Figura 2.9. Metodatat e përdorura për identifikimin e mutacioneve të gjenit HFE

Bazuar në profilin elektroforetik pas copëtimit me enzima restriksioni, të sqaruar me hollësi në metodatat e përdorura, për secilin nga mutacionet veç e veç, u përcaktuan gjenotipet individuale.

Analiza e mutacionit C282Y

U amplifikuan ADN-të e 50 individëve sipas protokollit të PCR të përshkruar në metodatat e përdorura në këtë studim, me primerat specifike. Për mutacionin **C282Y** primerat japin një produkt prej 343 bp, si pjesë të ekzonit 4. Të gjithë individët dhanë një produkt amplifikimi prej rreth 343 bp, që rezultoi i tillë pas analizës me elektroforezë.

Pas purifikimit të produktit të PCR, 5 ug ADN ju nënshtuan copëtimimit me 10 unita të enzimës Rsal, sipas protokollit të përcaktuar nga prodhuesit. Reaksioni u inkubua në temperaturën 37°C, për një periudhë kohore prej rreth 12 orë (over night), në banjo mari (bloch heater). Produktet e copëtimimit me Rsal ju nënshtuan elektroforezës në xhel për të përfutuar profilet e fragmenteve të restriksionit. Në bazë të tyre u përcaktuan gjenotipet e individëve për mutacionin C282Y.

Mutacioni C282Y jep si rezultat zëvendësimin e cisteinës me tirozinën, dhe shkaktohet nga mutacioni i nukleotidit G në pozicionin 845 në A, pra (845 G>A). Enzima Rsal ka si sequenca njohëse bazat GT AC dhe pret midis bazave GT dhe AC. Kur G është e zëvendësuar me A, enzima nuk njih sequencën e saj njohëse, e cila nuk është më GT AC, por ATAC, prandaj nuk e pret fragmentin e amplifikuar të ADN-së.

Kur enzima Rsal nuk e copëton fragmentin në tre pjesë, pra kemi vetëm dy fragmente, me madhësi 203 dhe 140 bp, atëherë themi se kemi të bëjmë me mutacionin 845 G>A(C282Y) në gjendje homozigote. Nuk u identifikua asnjë profil elektroforetik i tillë me dy banda, prandaj themi se nuk kemi gjetur asnjë individ homozigotë C282Y / C282Y, pra të sëmurë me hemokromatozë.

Nëse kemi tre fragmente me madhësi 203, 111 dhe 29 bp, atëherë themi se kemi të bëjmë me formën normale wild type, me nukleotidin G në pozicionin 845, pra me individë normal homozigotë. Nga 50 individët e analizuar u identifikuan 40 individë me një profil të tillë me tre banda, pra 40 individë normal WT/WT.

Në rastin kur kemi praninë e katër fragmenteve, 203, 140, 111 dhe 29 kemi të bëjmë me individë heterozigotë për alelin C282Y dhe alelin normal WT. U identifikuan tre individë me këtë profil elektroforetik, C282Y/WT.

Analiza e mutacionit H63D

U amplifikuan ADN-të e 50 individëve sipas protokollit të PCR të përshkruar në metodat e përdorura në këtë studim, me primerat specifike. Për mutacionin H63D primerat japin një produkt prej 294 bp, si pjesë të ekzonit 2. Të gjithë individët dhanë një produkt amplifikimi prej rreth 294 bp, që rezultoi i tillë pas analizës me elektroforezë.

Pas purifikimit të produktit të PCR, 5 ug ADN ju nënshtuan copëtimimit me 10 unita të enzimës Mbol, sipas protokollit të përcaktuar nga prodhuesit. Reaksioni u inkubua në temperaturën 37°C, për një periudhë kohore prej rreth 12 orë (over night), në banjo mari

(bloch heater). Produktet e copëtimit me Mbol ju nënshtruan elektroforezës në xhel për të përftuar profilet e fragmenteve të restriksionit. Në bazë të tyre u përcaktuan gjenotipet e individëve për mutacionin H63D.

Mutacioni H63D jep si rezultat zëvendësimin e histidinës me ac.aspartik dhe shkaktohet nga mutacioni i nukleotidit C në pozicionin 187 në G, pra (187 C>G). Enzima Mbol ka sekuencat njohëse GATC dhe pret përpara bazave GATC.

Pas copëtimit me enzimën Mbol, fragmentet që nuk kanë mutacionin, japin produktet prej 237 dhe 57 bp. U identifikuan 40 individë me këtë profil elektroforetik me dy banda, pra WT/WT.

Fragmentet që kanë mutacionin, mbartin një sekuence të re, GATC, në vend të sekuencës wild type, CATC. Sekuenca e re copëtohet nga enzima Mbo1 dhe përftohen tre fragmente restriksioni, me madhësi prej 138, 99 dhe 57 bp. Pra 237 bp copëtohet në dy fragmente, 138 bp dhe 99 bp. Këta individë janë homozigotë për mutacionin H63D dhe të tillë u identifikuan 1 individë H63D/H63D.

Në rastin kur kemi të pranishëm në analizën elektroforetike katër fragmentet, 237, 138, 99 dhe 57 kemi të bëjmë me individë heterozigotë për mutacionin H63D, pra kanë një alel normal WT dhe një të tipit H63D. U identifikuan 5 individë me një profil elektroforetik të tillë, WT/H63D.

Nga ky studim ne përcaktuam mutacionet C282Y dhe H63D, dhe përkatësisht frekuencën e mbartësve heterozigotë të mutacionit të gjenit HFE në 50 individë të shëndetshëm të zgjedhur rastësisht në popullatën shqiptare. Duke u bazuar në gjenotipet dhe në formulën e njohur gjenetike për popullatat ne identifikuam frekuencën e aleleve C282Y dhe H63D. Frekuenca e aleleve C282Y është 3% dhe frekuenca e aleleve H63D është 10%.

2.5 Metodologjia e analizës statistikore

Analiza e të dhënave është kryer me anë të paketës statistikore SPSS 20.0. Për të testuar shpërndarjen e variablave të vazhduar është përdorur testi Kolmogorov-Smirnov.

Është paraqitur statistika deskriptive e variablave të vazhduar të cilët janë përmbledhur si mesatare \pm deviacion standard (SD).

Variablat kategorike janë paraqitur si frekuencë absolute dhe përqindje. Është përdorur testi hi-katror dhe Fisher's exact test për krahasimin e proporcioneve ndërmjet variablave kategorike.

Sinjifikanca statistikore është përcaktuar për $p \leq 0.05$. Testet statistikore janë të dyanshme.

III REZULTATE

Tabela 3. 1 Karakteristikat demografike të pacientëve

Variablat	N	%	P
Gjinia			<0.01
Femra	13	14.4	
Meshkuj	77	85.6	
Mosha, M (SD)	55.5 (\pm 10.2)	30-74	
Grupmosha			<0.01
<40	8	8.9	
40-60	51	56.7	
>60	31	34.4	
Diagnoza			
Cirrhosis	58	64.4	<0.01
Steatosis	32	35.6	

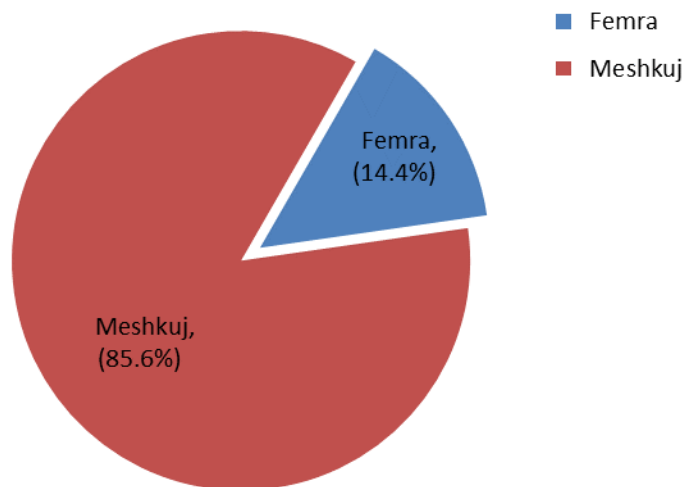


Figura 3. 1 Shpërndarja e rasteve sipas gjinisë

Në studim krahas grupit të individëve të shëndetshëm morën pjesë 90 pacientë nga të cilët 77 (85.6%) meshkuj dhe 13 (14.4%) femra, me moshë mesatare 55.5 (± 10.2) vjeç që varion nga 30-74 vjeç.

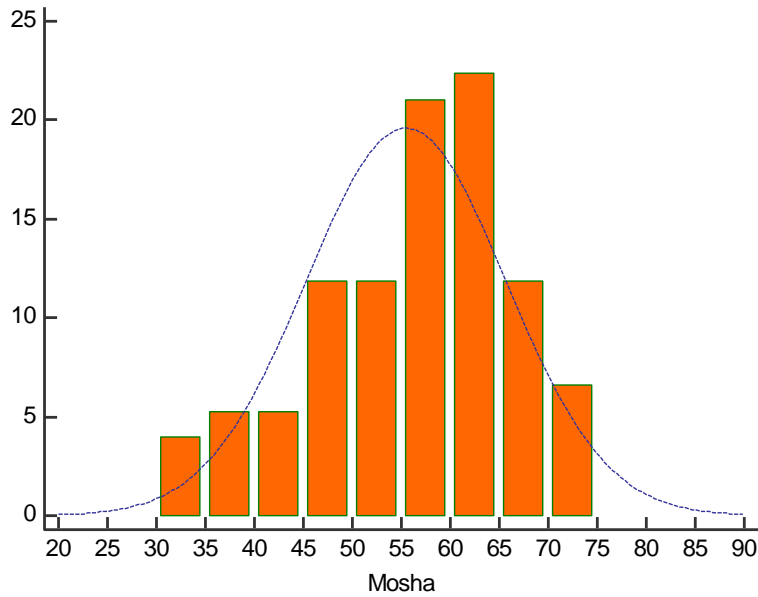


Figura 3. 2 Histogrami i moshës së pacientëve

Moshë nuk i nënshtrohet shpërndarjes normale (Kolmogorov-smirnov $p < 0.01$)

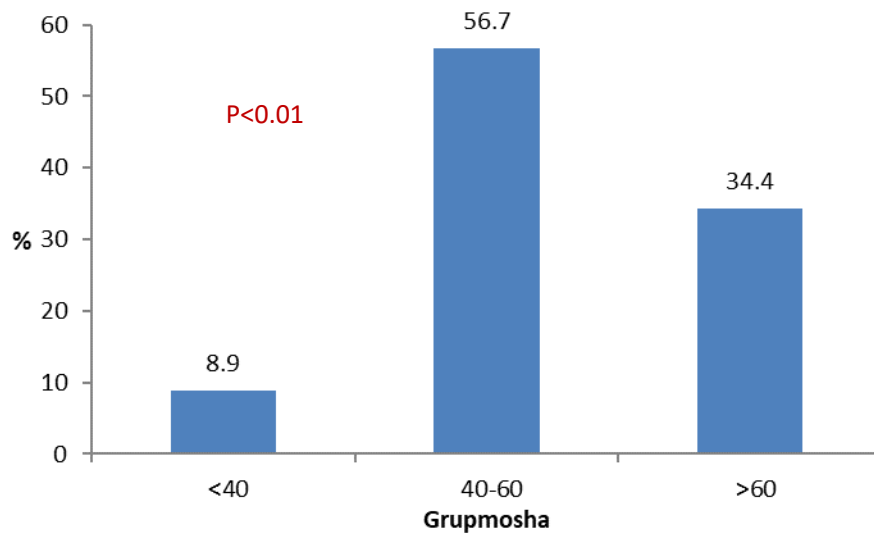


Figura 3. 3 Shpërndarja e rasteve sipas grupmoshës

Mbizotërojnë pacientët në grupmoshën 40-60 vjeç me 56.7% të totalit, ndjekur nga 34.4% në grupmoshën >60 vjeç, ndërsa vetëm 8.9% e tyre janë në grupmoshën <40 vjeç (p<0.01).

Tabela 3. 2 Vlerat mesatare të ferritinës, sideremisë dhe transferrinës së saturuar

Variablat	Mean	SD	Min	Median	Max
Ferritin	365.1	444.2	14.0	159.0	1720.0
Sideremi	110.3	65.3	12.0	95.0	375.0
Transf._e_saturuara	38.9	30.6	6.70	35.0	192.0

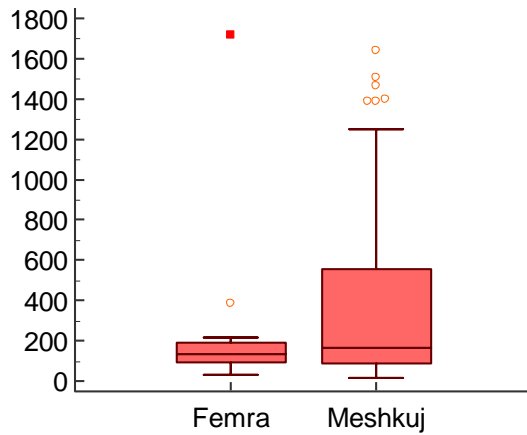


Figura 3. 4 Krahasimi i vlerave mesatare të ferritinës sipas gjinisë

Vlerat mesatare të Ferritinës tek femrat janë 267.0 (± 44.8) ndërsa tek meshkujt 381.7 (± 44.4), pa ndryshim sinjifikant ndërmjet tyre (p=0.3).

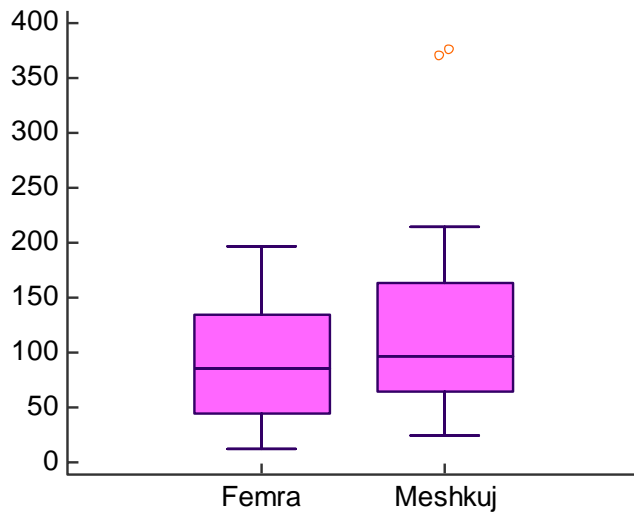


Figura 3. 5 Krahasimi i vlerave mesatare të sideremisë sipas gjinisë

Vlerat mesatare të sideremisë tek femrat janë 92.7 (± 44.8) ndërsa tek meshkujt 113.3 (± 66.8), pa ndryshim sinjifikant ndërmjet tyre ($p=0.3$).

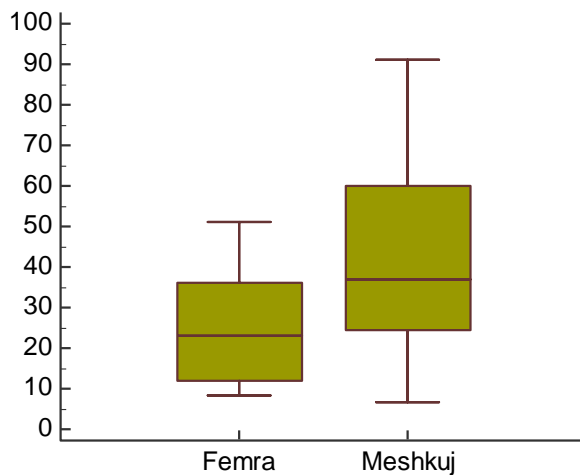


Figura 3. 6 Krahasimi i vlerave mesatare të transferrinës së saturuar sipas gjinisë

Vlerat mesatare të transferrinës së saturuar tek femrat janë 27.3 (± 13.8) ndërsa tek meshkujt 41.0 (± 32.4), pa ndryshim sinjifikant ndërmjet tyre ($p=0.1$).

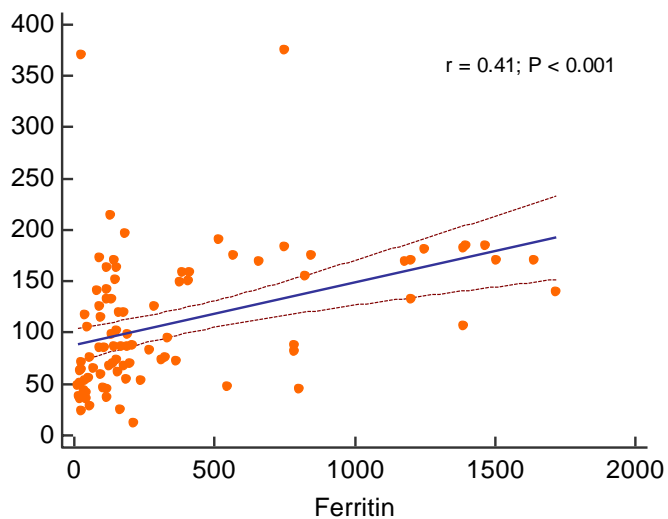


Figura 3. 7 Korrelacioni i ferritinës me sidereminë

U gjet korrelacion sinjifikant i vlerave të ferritinës dhe sideremisë. Me rritjen e vlerave të ferritinës rriten edhe vlerat e sideremisë ($p < 0.01$).

Tabela 3. 3 Vlerat mesatare të ferritinës, sideremisë dhe transferrinës së saturuar sipas grupmoshës

Variablat	<40		40-60		>60		P
	M	SD	M	SD	M	SD	
Ferritin	373.6	494.5	338.2	435.3	320.1	368.4	0.9
Sideremi	102.1	45.0	114.2	64.1	109.8	74.3	0.7
TS	35.7	13.5	40.5	30.4	37.0	36.1	0.8

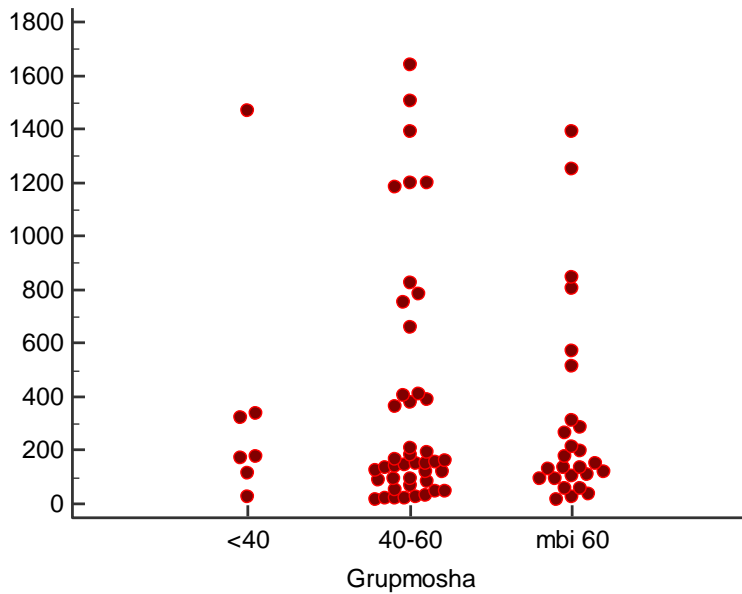


Figura 3. 8 Krahasimi i vlerave mesatare të ferritinës sipas grupmoshës

Nuk u gjet ndryshim sinjifikant i vlerave mesatare të ferritinës sipas grupmoshës (p=0.9).

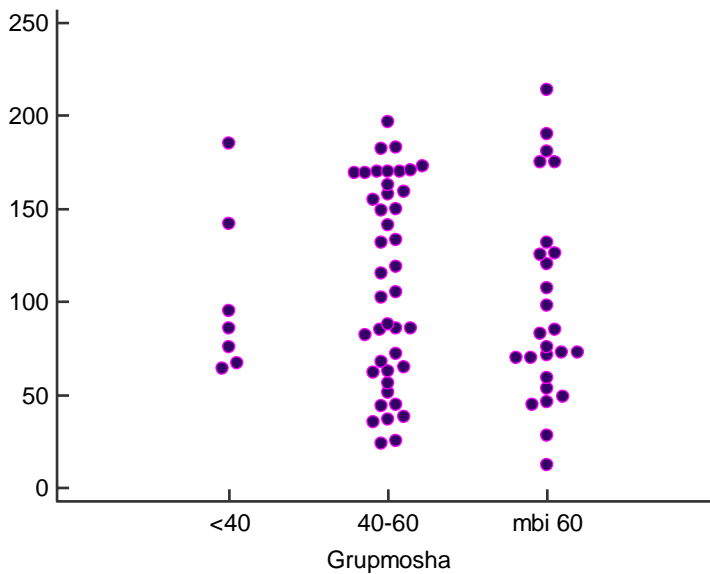


Figura 3. 9 Krahasimi i vlerave mesatare të sideremisë sipas grupmoshës

Nuk u gjet ndryshim sinjifikant i vlerave mesatare të sideremisë sipas grupmoshës (p=0.7).

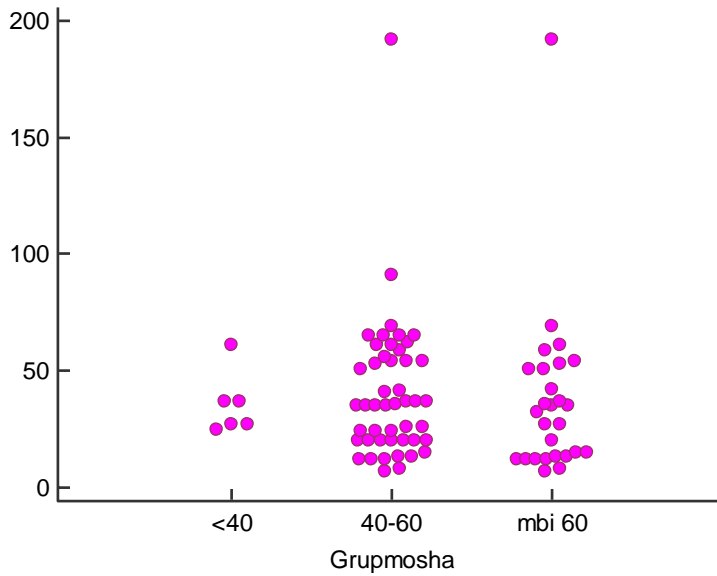


Figura 3. 10 Krahasimi i vlerave mesatare të transferrinës së saturuar sipas grupmoshës

Nuk u gjet ndryshim sinjifikant i vlerave mesatare të transferrinës së saturuar sipas grupmoshës ($p=0.7$).

Fillimisht u analizuan 50 individë të shëndetshëm dhe u gjetën gjenotipet përkatëse për alelet C282Y, H63D dhe për alelin wild type të gjenit HFE. Rezultatet janë paraqitur të përmbledhura në tabelën e mëposhtme:

Tabela 3. 4 Frekuenca e gjenotipeve tek personat e shëndetshëm (n=50)

C282Y/ C282Y	C282Y/ WT	C282Y/ H63D	H63D/H63D	WT/WT	WT/H63D
-	3 (6.0)	1 (2.0)	1 (2.0)	40 (80.0)	5 (10.0)

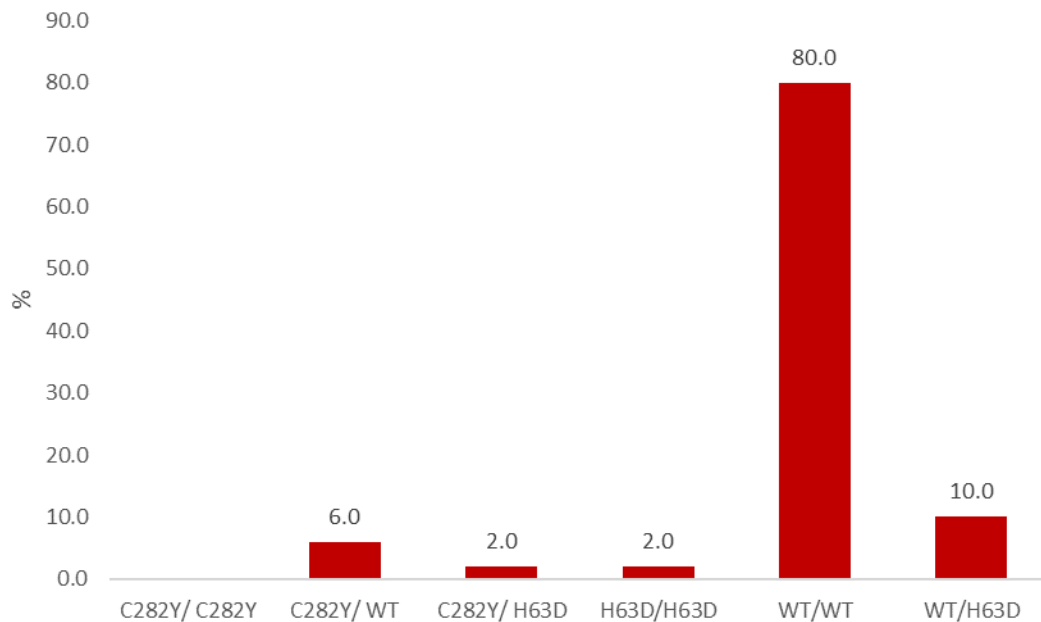


Figura 3. 11 Frekuenca e gjenotipeve tek personat e shëndetshëm

Nuk u identifikuan individë me gjenotip homozigotë C282Y/C282Y, u gjetën vetëm 3 (6%) individë heterozigotë për mutacionin C282Y, C282Y/WT, 1 (2%) individë heterozigotë të përbërë për të dy mutacionet, C282Y/H63D, 1 (2%) individë homozigotë për mutacionin H63D/H63D dhe 5 (10%) individë heterozigotë për mutacionin H63D/WT. Të tjerët, 40 (80%) individë rezultuan normal, me gjenotip WT/WT.

Mbi bazën e gjenotipeve përkatëse dhe formulave të njohura të gjenetikës së popullatave të përshkruara tek metodat u përcaktua frekuenca e aleleve C282Y dhe H63D në kampionin e marrë në studim.

Për alelin C282Y kemi 2 heterozigotë C282Y x 1 + 1 heterozigotë C282Y/H63D = 3 alele C282Y/50 x 2 = 100 alele, pra një frekuencë prej 3%.

Për alelin H63D kemi 1 homozigotë H63D/H63D x 2 + 5 heterozigotë WT/H63D x 1 + 1 heterozigotë C282Y/H63D = 10 alele H63D/50 x 2 = 100 alele, pra një frekuencë prej 10%.

Pra frekuenca e alelit C282Y rezultoi 3%, ndërsa frekuenca e alelit H63D rezultoi 10% në një kampion prej 50 individësh të popullatës shqiptare të shëndetshme të marrë në studim.

Nuk u gjet asnjë individ i sëmurë me hemokromatozë, pra një individ me gjenotip C282Y/C282Y. Me një frekuencë të alelit C282Y prej 3% do të prisnim një frekuencë të gjenotipeve homozigotë prej $0,03 \times 0,03 = 0,0009$ ose 0,09%, pra afër 1/1000. Pra nëse do të analizonim 1000 individë mund të gjenim një individ homozigotë për mutacionin

C282Y. Nga kampioni ynë prej 50 individësh nuk mundëm të gjejmë asnjë individ homozigotë për këtë mutacion.

Frekuencat e dy aleleve, C282Y (3%) dhe H63D (10%) të gjenit HFE përgjegjës për hemokromatozën janë një rezultat i parë.

Me frekuencat e gjetura për dy mutacionet del se frekuenca e mbartësve në popullatë mund të jetë 5,3% (2pq, pra $2 \times 0,03 \times 0,87$) për alelin C282Y dhe rreth 17,4% për mutacionin H63D ($2 \times 0,10 \times 0,87$). Këto frekuenca të mbartësve janë paraprake dhe rrjedhin nga frekuencat e dy mutacioneve të gjetura, por që mund të ndryshojnë me rritjen e numrit të individëve të analizuar.

Është më e vështirë të gjenden alelet e hemokromatozës në gjendje homozigotë në një grup të kufizuar individësh normalë, prandaj ne do të vazhdojmë edhe me analizën e një grupi të pacientëve që paraqesin nivel të lartë të hekurit në gjak.

Më pas studimi vazhdoi me 20 pacientët e hospitalizuar në Klinikën e Gastrohepatologjisë në QSUT. Ata u analizuan për parametrat e mbingarkesës së hekurit dhe ferritinës. Nga këta pacientë 4/20 pra 20% e tyre kanë të rritur Ferr dhe Fe. FERR>1200ng/ml dhe Fe nga 171-214mg/dl. 12/20 ose 60% nga pacientët që u analizuan kanë të rritur ferritinën nga 151-1200 ng/ml. 6/20 ose 30% e pacientëve paraqitën rritje të hekurit 171-214mg/dl. Manifestimet klinike që shfaqën pacientët janë cirroza dhe steatoza.

Ne jemi të interesuar të identifikojmë prezencën e mutacioneve të gjenit HFE dhe korrelacionin me FERR dhe mbingarkesën me Fe tek pacientët me cirrozë dhe sëmundje të tjera të heparit.(Adams et al. 2007).^[57]U identifikuan rreth 10 pacientë me rritje të nivelit të FERR (nga 151- 1200ng/ml). Ky do jetë dhe grupi i parë që do analizohet për testin e gjenit HFE. Nga studimet e mëparshme niveli i ferritinës në rastet e dyshuara për HK është përcaktuar në vlerat 151 për femrat dhe 300 për pacientët meshkuj. (Neghina et al.2009).^[40] Ne vendosëm të analizojmë të gjithë pacientët me vlerën e FERR mbi 151ng/ml. Nuk është identifikuar ndonjë diferencë në nivelin e ferritinës midis pacientëve me cirrozë dhe steatozë.

Ne përdorëm protokollin e ri me strip test për identifikimin e tre mutacioneve më frekvente që shkaktojnë hemokromatozën C282Y, H63D dhe S65C. Nga 20 pacientët u selektuan 10 pacientë me nivel të lartë të hekurit dhe ferritinës të shtruar në Shërbimin e Gastrohepatologjisë që vuajnë nga sëmundjet e mëlçisë, sepse këta mund të kenë probabilitet të jenë të sëmure me HT. (Pedersen et al. 2008]; de Diego et al, 2004: Lee SH, et al 2009).^{[28],[34],[38]}. Të gjitha analizat e pacientëve paraqitën tipin wild normal, përveç analizës të pacientit 8, që shfaqti genotipin heterozigotë për mutacionin e rrallë S65C.

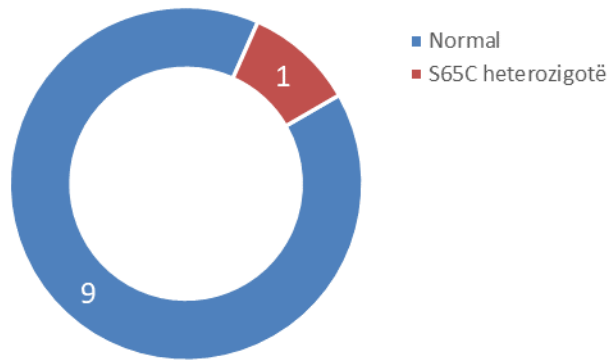


Figura 3. 12 Frekuenca e gjenotipeve tek 10 pacientët me mbingarkesë të Fe dhe FERR

U aplikua me sukses protokollin e ri. U mor më tepër informacion për pacientin duke parë kartelën klinike të tij. Pacienti është diagnostikuar me hepatit toksik medikamentoz.

Nr. Kartele
682492

KARTELE KLINIKE

Emri _____ Mbiemri _____
 Atësia _____ Mëmësia Sheqere
 Gjinia M Datëlindja 12-02-1940
 Vendlindja Dugres Vendbanimi Las (Adriatik)

Dokumenti identifikues Libroz shendete 164206 Nr E002120257
 Profesion Pensionist Punëdhënësi _____

I siguruar PO JO Nr. i siguracionit _____ Datë _____
 Organi që e ka lëshuar _____

Grupi i invaliditetit nëse ka: I plotë I pjesëshëm
 Data e shtrimit 05.06.2013 Ora 16³⁰

Shttrim urgjent PO JO Shttrim i planifikuar PO JO

Nëse është i transferuar nga vjen _____

Diagnoza e shtrimit (dërgimit) Hepati i kronik me shfaqje formale

Rishtrim brenda 24 orëve _____

Dr. JOVAN BASHO
 OSUT Hepato
 Gastroenterologj

Mjeku që ka urdhëruar shtrimin
 J. Basho
 Emri, mbiemri, nënshkrimi

Unë i nënshkruari _____ i ndëgjegjeshëm për sëmundjen time, mbasi më është shpjeguar gjendja ime shëndetësore nga mjeku, jam i gatshëm të marr përsipër rreziqet ose pasojat që rrjedhin nga nderhyrja kirurgjikale dhe ekzaminimet invazive që më propozohet

(_____)
 Emri, mbiemri, nënshkrimi

Personi i interesuar Perparim Tema (biri) Tel: 0686771

Figura 3. 13 Kartela klinike e pacientit

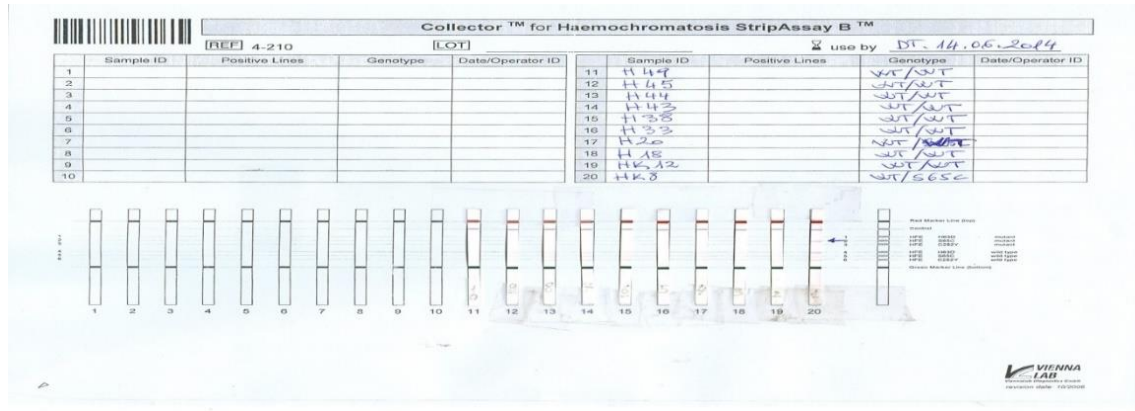


Figura 3.14 Stripi i hibridizuar dhe i koloruar i pacientit.

Në figurën e mësipërme 3.14 tregohet në foto stripi i hibridizuar dhe i koloruar i pacientit. Prezenca e bandës së koloruar në pozicionin e mutacionit S65C dhe e bandës me intensitet të ulur të tipit wild në pozicionin e këtij pacienti tregon që është genotipi heterozigotë.

Në vazhdim të studimit u analizuan 50 pacientë të tjerë që vuajnë nga sëmundje të heparit për parametrat biokimik të hekurit (Fe), ferritinës (FERR) dhe të transferrinës së saturuar (TS). Rezultatet që u morën janë 13 pacientë me TS>50% (51-92%). Vetëm 6 pacientë me TS>50% kanë nivelin e FERR > 300ng/ml dhe Fe më të ulët se 200mg/dl (158-182). 7 pacientë të tjerë kanë nivelin e FERR<200ng/ml dhe Fe<183mg/dl.

Këta parametra nuk tregojnë për pacientët me HK tipike por, mund të jenë indikator biokimik për zbulimin e hershëm të sëmundjes. Proçedimi me testin e gjenit HFE vendos diagnozën e hemokromatozës hereditare. Fillimisht u proçedua gjenetikisht me pacientët me TS> 50% duke përdorur strip test protokoll (Vienna lab). Dhe më pas vazhdoi testimi gjenetik dhe për pacientët e tjerë. Nga testimi i gjenit HFE për mutacionet C282Y, H63D dhe S65C u gjetën : 17 pacientë C282Y/WT heterozigotë, 2 pacientë H63D/WT heterozigotë bartës për mutacionin e gjenit H63D dhe 13 heterozigotë të përbërë C282Y/H63D. Mutacioni i gjenit S65C nuk u konstatua në asnjë pacient. Këta pacientë që janë bartës të mutacioneve kanë parametra të ndryshëm të TS, FERR dhe hekurit. U vu re një rritje e TS tek këta pacientë.

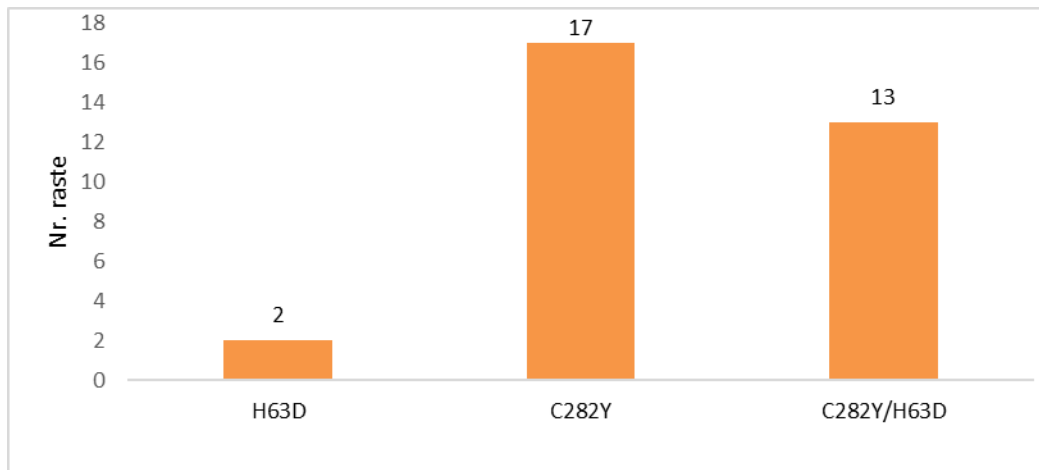


Fig. 3. 15 Mutacionet në grupin e 50 pacientëve

Në 20 pacientë të tjerë që u morën në studim në vazhdim, të hospitalizuar me sëmundje të mëlçisë kryesisht cirrozë që u analizuan për nivelin e hekurit, ferritinës dhe transferrinës së saturuar në serum u analizuan njëkohësisht dhe për testin e gjenit HFE. Në 10 pacientët e grupit të parë vetëm një pacient u gjet me mutacionin e rrallë S65C në formë heterozigotë. Ne përdorëm protokollin strip test për tre mutacionet më frekvente që shkaktojnë hemokromatozën (HK).

Në grupin e dytë të 10 pacientëve që kishin mbingarkesë të paramerave biokimik të hekurit u gjetën 3 (30%) pacientë bartës të mutacionit H63D, 1 (10%) pacient bartës i mutacionit C282Y dhe 6 (60%) pacientë me tipin wild normal për WT/WT. Si përfundim frekuenca e tre gjeneve të analizuara, në 20 pacientët është përkatësisht: S65C alele 2,5% H63D alele 7,5% dhe C282Y 2,5%. WT/WT wild tip në popullatë ka një rritje të mbingarkesës të parametrave të hekurit që mund të jetë e lidhur me faktorë të tjerë gjenetik, por jo e lidhur me mutacionin e gjenit HFE. (Pedersen et al, 2008: Ferreira et al, 2008: Neghina AM et al, 2009).^{[34],[39],[40]}

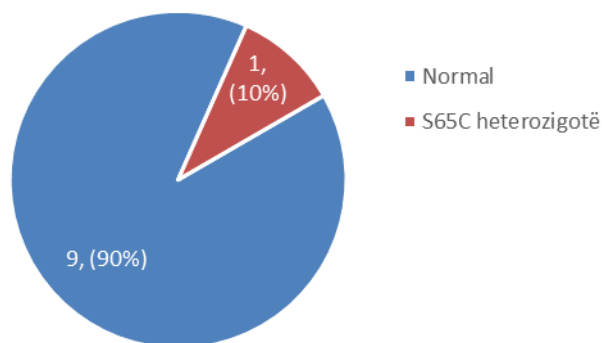


Figura 3. 16 Frekuenca e gjenotipeve tek 10 pacientët e grupit të parë

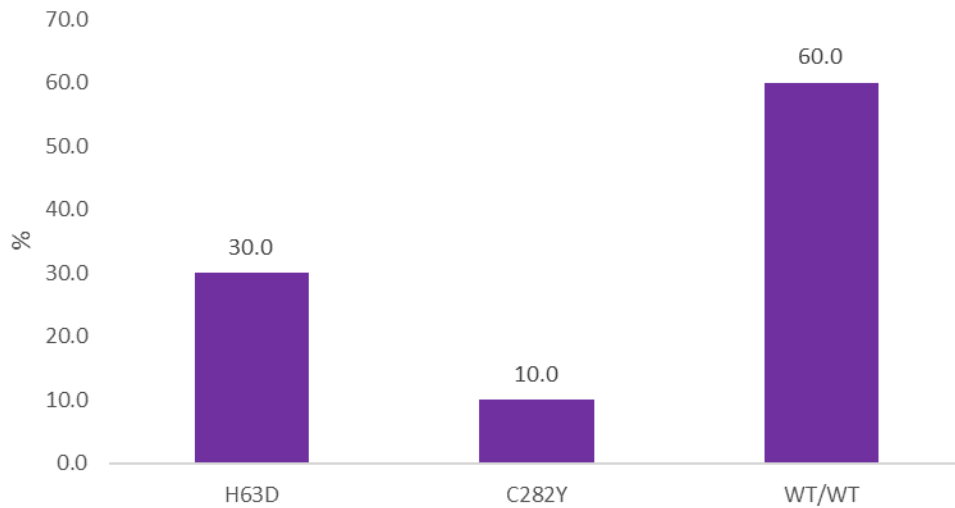


Figura 3. 17 Frekuenca e gjenotipeve tek 10 pacientët e grupit të dytë me mbingarkesë të hekurit, ferritinës dhe transferrinës së saturuar

Nga këta 10 pacientë 3 (30%) e tyre rezultuan me H63D/WT, 1 (10%) me C282Y/WT dhe 6 (60%) normale me WT/WT.

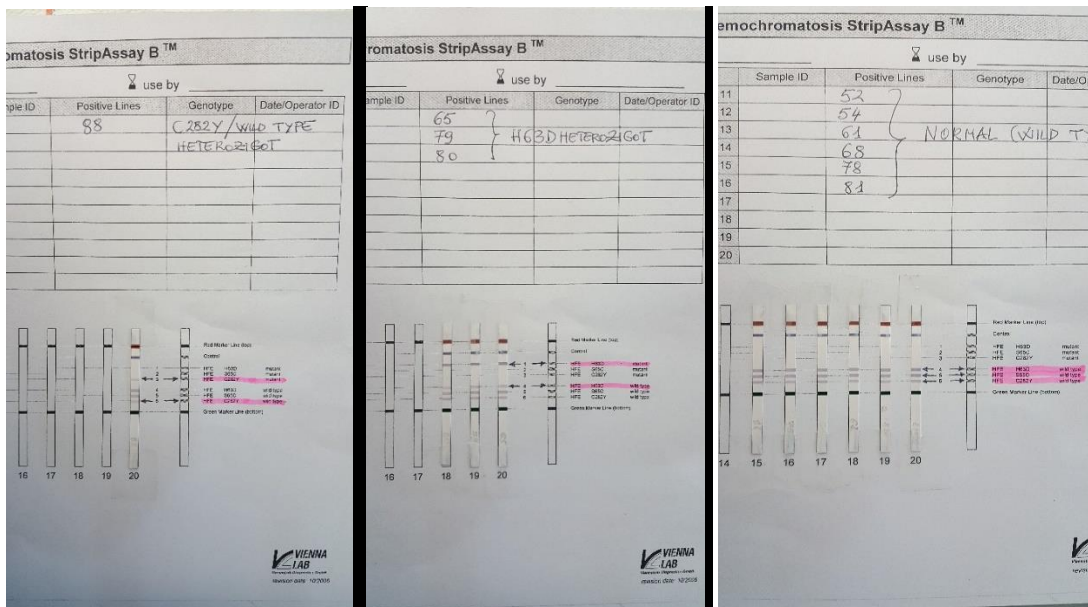


Figura 3. 18 Foto e 10 pacientëve të analizuar

Në figurën 3. 18 tregohen 10 pacientë të analizuar, 6 rezultuan të tipit wild , 3 rezultuan bartës të mutacionit H63D dhe 1 pacient u gjet bartës i mutacionit C282Y.

Ne konkluduar që indeksi i rritur i hekurit hepatic mund të shërbejë si indikator për zbulimin e mutacioneve të gjenit HFE në krahasim me gjenet e tjera të hekurit të studiuar. S65C është alel më i rrallë në popullsinë europiane dhe jep një formë të lehtë të hemokromatozës. (Rochette et al, 1999; US preventive Services Task Force 2006).^{[29],[42]}

Si përfundim në grupin e 50+20 pacientët e fundit pra 70 pacientë që u morën në studim të shtruar në Klinikën e Gastrohepatologjisë në Qendrën Spitalore Universitare “Nënë Tereza” të prekur nga sëmundja e rëndë e heparit (cirroza dhe steatoza) u analizuan për tre indekset e hekurit dhe identifikimin e mutacioneve të gjenit HFE. Nga këta pacientë 37 paraqitën mutacione të gjenit HFE. Mesatarja e indekseve të hekurit në serum për popullatën e studiuar është raportuar në tabelën 3. 5 e kombinuar me gjenotipet HFE të gjetura nga analiza gjenetike duke përdorur Strips Assay.

Tabela 3. 5 Gjenotipet HFE dhe indekset mesatare të hekurit në serum për popullatën e studiuar (N=70)

Genotipi	Nr i subjekte ve (70)	Frekuenca (%)	Përqëndrimi i hekurit në serum (µmol/L)	Transferrina e saturuar (%)	Përqëndrimi i ferritinës në Serum (ng/ml)
C282Y homozigotë	0	0	0	0	0
C282Y heterozigotë	18	25.7%	18.2	33.8	94.6
H63D heterozigotë	5	7.1%	18.7	33.7	97.2
S65C heterozigotë	1	1.4%	17.7	88.2	106.3
Perberje heterozygotë	13	18.6%	20.8	42.7	124.6
Normal HFE (pa mutacion)	33	47.1%	16.4	31.2	87

Rezultatet shprehen si mesatare (SD) me përjashtim të përqëndrimeve të ferritinës në serum të cilat shprehen si mesatare gjeometrike (95% intervale besimi), p <0.05.

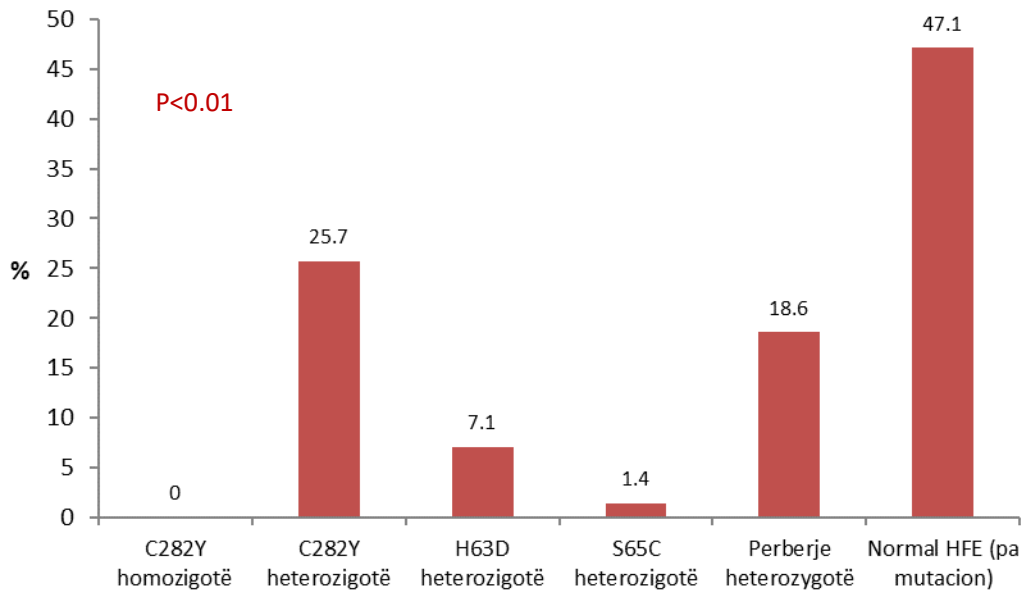


Figura 3. 19 Gjenotipet HFE për popullatën e studiuar (n=70)

Meqenëse jemi të interesuar të identifikojmë prezencën e mutacionit të gjenit HFE dhe korrelacionit me koncentrimin e hekurit në serum, përqëndrimin e transferrinës së saturuar dhe koncentrimin e ferritinës në serum në pacientët e prekur, ne krahasuam vlerat e këtyre markuesve me gjenotipet e gjetura.

Heterozigoziteti për mutacionet C282Y dhe H63D është në frekuencat e gjeneve përkatësisht 25.7% dhe 7.1%.

Frekuenca e mutacionit më të rrallë në gjendje heterozigote është 1.4% dhe frekuenca e heterozigotëve të përbërë është 18.6%.

Mutacionet e gjenit HFE janë të pranishme në 37 prej pacientëve me sëmundje të heparit (53%) dhe përfshijnë të gjithë gjenotipet dhe heterozigotët e përbërë.

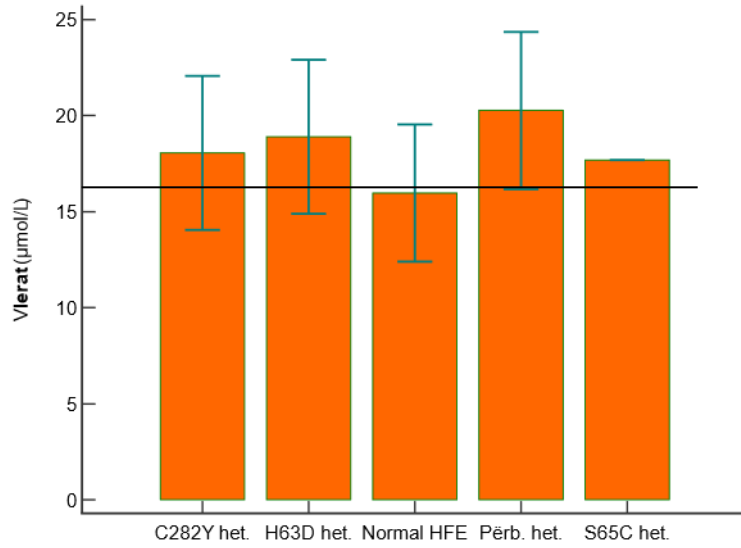


Figura 3. 20 Përqëndrimi i hekurit në serum (µmol/L)

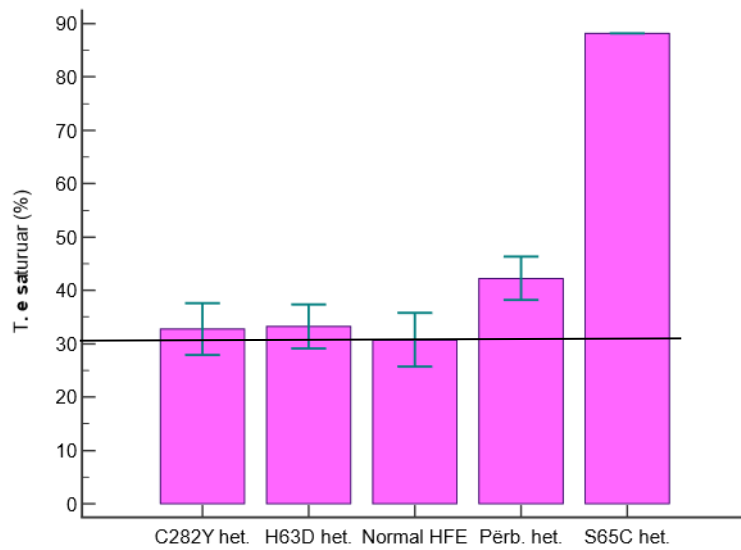


Figura 3. 21 Transferrina e saturuar (%) në serum

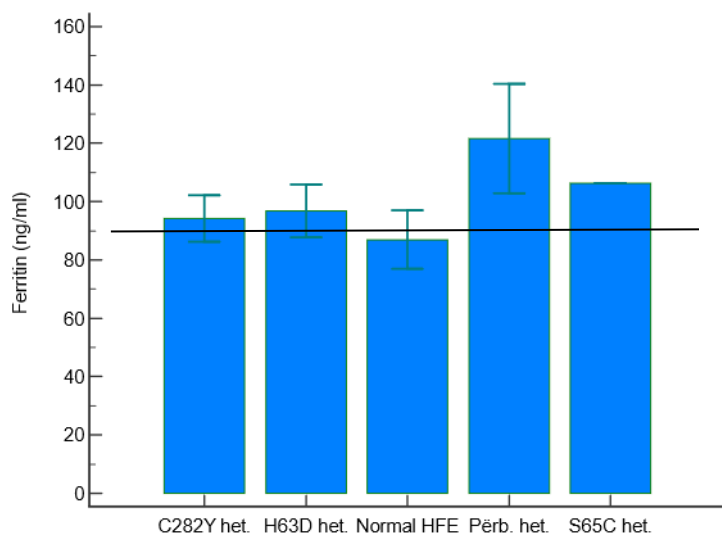


Figura 3. 22 Përqëndrimi i ferritinës në Serum (ng/ml)

Të tre grupet e gjenotipit me një mutacion kishin përqëndrime mesatare më të larta të hekurit në serum dhe përqëndrim mesatar më të lartë të transferrinës së saturuar, sesa 33 subjektet pa mutacione. Ne nuk gjetëm ndonjë mutacion homozigotë për gjenotipet. Kur krahasohen me heterozigotët e thjeshtë C282Y, heterozigotët e përbërë kishin ngopje të konsiderueshme mesatare të hekurit dhe transferrinës në serum, por ndryshimi në përqëndrimet mesatare të ferritinës në serum nuk ishte i rëndësishëm.

Tabela 3. 6 Frekuenca e rritjes së indekseve të hekurit tek heterozigotët

Gjenotipi	Nr i subjekteve (70)	Transferrina e rritur † (>50.5%)	Rritja e përqëndrimit të ferritinës në serum † (M >428, F >302 µg/L)
C282Y heterozigotë	18	11.2	11
H63D heterozigotë	5	22.3	10
S65C heterozigotë	1	21	11
Përbërës heterozigotë	13	4.8	3
Normal HFE (pa mutacion)	33	20.6	16

Rezultatet shprehen në (%). Përqëndrimi mesatar i transferrinës së saturuar për grupin e gjenotipeve normal (pa mutacione të gjenit HFE) $p < 0,01$.

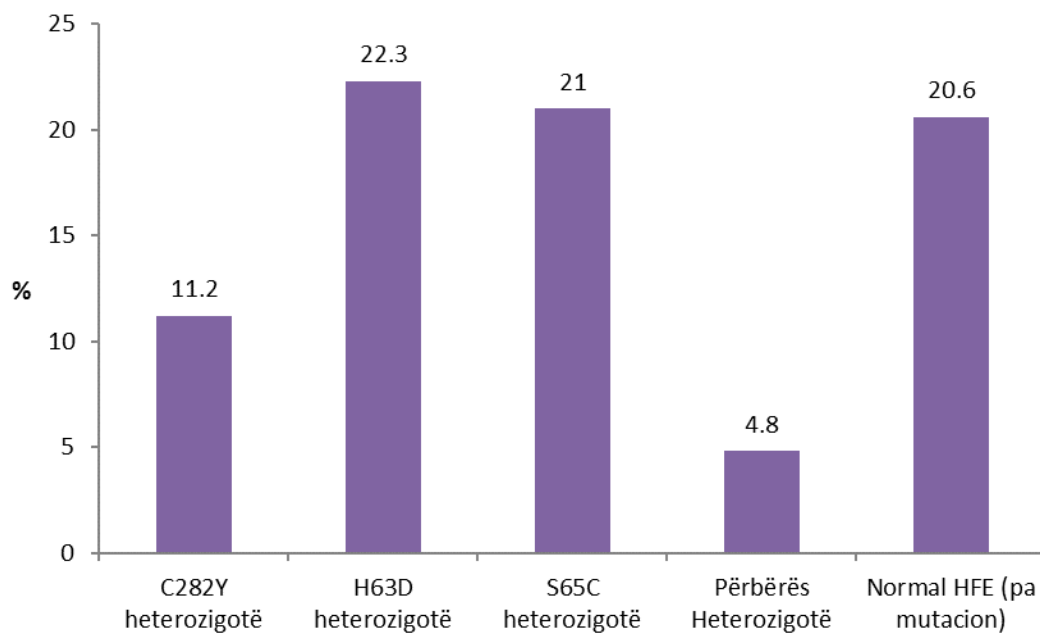


Figura 3. 23 Frekuenca e rritjes së transferrinës tek heterozigotët

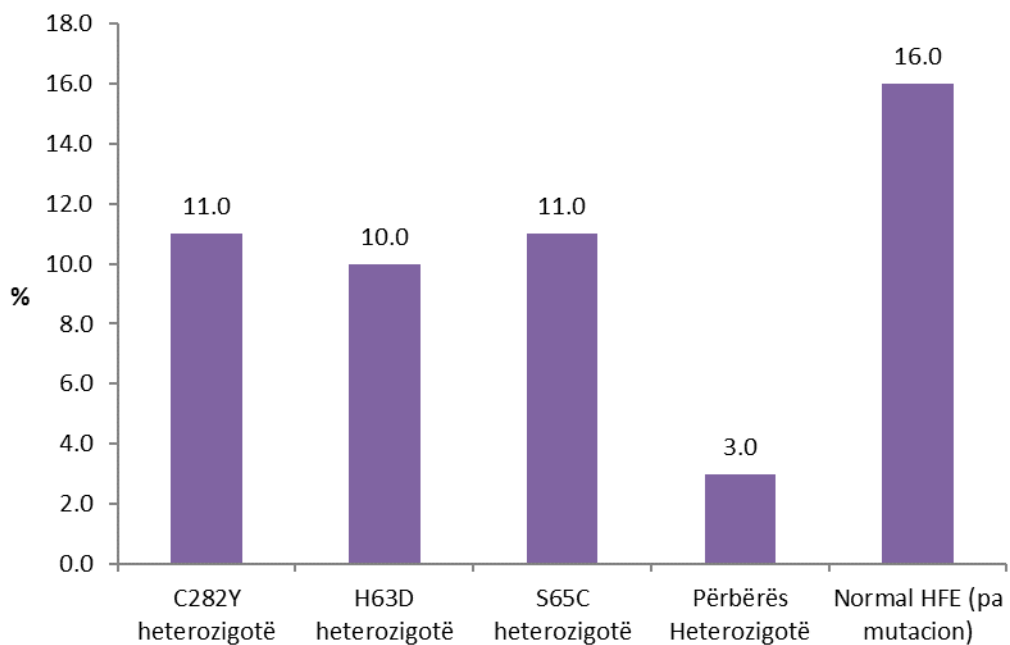


Figura 3. 24 Rritja e përqëndrimit të ferritinës në serum

Frekuenca e mutacioneve të gjenit HFE tek personat e shëndetshëm (n=50) dhe të sëmurë (n=80)

Mutacionet e gjenit HFE u gjetën në 10 (20%) nga 50 individët e shëndetshëm dhe në 38 (47.5%) nga 80 pacientët e sëmurë, pa ndryshim sinjifikant ndërmjet tyre $p=0.2$

IV DISKUTIM

Në këtë studim ne kemi përcaktuar frekuencën e mutacioneve më të rëndësishme të gjenit HFE dhe kemi analizuar lidhjen e tyre me markuesit e hekurit në serum në pacientët me sëmundje të heparit të shtruar në Klinikën e gastrohepatologjisë. Heterozigoziteti për mutacionet C282Y dhe H63D është në frekuencat e gjeneve përkatësisht 25.7% dhe 7,1%, dhe 47% e popullatës së studiuar nuk ka mutacion të gjenit HFE.

Ky studim synon të përcaktojë markuesit më të saktë si kriter për të eksploruar gjenin përgjegjës. Ne u fokusuar tek markuesit e hekurit në serum për të eksploruar gjenin HFE në popullatën me sëmundje të heparit që po trajtohen në departamentin e gastrohepatologjisë. Shumica e subjekteve kishin një nivel fillestar të transferrinës së saturuar më të madhe se 55%. Mutacionet e gjenit HFE ishin të pranishme në 38 nga 80 pacientët (47,5%) dhe përfshijnë të gjithë gjenotipet dhe heterozigozitet e përbërë. Analiza e mëtejshme tregoi se mutacioni C282Y (meshkuj 300 µg/L, femra >160 µg/L), në tetë subjekte u shoqërua me një përqëndrim të vazhdueshëm të ngritur të ferritinës në serum dhe këta subjekte duhet t'i nënshtroheshin më tej biopsisë së mëlçisë. Megjithatë, ky parametër, biopsia e mëlçisë nuk u krye pasi nuk ishte një procedurë standarde në shërbimin publik. Ky mund të jetë një kufizim për të interpretuar rezultatet, megjithatë një rritje e transferrinës së saturuar në serum rezultoi një test fillestar më i mirë për të zgjedhur pacientët për analizën e gjenotipizimit sesa hekuri ose ferritina në serum. Megjithëse u bë çdo përpjekje për të marrë mostrat më të rëndësishme të popullatës klinike, popullata e studimit nuk ishte plotësisht përfaqësuese e popullatës së synuar, pasi nuk gjetëm asnjë pacient me sëmundje të trashëgueshme të hemokromatozës (HK). Por duke ditur se vetëm 25% e homozigotëve për C282Y shprehin sëmundjen e HT, rezultoni se pacientë me shenja klinike mund të gjenim 1/4000 -1/6000 individë në popullatën shqiptare. Hemokromatoza prek kryesisht kaukazianët me origjinë evropiane, (Baer DM et al. Am J Med 1995; Smith BN et al. 1997; Powell LW et al.1994; Burt MJ et al.1998)^{[46],[47],[48],[49]} dhe mund të jetë shfaqur në një popullsi të lashtë kelte me migrimin e mëvonshëm që shpjegon shpërndarjen gjeografike të kësaj patologjie gjenetike. Në popullatën shqiptare ky është studimi i parë i gjenit HFE. Megjithatë, ka prova të qarta se mutacionet HFE ndikojnë në indekset e hekurit në serum dhe subjektet me një ose më shumë mutacione kanë përqëndrime mesatare të hekurit në serum dhe përqëndrim të transferrinës së saturuar më të rritur në krahasim me subjektet normale. (Smith BN et al.Hepatology 1997).^[47] Heterozigotët C282Y dhe H63D kanë përqëndrim më të lartë të transferrinës së saturuar ose përqëndrime më të larta të ferritinës në serum. Kufiri i sipërm i normales përcaktohet në individët pa ndonjë mutacion të gjenit HFE. Kjo është e ngjashme me vëzhgimet e mëparshme të shprehjes së pjesshme biokimike në një pjesë të heterozigotëve të konstatuara në studimet familjare.(Burt MJ et al.1998; Moodie SJ et al.2002)^{[49],[50]} Mutacioni S65C janë vetëm dy raste dhe niveli i lartë i markuesve të

hekurit lidhet me toksicitetin e mëlçisë pavarësisht mutacionit heterozigot të gjenit. Ne sugjerojmë që pacientët me nivel të rritur të përqendrimit të transferrinës së saturuar dhe markues të mbingarkuar të hekurit janë një tregues i mirë për shqyrtimin e mutacionit të gjenit HFE dhe programet e diagnostikimit, ndoshta duhet të kufizojnë gjenotipizimin tek këta individë.

Të dhënat që kemi gjetur nga studimi në popullatën e shëndetshme, mund të krahasohen me ato të përftuara nga vendet e tjera europiane, për të pasur një ide se në çfarë grupi bëjmë pjesë (Tabela 4. 1)

Tabela 4. 1. Frekuencat e mutacioneve të gjenit HFE në vendet kryesore të Europës përfshirë edhe studimi ynë

Popullsia	Frekuenca e Mutacionit C282Y, %	Frekuenca e Mutacionit H63D, %
Mbreteri e Bashkuar	6.0	12.1
Irlanda	10	18.9
Islanda	6.7	10.6
Norvegjia	6.4	11.2
Finlanda	0	11.8
Danimarka	9.5	12.2
Hollanda	2.6	29.5
Gjermania	1.9	18.9
Italia	0.5	12.6
Greqia	1.4	11.9
Turqia	0	17.7
Spanja	3.2	26.3
Shqipëria	3	10.0
Europa ne Total	3.8	13.6

Siç shikohet edhe nga Tabela 4.1 , ku janë shtuar edhe të dhënat e studimit tonë duket se frekuencat e mutacioneve C282Y dhe H63D të gjenit HFE janë të krahasueshme me mesataren e Europës.

Mendojmë se metoda e përdorur nga ana jonë ka funksionuar mirë, sipas protokolleve të botuara nga literatura, dhe paraqet një metodë relativisht të thjeshtë dhe efektive të analizës të dy mutacioneve të gjenit HFE, C282Y dhe H63D. Kjo metodë ka nevojë për një numër të kufizuar pajisjesh laboratorike, jo shumë të kushtueshme, ka një kosto relativisht të ulët në reagentët që përdoren, dhe paraqet saktësi të mirë në identifikim.

Rezultatet e përfutuara na kanë dhënë një informacion paraprak në lidhje me praninë e mutacioneve të gjenit HFE, C282Y dhe H63D, në popullatën shqiptare, me frekuenca të krahasueshme me vendet fqinje por edhe me disa ndryshime që duhen marrë në konsideratë.

Strategjitë për të gjetur rastet me hemokromatozë hereditare

Për shkak se shenjat klinike dhe simptomat janë të ndryshme, gjetja e rasteve me HK varet shumë nga vëzhgimi klinik dhe arsyeja pse janë kërkuar analizat biokimike. Analiza e parë që duhet kryer është përcaktimi i nivelit të TS. Është mirë që kjo analizë të rikonfirmohet 2 herë në laboratorë të ndryshëm.

Nuk ka një vlerë cut-off të përcaktuar qartë nga të gjithë laboratorët. Në një studim të vitit 2010 është përdorur një cut-off për TS nga 45 deri 60% dhe ka rezultuar se me këto vlera mundësia për të gjetur një pacient homozigotë për mutacionin C282Y të *HFE* është nga 4% deri 21%. (Paulo C.J. L, Santos, et al, 2012).^[43]

Përveç TS, SF është një tjetër analizë që duhet kryer. Edhe për SF nuk ka vlera cutoff të përcaktuara e të pranuar nga të gjithë. Studime në popullata të ndryshme kanë përcaktuar vlera cutoff nga 250 – 428 ug/l tek meshkujt dhe nga 130-302 ug/l tek femrat. Vlerat e detektimit të individëve me *HFE* homozigotë janë nga 1.6 deri 17%.

Duhet theksuar se vlerat e SF mund të ndikohen nga faktorët e mjedisit lokal, si stili i jetesës të një popullate (veçanërisht konsumi i alkoolit, pesha dhe jeta sedentare) (Evangelista AS et al, 2015)^[56] ose nga rajoni gjeografik. Idealja është që vlerat e cutoff të përcaktohen nga vlerat lokale për kufijtë e sipërm të referencave. (Graca Porto et al, 2016).^[44]

Nëse zgjidhet SF si një tregues i HK, kjo vlerë duhet të jetë e lartë në mungesë të rezervave të rritura të hekurit tek pacientët me sëmundje kronike inflamatore (sëmundje të mëlçisë të shkaktuar nga alkooli, hepatitet virale kronike dhe sëmundjet e heparit të shkaktuar jo nga alkooli). Studimet kanë treguar se pacientët me hiperferritinemi kanë pak mundësi të jenë me *HFE* (homozigotë për mutacionin C282Y) nëse kanë transaminazat mbi normën. Duhet theksuar se mbingarkesa e hekurit dhe hiperferritinemia pa një rritje të TS nuk është një kriter për testin gjenetik të *HFE*.

Kur është gjetur një pacient me *HFE* testimi gjenetik është i domosdoshëm për familjarët asimptomatik të shkallës së parë dhe vëllezër e motra, pasi diagnostikimi i hershëm është një strategji kost efektive.

Në Figurën 4. 1 është paraqitur skematikisht strategjia diagnostikuese për pacientët që dyshohen për HT. Testimi gjenetik për gjenin HFE për dy mutacionet kryesore (p.Cys282Tyr dhe p.His63Asp) duhen analizuar në të gjithë pacientët me një rritje të pashpjegueshme të TS dhe/ose të vlerave të ferritinës në serum (Figurë 4. 1). Në të gjitha

rastet, diagnoza molekulare e HT të lidhur me gjenin HFE është e shoqëruar me praninë e C282Y në gjendje homozigotë ose heterozigotë të përbërë. Megjithatë edhe gjenotipet H63D homozigotë dhe H63D/S65C heterozigotë të përbërë janë shoqëruar me fenotipin e HT. (Paulo C.J.L Santos et al, 2012; Graca Porto et al, 2016).^{[43],[44]}

Në mungesë të gjenotipeve të mësipërme të lidhura me gjenin HFE, duhen marrë në konsideratë analiza e gjeneve të tipeve të tjera të HT. Kur kemi një mbingarkesë të hekurit në pacientë me moshë më të vogël se 30 vjeç dhe me klinikë kardiake ose endokrine, rekomandohet analiza e gjenit JH (Figurë 4. 1).(Paulo C.J.L Santos et al, 2012; Graca Porto et al, 2016).^{[43],[44]}

Mutacionet në gjenet TFR2 dhe SLC40A1 janë të rralla krahasuar me mutacionet e gjenit HFE por janë gjetur tek femijët, adoleshentët dhe të rriturit. Këto gjene duhen analizuar tërësisht nëpërmjet sekuencimit, pasi të kemi rezultate negative për gjenet e tjerë të lidhur me HT.

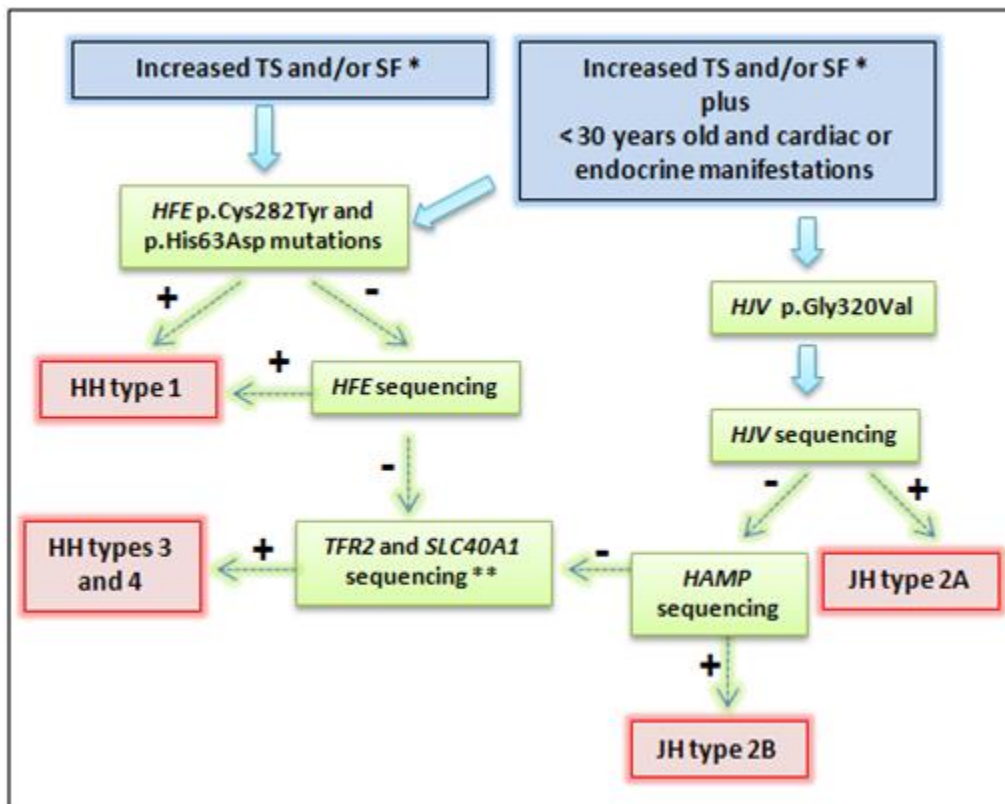


Figura 4. 1. Strategjia diagnostikuese

Depistimi gjenetik i popullatës nuk rekomandohet pasi penetranca është e ulët dhe kosto shumë e lartë. Edhe depistimi biokimik për popullatën në lidhje me mbingarkesën e hekurit nuk rekomandohet pasi nuk ka rezultuar efektive nga projektet e mëparshme të kryera në botë.

V **PERFUNDIME**

1. Analizimi i parametrave biokimik të mbingarkesës së hekurit, ferritinës dhe transferrinës së saturuar tregoi një korelacion në lidhje me shfaqjen e mutacioneve të gjenit HFE. Këta markues të mbingarkesës së hekurit mund të shërbejnë për diagnostikimin e hershëm të hemokromatozës.
2. Parametri më i ndjeshëm dhe i besueshëm është transferrina e saturuar që shërben si indikator i hemokromatozës për të eksploruar gjenin HFE.
3. U aplikuan dy metoda molekulare për analizën e ADN-së të gjenit HFE. Metoda PCR-RFLP, e cila paraqitet efektive dhe me kosto të ulët, e përshtatshme për kushtet tona laboratorike, për përcaktimin e mutacioneve në grupin e individëve të popullatës së shëndetshme.
4. Përdorimi me sukses dhe i një metode tjetër, protokollin me Strip test për përcaktimin e mutacioneve C282Y, H63D dhe S65C të gjenit HFE në një grup pacientësh me sëmundje të heparit.
5. Aplikimi i metodave molekulare gjenetike shërben për diagnostikimin e sëmundjes së hemokromatozës, përpara se ajo të ketë shkaktuar dëme të pariparueshme në organet jetike për njeriun.
6. Për herë të parë analizohet përhapja e mutacioneve të hemokromatozës, C282Y dhe H63D, në një grup individësh të popullatës shqiptare të shëndetshme, duke na dhënë një tregues fillestar të gjendjes së këtij gjeni në popullatën shqiptare, C282Y (3%) dhe H63D (10%).
7. Me frekuencat e gjetura për dy mutacionet, frekuenca e bartësve në popullatë është 5,3% për alelin C282Y dhe rreth 17,4% për mutacionin H63D.
8. Për herë të parë u analizua përhapja e mutacioneve të gjenit HFE dhe frekuenca e tyre në personat me risk, pacientë të hospitalizuar në Klinikën e Gastrohepatologjisë me sëmundje të heparit.
9. Shfaqja e mutacionit më të rrallë S65C në pacientët e analizuar që shfaqin sëmundje të heparit kryesisht cirrozë.
10. Në studimin tonë u gjetën gjenotipe heterozigotë për mutacionet C282Y, H63D dhe S65C. Nuk u gjetën gjenotipe homozigotë që shfaqin sëmundjen. Kjo është e lidhur me

stilin e jeteses, (jeta sedentare, obeziteti, përdorimi i alkoolit), hepatitet kronike, pozitën gjeografike etj.

11. Në grupin e pacientëve u gjetën 38(47,5%) me mutacione të gjenit HFE, dhe 42 pa mutacione (53,5%).

12. Heterozigoziteti për mutacionet C282Y dhe H63D është në frekuencat e gjeneve përkatësisht 25.7% dhe 7.1%.

13. Frekuenca e mutacionit S65C në gjendje heterozigote është 2.2% dhe frekuenca e heterozigotëve të përbërë është 18.6%.

14. Mutacionet e gjenit HFE janë të pranishme në 38 prej pacientëve me sëmundje të heparit (47,5%) dhe përfshin të gjithë gjenotipet dhe heterozigotët e përbërë.

15. Nga studimi i kryer rezultoi se 53,5% e popullatës të marrë në shqyrtim nuk ka mutacion të gjenit HFE.

16. Për herë të parë u bë studimi dhe vlerësimi i hemokromatozës në popullatën shqiptare.

17. Në përfundim mund të themi se studimi që paraqitëm është një kontribut për njohjen e kësaj sëmundje gjenetike në vendin tonë si dhe për të plotësuar kuadrin European të përhapjes dhe mutacioneve të kësaj sëmundje gjenetike.

VI REKOMANDIME

Të vazhdojë studimi në popullatën shqiptare me një numër më të madh të kampionit, për të thelluar e konfirmuar rezultatet e këtij punimi.

Duhet të vlerësohen edhe metoda alternative të analizës së ADN-së për gjenin HFE.

Këto janë metodat e sekuencimit të gjeneratës tjetër NGS apo Real Time PCR, të cilat janë më të kushtueshme por, që janë me nivel më të lartë saktësie dhe japin rezultatin në një kohë më të shkurtër, duke kontribuar në diagnostikën molekulare të hemokromatozës si sëmundje gjenetike.

Mjekët hepatologë mund të rekomandojnë kryerjen e testit gjenetik të gjenit HFE, në rastet e pacientëve me patologji të heparit, por me diagnoza të dyshuara ose të papërcaktuara qartë(duke përjashtuar shkaqet e tjera), që kanë dhe rritje sinjifikante të parametrave biokimik të hekurit.

VII BIBLIOGRAFIA

1. Merryweather-Clarke AT, et al. (1997). Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J. Med Genet* 34:275.
2. Merryweather-Clarke AT, et al. (1997). A rapid non-invasive method for the detection of the haemochromatosis C282Y mutation. *Br J Haematol* 99: 460, 1997
3. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE Gene and Hereditary Hemochromatosis; A Huge Review. *American Journal of Epidemiology*, vol 154, issue 3, august 2001, pages 193-206.
4. Pietrangelo A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002.
5. Siah CW, Trinder D, Olynyk Jk. Iron Overload. *Clin Chim Acta* 2005.
6. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity 2005.
7. Adams Pc, Deugnier Y, Moirand R, Brissot P. The Relationship Between Iron Overload, Clinical Symptoms, With Genetic Hemochromatosis. *Hepatology* 1997.
8. Parkkila S, Niemela O, Britton R, Fleming R, Waheed A, Bacon B, et al. 36: 632-637.(1997). Molecular aspects of Fe absorption and HFE gene expression.
9. Solis Herruso JA, Munos P. HFE hemochromatosis. 2005.
10. Verga Falzacappa Mv, Muckenthaler Mu. Hfeclon: Iron-hormone and anti-microbial peptide. *Gene* 2005.
11. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: *Am J Epidemiol* 2001.
12. Hanson EH, Imperatore G, Burke W, *Am J Epidemiol* 70:540, (2001). Types of Hemochromatosis.
13. Rochete J, Pointon JJ, Fisher C A, Robson K J H, De Silva, Perera M. Pathogeny of hemochromatosis 1999.

14. Norbert Gatterman, Heinrich Heine, Moorenstr Dusseldorf 29:617-620, (2009). Clinical features of hereditary hemochromatosis.

15. Merryweather-Clarke AT, Feder JN, Br J haematol 99: 460,(1997). Hemochromatosis, autosomal recessive disease.

16. Bacon BR, Olynyk JK, Brunt EM, Britton RS, Wolff RK.55:404,(2008) HFE genotype in patients with hemochromatosis.

17. Waheed, A., Parkkila, S., Zhou, X., Tomatsu, S., Tsuchihashi, Z., Feder, J., Schatzman, R., Britton, R., Bacon, B. and Sly, W. Hereditary hemochromatosis: Effects of C282Y and H63D mutations on associations With beta2-microglobulin, intracellular processing 1997.

18. Feder, J N; Penny D M, Irrinki A, Lee V K, Lebr6n J A, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman P J, Schatzman R C 175:109-120, (1998). The hemochromatosis gene forms a complex with the transferrin receptor and decreases the affinity for binding to the ligand.

19. Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bamford A, Capron D, Viprakasit V, Miller A, et al. 11:2241--2247,(2003). Digenic inheritance of HFE mutation in different types of hemochromatosis.

20. Dadone MM, Kushner JP, Edwards CQ, Bishop DT, Skolnick MH (August 1982). "Hereditary hemochromatosis. Analysis of laboratory expression of the disease by genotype in 18 pedigrees".

21. Harris EL, McLaren CE, Reboussin OM, Gordeuk VR, Barton JC, Acton RT, et al.; 167:722--726, (2007). Serum ferritin and transferrin saturation.

22. Whitlock EP, Garlitz BA, Harris EL, Beil TI, Smith PR. Diagnosis of hereditary hemochromatosis: Ann Intern Med (2006);145:209--223; Qaseem A, Aronson M, Fitterman N, Snoe V, Weiss KB, O'Enns DK, et al. Med (2005); 143:517-521.

23. Jeffrey GP, Chabkrabarti S, Hegele RA, Adams PC, Bassett ML, Leggett BA, Halliday JW, Web S, Powell LW, J Hepatol: 357:147-53,(1997). Diagnostic analyzes of hemochromatosis using genetic and biochemical markers.

24. Merryweather Clarke AT, Pointon JJ, Shearman J D and Robson K J global prevalence of putative hemochromatosis mutations, methods 1997.
25. Merryweather-Clarke AT, Pointon JP, Jouanolle AM, Rochette J, Robson KJH. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. Genet Test 2000.
26. Cukjati M, Vaupotic T, Rupreht R, Curin-Serbec v prevalence of H63D,S65C and C282Y hemochromatosis gene mutations in Slovenian population 2007.
27. Cimbuřova M, Putova I, Pinteraova D, Horak J. S65C and other mutations in hemochromatosis gene in Czech population 2005.
28. De Diego et al. (2004). Frequency of HFE H63D, S65C, and C282Y mutations in patients with iron overload and controls from Toledo, Spain. Genet. Test. 8: 263-267.
29. Rochette et al, 1999. Multicentric origin of HFE gene mutations. Am J Hum Genet. 64: 1056-1062.
30. Altes A, Ruis A, Barcelo MJ, Puig T, Maya AJ, Baiget M. Prevalence of H63D, S65C and C282Y hemochromatosis gene mutations in Northern Spain 2004.
31. Feder JN, et al.(1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nat Genet 13: 399.
32. Lin A, et al. 70: 252-255,(2007). Analysis of HFE gene mutations in the Chinese population.
33. Sassi R, Hmida S, Kaabi H, Hajjej A, Abid A, Maamar M, Mojaat N, Benhamed L Prevalence of H63D and C282Y hemochromatosis gene mutations in Tunisian population 2004.
34. Pedersen et al. (2008). Frequencies of the haemochromatosis gene (HFE) variants C282Y, H63D and S65C in 6020 ethnic Danish men. Ann. Haematol. 87: 735-740.
35. Moczulski DK, Grzeszczak W, Gawlik B. 20:986-91,(2000). Frequency of C282Y and H63D mutations in the Polish population of Slavic origin.
36. Ristic S, Makuc J, Starcevic N, Logar N, Brajenovic-Milic B, Stepec S, Plesa I, Kapovic M, Milic S, Stimac D, Crnic-Martinovic M, Peterlin B. 88:99-104,(1998). Hemochromatosis gene mutations in Croatian and Slovenian populations.

37. Oliveira et al. (2009). Frequency of the S65C mutation in the hemochromatosis gene in Brasil. *Genetics and Molecular Research* 8 (3): 794-798.
38. Lee SH, et al. (2009). HFE gene mutations, serum ferritin level, transferrin saturation, and their clinical correlates in a Korean population. *Dig. Dis. Sci.* 54: 879-886.
39. Ferreira et al. (2008). Prevalence of C282Y and H63D mutations in the HFE gene of Brazilian individuals with clinical suspicion of hereditary haemochromatosis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 30: 379-383.
40. Neghina AM, Anghel A, Sporea I, Popescu A, Neghina R, Collins A and Thorstensen K. Mutant HFE genotype leads to significant iron overload in patients with liver diseases from Western Romania. *J. Appl. Genet.* 50 (2), 2009, pp. 173-176.
41. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002). PCR-RFLP method for the diagnosis of hemochromatosis. *Am J Hum Genet.* 71: 169-175.
42. US preventive Services Task Force (2006). Screening for hemochromatosis recommendation statement. *Ann. Intern. Med.* 145: 204-208.
43. Paulo C. J. L. Santos, Jose E. Krieger and Alexandre C. Pereira (2012). Molecular Diagnostic and Pathogenesis of Hereditary Hemochromatosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 1497-1511.
44. Graca Porto, Pierre Brisot, Dorine W Swinkels, Heinz Zoller, Outi Kamarainen, Simon Patton, Isabel Alonso, Michael Morris and Steve Keeney. (2016) EMQN best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis (HH). *European Journal of Human Genetics* (2016) 24, 479-495.
45. Ronald T. Acton, James C Barton, Leah V. Passmore, Paul C. Adams, Mark R. Speechley, Fitzroy W. Dawkins, Phyliss Sholinsky et al. Relationships of serum ferritin, Transferrin Saturation, and HFE Mutations and Self Reported Diabetes in the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) study, *Diabetes Care* 29: 2084-2089, 2006.
46. Baer DM, Simons JL, Staples RL, et al. Hemochromatosis screening in asymptomatic ambulatory men 30 years of age and older. *Am J Med* 1995;98:464-8.

47. Smith BN, Kantrowitz W, Grace ND, et al. Prevalence of hereditary hemochromatosis in a Massachusetts corporation: is Celtic origin a risk factor? *Hepatology* 1997; 25:1439–46.
48. Powell LW, Jazwinska E, Halliday JW. Primary iron overload. In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Poëll LW, eds. *Iron metabolism in health and disease*. London: Saunders, 1994:227–70.
49. Burt MJ, George PM, Upton JD, Collett JA, Frampton CM, Chapman TM, Walmsley TA, Chapman BA. The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut*. 1998 Dec;43(6):830-6. doi: 10.1136/gut.43.6.830.PMID:9824612;PMCID:PMC1727339.
50. Moodie SJ, Ang I, Stenner JM, Finlayson C, Khotari A, Levin GE, Maxwell JD. Testing for haemochromatosis in a liver clinic population; relationship between ethnic origin, HFE gene mutations, liver histology and serum iron markers. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002.Mar;14(3):223-9.doi:10.1097/00042737-200203000-00004.PMID:11953685.
51. Le Gac, G., Férec, C. The molecular genetics of haemochromatosis. *Eur J Hum Genet* 13, 1172–1185 (2005). <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201490>
52. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH et al: Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004; 36: 77–82.
53. Jacolot S, Le Gac G, Scotet V, Quere I, Mura C, Férec C : HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood* 2004; 103: 2835–2840.
54. Pietrangelo A : The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32: 131–138.
55. Cazzola M : Genetic disorders of iron overload and the novel ‘ferroportin disease’. *Haematologica* 2003; 88: 721–724.
56. Evangelista AS, Nakhle MC, de Araújo TF, Abrantes-Lemos CP, Deguti MM, Carrilho FJ, Canao EL. HFE genotyping in patients with elevated serum iron indices and liver diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:164671. doi: 10.1155/2015/164671. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25654085; PMCID: PMC4310263. Huffman, LM. 1996.

“Processing whey protein for use as a food ingredient”, Food Technology, vol. 50, no. 2, pp.49-52.

57. Adams PC, Reboussin DM, Press RD, Barton JC, Acton RT, Moses GC, et al. 2007. Biological Variability of Transferrin Saturation and Unsaturated Iron-Binding Capacity. Am J Med 120:999.e1-999.e7.

Abstrakt

Qëllimi i këtij studimi është identifikimi i të sëmurëve dhe bartësve me hemokromatozë në popullatën shqiptare, nëpërmjet analizës së gjenit HFE dhe përdorimi i analizave biokimike të mbingarkesës së hekurit për diagnostikimin e hershëm të sëmundjes.

Materialet dhe metodat:

Në studim u morën 140 individë: 50 individë të shëndetshëm dhe 90 (77 meshkuj dhe 13 femra) pacientë me sëmundje të heparit (cirrozë, steatozë) të hospitalizuar në klinikën e Gastrohepatologjisë në QSUT. Individët e shëndetshëm u analizuan për gjenotipet e gjenit HFE. Pacientët janë analizuar për parametrat e mbingarkesës së hekurit, ferritin dhe transferrinën e saturuar duke përdorur 5ml gjak venoz nga çdo pacient. 80 nga pacientët janë analizuar dhe për analizën molekulare të gjenit HFE duke përdorur 5ml gjak të marrë me tub K3 EDTA.

Metodat:

Analizat biokimike. Nga serumi i gjakut është analizuar hekuri duke përdorur metodën kolorimetrike me chromazurol B dhe analizatorin Minitelco. Ferritina është analizuar duke përdorur VidasFerritin kit, test automatik kuantitativ që përdor metodën ELFA. Transferrina është analizuar me metodën imunoturbidimetrike, aparatit Cobas 6000. TS është llogaritur me formulë. Analizat gjenetike janë analizuar me PCR-RFLP dhe Strip Assay. Ekstraktimi i ADN me QIAGEN dhe INVITROGEN DNA kit.

Rezultatet: Në 50 individët e shëndetshëm frekuenca e mutacioneve C282Y është 3% dhe frekuenca e H63D është 10%. Këto vlera janë të krahasueshme me mesataren e Europës. Në grupin e pacientëve u gjetën 38 (47,5%) me mutacione dhe 42 (53,5%) pa mutacione. Nga këto 18 janë C282Y heterozigotë (25,7%), 5 H63D heterozigotë (7,1%), 2 S65C heterozigotë (2,2%) dhe 13 (18,6%) përbërje heterozigote. Të tre grupet e gjenotipeve me mutacion kishin përqëndrime mesatare më të larta të Fe dhe TS në serum sesa 42 subjektet pa mutacione. Shumica e subjekteve kishin një ngopje fillestare të TS më të madhe se 55%. Nuk u gjetën gjenotipë homozigotë C282Y/C282Y që shkaktojnë sëmundjen. Kjo ka lidhje me stilin e jetesës.

Fjalët kyç: HFE, hemokromatoza, ferritin, Fe, transferrin e saturuar, C282Y, H63D, S65C.

Abstract

The purpose of this study is to identify patients and carriers with hemochromatosis in the Albanian population, through the analysis of the HFE gene and the use of biochemical analyzes of iron overload for the early diagnosis of the disease.

Materials and methods:

The study included 140 individuals: 50 healthy individuals and 90 (77 males and 13 females) patients with liver disease (cirrhosis, steatosis) hospitalized in the Gastrohepatology clinic at QSUT. Healthy individuals were analyzed for HFE gene genotypes. Patients were analyzed for parameters of iron overload, ferritin and saturated transferrin using 5ml of venous blood from each patient. 80 of the patients were also analyzed for the molecular analysis of the HFE gene using 5 ml blood with K3 EDTA.

Methods: Biochemical analyses. Iron was analyzed from the blood serum using the colorimetric method with chromazurol B and the Minitelco analyzer. Ferritin was analyzed using the VidasFerritin kit, an automatic quantitative test that uses the ELFA method. Transferrin was analyzed with the immunoturbidimetric method and the Cobas 6000 equipment. TS was calculated with the formula. Genetic analyzes were analyzed with PCR-RFLP and Strip Assay. DNA extraction with QIAGEN and INVITROGEN DNA kit.

Results: In 50 healthy individuals the frequency of C282Y mutations is 3% and the frequency of H63D is 10%. These values are comparable to the European average. In the group of patients, 38 (47.5%) with mutations and 42 without mutations were found. Of these, 18 are C282Y heterozygous (25.7%), 5 H63D heterozygous (7.1%), 2 S65C heterozygous (2.2%) and 13 (18.6%) heterozygous compounds. All three groups of single-mutation genotypes had higher mean serum Fe and TS concentrations than the 42 subjects without mutations. Most subjects had an initial TR saturation greater than 55%. No disease-causing C282Y/C282Y homozygous genotypes were found. This has to do with lifestyle.

Keywords: HFE gene, Hemochromatosis, Ferritin, Iron, Transferrin saturation, C282Y, H63D, S65C