

# Veitti mataræði fyrr á öldum vernd gegn arfgengri heilablæðingu í arfberum cystatin L68Q stökkbreytingarinnar?

Ástríður Pálsdóttir<sup>1</sup> lífefnafræðingur

Ásbjörg Ósk Snorradóttir<sup>2,3</sup> lífeindafræðingur

Hákon Hákonarson<sup>2,4,5</sup> læknir

<sup>1</sup>Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði, <sup>2</sup>læknadeild Háskóla Íslands, <sup>3</sup>meinafræðideild Landspítala, <sup>4</sup>The Center for Applied Genomics, Children's Hospital of Philadelphia, <sup>5</sup>Divisions of Human Genetics and Pulmonary Medicine, Department of Pediatrics, The Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania.

Fyrirspurnum svarar Ástríður Pálsdóttir, [astripal@hi.is](mailto:astripal@hi.is)

## ÁGRIP

Arfgeng heilablæðing (*hereditary cystatin C amyloid angiopathy, HCCAA*) er ríkjandi erfðasjúkdómur sem stafar af stökkbreytingu í cystatin C-geninu, *CST3*. Stökkbreytt cystatin C safnast upp í smáslagæðum heilans sem mýlildi og veldur síendurteknum heilablæðingum og dauða ungra arfbera.

Nýlega birtist grein um rannsókn á mögulegu meðferðarúrræði fyrir arfbera arfgengrar heilablæðingar sem byggist á inntöku á NAC (N-acetyl-cystein) til þess að auka magn glútathions í arfberum en glútathion leysir upp útfellingar af stökkbreyttu cystatin C. Áður hafði birst grein um lækun í ævilengd arfbera, á seinni hluta 19. aldar. Á sömu áratugum varð gjörbylting á mataræði Íslendinga. Í byrjun aldarinnar var matur mjög kolvetnasnauður og kolvetni komu aðallega úr mjólkurmat. Innflutningur á mjöli og sykri var óverulegur en átti eftir að aukast mjög mikið samkvæmt innflutningsskýrslum. Vegna skorts á salti var matur geymdur í gallsúrri mysu en smám saman kom salt í stað mysu sem aðferð til að geyma matvæli.

Í þessari grein er kannað hvort breyting í fæðuinnehaldi á 19. öld gæti hafa haft áhrif á glútathion-magn arfbera.

## Inngangur

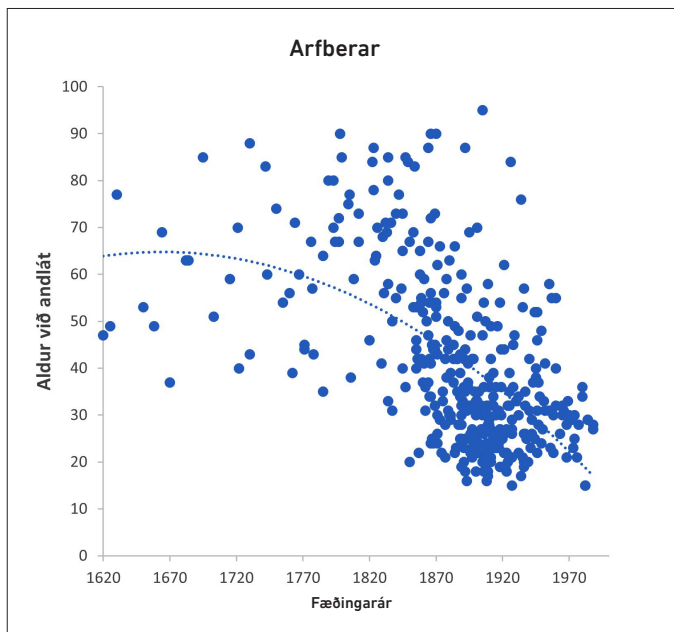
Arfgeng heilablæðing er alíslenskur erfðasjúkdómur sem finnst eingöngu hérlendis. Sjúkdómurinn erfist ríkjandi.<sup>1,2</sup>

Sjúkdómurinn stafar af stökkbreytingu í cystatin C (L68Q) geni, *CST3*, á 20. litningi mannsins.<sup>3</sup> Þessi stökkbreyting veldur uppsöfnun á stökkbreyttu cystatin C sem mýlildi og það leiðir til síendurtekinna heilablæðinga sem enda í fötlun og dauða hjá ungu fólki.<sup>1</sup> Bandvefsuppsöfnun einkennir smáslagæðaveggi í heilum sjúklinga með arfgenga heilablæðingu og mögulega á sú uppsöfnun þátt í sjúkdómsmyndinni.<sup>4-6</sup>

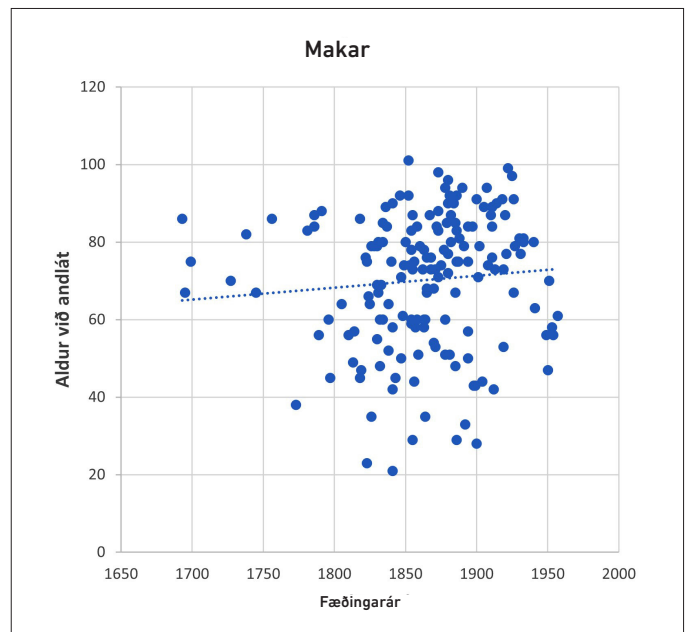
Talið er að L68Q-stökkbreytingin hafi orðið til fyrir 18 kynslóðum, eða um 1500.<sup>7</sup> Allir arfberar á Íslandi hafa sömu stökkbreytinguna sem bendir á sameiginlegan forföður. Þegar áttartré nútímaarfbera eru skoðuð aftur í tímann sést að skylduarfberar í byrjun 19. aldar lifðu jafn lengi og makar að meðaltali. Í rúm 300 ár hafði L68Q-stökkbreytingin í cystatin C-geninu engin áhrif á

heilsu og lífslíkur arfbera. Þar sem ekkert náttúruval virðist hafa verið til staðar, fjölgaði einstaklingum með stökkbreytinguna og þeir dreifðu sér. Síðari helming 19. aldar styttist meðalævilengd arfbera stöðugt þar til hún var komin niður í 30 ár og hefur haldist þannig síðan um 1900. Þessi lækun var mjög tölfræðilega marktæk.<sup>7</sup> Þessi áhrif til lækkunar ævilengdar voru svo sterk að oft létust foreldrar og afkvæmi á sama áratug.<sup>7</sup> Árni Árnason læknir, sem fyrstur lýsti sjúkdómnum,<sup>8</sup> tók eftir þessu og lýsti í doktorsritgerð sinni og einnig aðrir sem töldu þetta ekki tölfræðilega marktækt enda lýstu þeir aðeins einni ætt.<sup>9</sup>

Upprunalega voru 16 undirættir þekktar, dreifðar um Vestfirði, Vesturland og Suðurland. Elsti sameiginlegi þekkti forfaðir var Þórður Þórðarson frá Ingjaldshóli á Snæfellsnesi, fæddur 1684, sem flutti í Þykkvabæinn og er forfaðir Suðurlandsætta. Tekist hefur að rekja sumar ættir saman svo nú eru þær 14. Í aðeins 5



Mynd 1. Ævilengd arfbera með L68Q-stökkbreytinguna miðað við fæðingarár.



Mynd 2. Ævilengd maka arfbera miðað við fæðingarár.

ættum, að þekkt er, eru arfberar á lífi árið 2022. Í hinum ættunum hefur stökkbreytta genið dáið út vegna þess að arfberar létust ungir áður en þeir eignuðust afkvæmi. Mögulega eru óþekktar arfberaættir ófundnar. Nú eru í gagnagrunni 384 einstaklingar sem hafa nær örugglega erfð L68Q-stökkbreytinguna frá upphafi. Ætla má að álíka margir einstaklingar séu líklegir arfberar en hafa ekki verið prófaðir eða staðfestir.

**Foreldraáhrif**

Við athugun á ættum kom í ljós að þeir sem erfðu stökkbreytta genið frá móður lifðu að meðaltali 9,4 árum skemur en þeir sem fengu stökkbreytingu frá föður. Þessi munur kom fram um miðja 19. öldina, jókst út öldina og varð tölfræðilega marktækur.<sup>7</sup> Mögulega eru foreldraáhrifin einnig tengd fæðunni.

Þessi breyting í ævilengd varð samtímis í öllum undirættum á öllum svæðum þar sem sjúkdómurinn fannst, sem bendir til almennra umhverfispáttá.<sup>7</sup> Þó lækkaði ævilengd arfbera á Barðaströnd um það bil 20 árum seinna en annars staðar.<sup>7</sup>

Engin meðferð hefur verið til við arfgengri heilablæðingu en nýjar rannsóknir hafa gefið vonir um að meðferð geti verið við sjóndeildarhringinn. Í vísindatímaritinu *Nature Communications* (NC) birtist grein sem lýsir mögulegu meðferðarúrræði fyrir arfbera með L68Q-stökkbreytinguna í cystatin C geninu. Glútathíon og N-acetyl cystein (NAC), sem er forveri glútathíons, hindrar uppsöfnun cystatin C og brýtur fálíður (*oligomers*) L68Q-Cystatin C niður í einlíður (*monomers*).<sup>10</sup> Það er mikilvægt því fálíður eru taldar grunnbyggingaæiningar stærra mýlildis sem er þekkt að því að falla út í æðar og aðra líkamsvefi, sem einlíður gera ekki. Hægt er að kanna ástand uppsöfnunar á cystatin C í húð arfbera með því að ónæmislita fyrir cystatin C uppsöfnun í stungusýni úr húð þeirra.<sup>6</sup> Vegna nýrrar vitneskju var athyglisvert að kanna hvort glútathíon gæti mögulega tengst breytingum í fæðu á 19. öld.

**Aðferðir**

Í byrjun 19. aldar var mataræði Íslendinga mjög einhæft.<sup>11</sup> Fyrir utan fiskveiðar snerist landbúnaður aðallega um mjólkurafurðir, smjör, skyr og mysu. Salt var illfánlegt og því var matur geymdur í súrri mysu. Pynnt mysu var einnig notuð til drykkjar. Harðfiskur (skreið) var stór hluti af fæðunni, étinn með súru, gerjuðu smjöri. Kornmeti var allt innflutt, svo og sykur. Stuðst var við innflutningsskýrslur sem eru ítarlegar frá 1840. Innflutningur kolvetnaríks fæðis, sykurs, síróps og mjöls var skoðaður sérstaklega.<sup>12</sup>

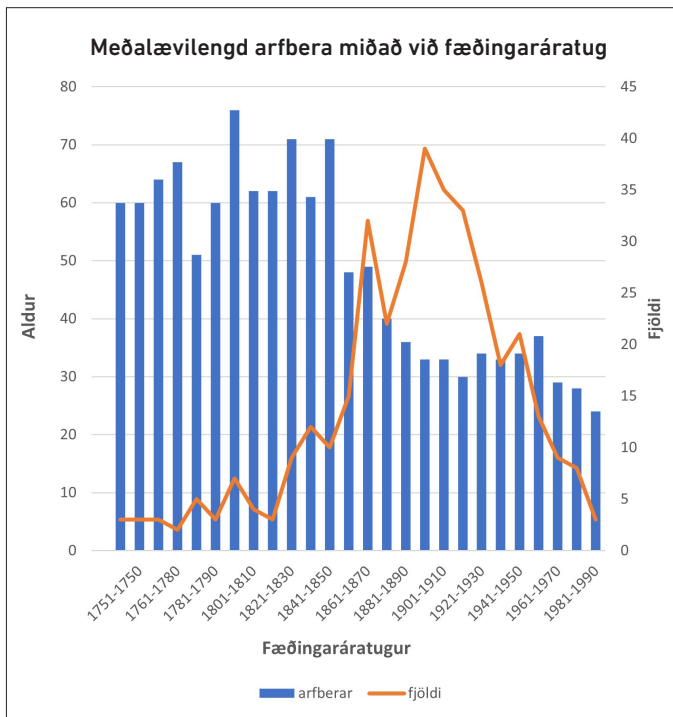
Ævilengd arfbera (384), ættingja og maka (173) var fengin úr kirkjubókum, gögnum úr Blóðbanka og Íslendingabók Íslenskrar erfðagreiningar.

Stundum var dánarorsök einstaklings skráð í kirkjubók. Eftir 1911 var farið að gefa út dánarvottorð lækna. Þau er nú hægt að nálgast hjá Embætti landlækni með leyfi frá vísindasiðanefnd. Einstaklingur í áhættu fékk skilgreininguna arfberi eingöngu ef dánarorsök var skráð sem slag eða heilablóðfall í kirkjubók eða dánarvottorði.

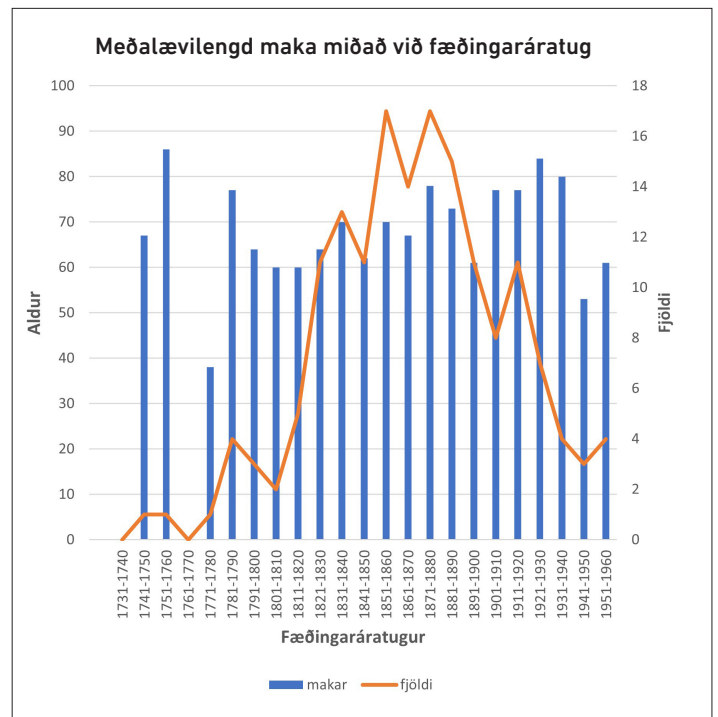
**Niðurstöður**

**Ævilengd**

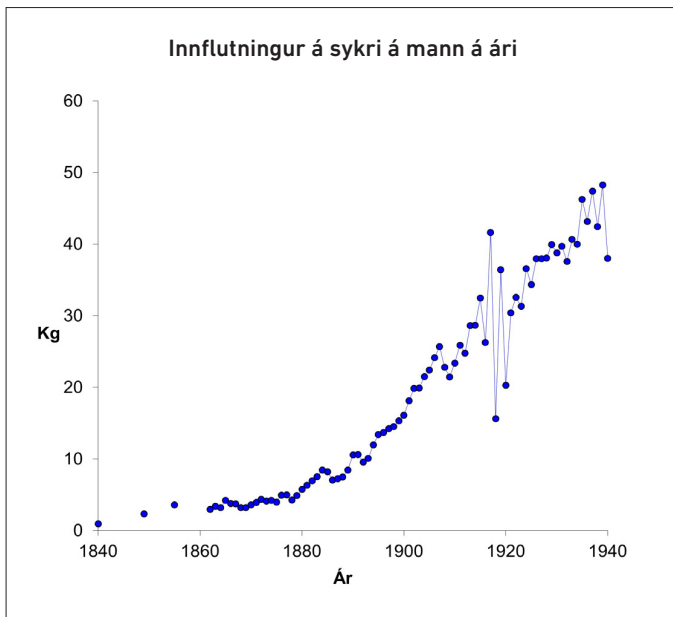
Mynd 1 sýnir lækun í ævilengd 384 arfbera yfir langt tímabil miðað við fæðingarár. Skylduarfberar voru skilgreindir sem einstaklingar sem vegna stöðu sinnar í ættartré voru mjög líklegir til að hafa erfð L68Q-stökkbreytinguna. Þarna sést að ævilengd arfbera styttist hratt eftir miðja 19. öld. Til samanburðar var ævilengd maka arfberanna á sama tímabili könnuð (mynd 2). Makar voru valdir sem viðmið því þeir bjuggu í sömu húsum og ekki óvarlegt að ætla að mataræði maka og arfbera hafi því yfirleitt verið mjög svipað. Það sést að í upphafi tímabilsins er ekki munur á ævilengd þessara tveggja hópa en um miðja 19. öld helst ævilengd maka stöðug á



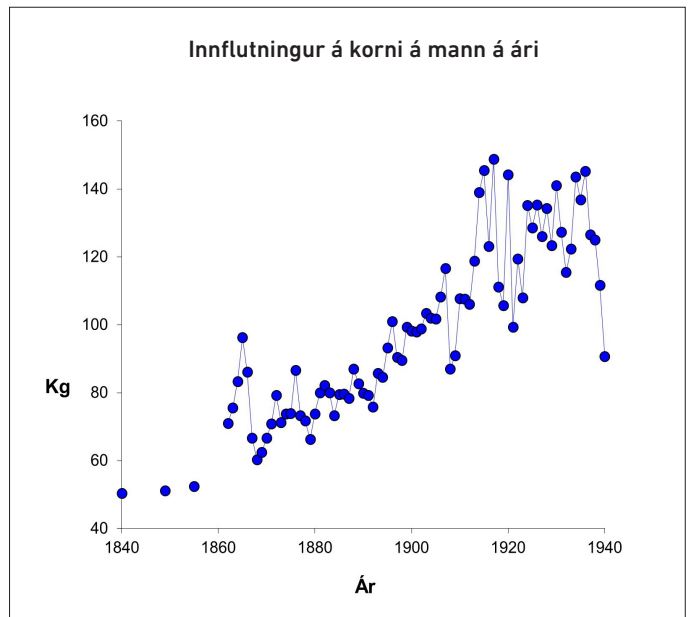
Mynd 3. Meðalævilengd arfbera miðað við fæðingaráratug og fjöldi arfbera á áratug.



Mynd 4. Meðalævilengd maka miðað við fæðingaráratug og fjöldi maka á áratug.



Mynd 5. Sykurinnflutningur á mann/ári.



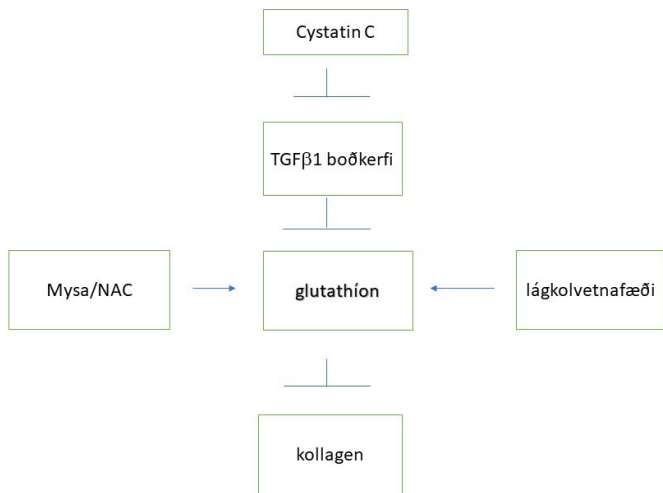
Mynd 6. Korninnflutningur á mann á mann/ári.

meðan ævilengd arfbera lækkar hratt. Sé meðalævilengd arfbera á hverjum fæðingarátug skoðuð, sést greinilega hvernig ævilengd þeirra stýttist hratt upp úr 1840 (mynd 3) en ævilengd maka þeirra stendur svo til í stað á sama tímabili (mynd 4).

**Breyting í mataræði**

Fæðuvenjur þjóðarinnar breyttust gríðarlega á 19. öld. Í upphafi aldarinnar var bændasamfélag á Íslandi þar sem flestir störfuðu við öflun matar. Kornyrkja lagðist af á 15. öld og eftir það þurfti

að flytja inn allt kornmeti. Það má álykta að innflutningstölur gefi nokkuð góða mynd af neyslunni. Í heild má segja að aðalfæði fólks hafi verið harðfiskur (skreið), súrt smjör og aðrar mjólkurafurðir, aðallega skyr og mysa.<sup>11</sup> Sé leiðrétt fyrir fjölda sést að sykurinnflutningur, sem væntanlega endurspeglar innanlandsneyslu, 50-faldaðist frá 1840 til 1940 (mynd 5). Í kringum 1840 var innflutningur á sykri/sírópi 900 g á mann á ári en var orðinn 50 kg í lok tímabilsins.<sup>12</sup> Á 19. öld jókst innflutningur kolvetnaríkrar fæðu (mynd 5 og 6).<sup>11,12</sup> Innflutningur á korni þrefaldaðist milli 1840 og



Mynd 7. Mögulegt samband glútathíons, fæðu og lækkunar í cystatin C-magni.

1940 (mynd 6) og fólk tók smám saman einnig að rækta sínar eigin kartöflur og kál. Hlutfall orku úr kolvetni jókst úr um það bil 25% um 1795 í um það bil 50% um 1940. Þar hefur mjólkursykur skipt mestu máli í upphafi tímabils. Samtímis minnkaði orka úr dýra-afurðum jafnframt úr um það bil 85% í um það bil 50% á sama tíma.<sup>11</sup>

Því má áætla að Íslendingar hafi breytt kolvetnisneyslu sinni meira á tímabilinu en aðrar þjóðir sem ræktuðu korntegundir, grænmeti og ávexti.

### Umfjöllun

Nærtækasta skýringin á umhverfisáhrifunum er breyting á mataræði á Íslandi á sama tíma og ævilengd arfbera fór að styttest.

Í mænuvökva sjúklinga með arfgenga heilablæðingu er magn cystatin C lægra en í heilbrigðum einstaklingum<sup>13</sup> og var það notað til sjúkdómsgreiningar áður en DNA-greiningarpróf fyrir sjúkdóminum kom til.<sup>3</sup> Þar sem cystatin C temprar virkni TGFβ vaxtarþáttar með því að bindast viðtaka þess (TGFβRII)<sup>14</sup> gæti lækkun á cystatin C-magni valdið þeirri auknu bandvefsuppsöfnun sem sést í heilaeðum og húð arfbera.<sup>4,6</sup> Önnur afleiðing af ofvirkum TGFβ-vaxtarþætti er lækkun glútathíons.<sup>15,16</sup> Á hinn bóginn minnkar glútathíon bandvefsuppsöfnun af völdum TGFβ og Smad3<sup>15,17</sup> (mynd 7). Smad 2/3 ónæmslitun er áberandi í húðsýnum arfbera<sup>6</sup> sem bendir til að virkjun á TGFβ-ferlum sé að verki í heilaeðum og húð hjá sjúklingum með arfgenga heilablæðingu.

Glútathíon-magn í arfberum hefur ekki verið mælt en mögulega var það hærra á fyrri hluta 19. aldar áður en mataræði á Íslandi varð „evrópskara“. Tvennt gæti hafa stuðlað að því. Í fyrsta lagi var þessi lágkolvetnafæða ketógenísk (*ketogenic*) vegna skorts á sykri og lítilli neyslu kolvetna. Slíkt mataræði eykur glútathíon-framleiðslu.<sup>18</sup> Jafnframt lækkar sykur glútathíon framleiðslu í frumum.<sup>19</sup> Annað líklega mjög mikilvægt atriði var hin almenna notkun á súrri mysu við varðveislu matar áður en salt varð útbreiddara. Mysa er mjög rík af aminosýrunni cystein, sem er ein þriggja aminosýra í glútathíon og mysuprótein auka magn glútathíons.<sup>20</sup> Mysa var drukkin, þynnt með vatni. Nýmjólk var ekki drukkin. Til þess var hún of dýrmæt fyrir smjör- og skyrframleiðslu og til að framleiða súra mysu. Það er mögulegt að nútímamataræði, sem varð algengt á 19. öld, hafi aukið sýnd stökkbreytingarinnar á tvennan hátt. Í fyrsta lagi dró mikið úr notkun mysu til þess að geyma mat og notkun mysu til drykkjar. Í öðru lagi jókst sykur og mjölinnflutningur hratt og við það lækkaði glútathíon í frumum þegar mataræðið var ekki lengur ketógenískt.<sup>15</sup> Þegar magn glútathíons hafði lækkað hamlaði það ekki lengur bandvefsuppsöfnun.<sup>20</sup>

Slíkt fæði gæti hafa haft í för með sér áhrif á glútathíon-gildi í blóði þar sem neysla sykurs veldur lækkun á glútathíon-framleiðslu í frumum.<sup>19</sup> Þar sem cystatin C er þekkt að því að tempra virkni TGFβ-vaxtarþáttarins, sem veldur aukinni bandvefsuppsöfnun,<sup>14</sup> má áætla að slík bandvefs- og millifrumuefni (mynd 7) geti sest í heilaeðar og aðra líkamsvefi arfbera.

### Samantekt

Það er áhugavert að sjá að breyting frá ketógenísku mataræði Íslendinga yfir í kolvetnaríkt fæði gæti hafa haft þessi miklu áhrif á sýnd L68Q-arfgerðarinnar, sem leiddi til þess að lífslíkur arfbera urðu nær helmingi minni yfir nær tveggja alda tímabil frá miðri 19. öld til dagsins í dag. Þessar upplýsingar styðja þá kenningu að aukning á glútathíoni, sem er ketógenískur miðill, geti snúið þessu ferli við, að minnsta kosti að hluta til. Fyrstu niðurstöður þess efnis voru nýlega birtar af March,<sup>10</sup> og sýna að N-acetylcystein, forveri glútathíons, dregur úr útfellingum á mýlildi í húð og má telja líklegt að sú niðurstaða endurspegli líka minnkun á útfellingum í heilaeðum og heilavef og geti komið í veg fyrir heilablæðingar og tengd áföll og aukið lífslíkur þessara einstaklinga.

### Þakkir

Starfsfólki Þjóðskjalasafns er þökkuð hjálp við að lesa kirkjubækur og Birki Þór Bragasyni og Bjarnheiði Guðmundsdóttur þakkaður yfirlestur.

Greinin barst til blaðsins 1. apríl 2022, samþykkt til birtingar 7. nóvember 2022.

## Heimildir

- Palsdóttir A, Snorraddóttir AO, Thorsteinsson L. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: genetic, clinical, and pathological aspects. *Brain Pathol* 2006; 16: 55-9.
- Olafsson I, Thorsteinsson L, Jensson O. The molecular pathology of hereditary cystatin C amyloid angiopathy causing brain hemorrhage. *Brain Pathol* 1996; 6: 121-6.
- Palsdóttir A, Abrahamson M, Thorsteinsson L, et al. Mutation in cystatin C gene causes hereditary brain haemorrhage. *Lancet* 1988; 2: 603-4.
- Snorraddóttir AO, Isaksson HJ, Kaeser SA, et al. Deposition of collagen IV and aggrecan in leptomeningeal arteries of hereditary brain haemorrhage with amyloidosis. *Brain Res* 2013; 1535: 106-14.
- Snorraddóttir AO, Isaksson HJ, Kaeser SA, et al. Parenchymal cystatin C focal deposits and glial scar formation around brain arteries in Hereditary Cystatin C Amyloid Angiopathy. *Brain Res* 2015; 1622: 149-62.
- Snorraddóttir AO, Isaksson HJ, Ingthorsson S, et al. Pathological changes in basement membranes and dermal connective tissue of skin from patients with hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Lab Invest* 2017; 97: 383-94.
- Palsdóttir A, Helgason A, Palsson S, et al. A drastic reduction in the life span of cystatin C L68Q carriers due to life-style changes during the last two centuries. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000099.
- Arnason A 1935. *Acta Psychiatr Neurol Suppl* VII
- Guðmundsson G, Hallgrímsson J, Jonasson TA, et al. Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis. *Brain* 1972; 95: 387-404.
- March ME, Gutierrez-Uzquiza A, Snorraddóttir AO, et al. NAC blocks Cystatin C amyloid complex aggregation in a cell system and in skin of HCCAA patients. *Nat Commun* 2021; 12: 1827.
- Jonsson G. Changes in food consumption in Iceland 1770-1940. *Scand History Re* 1997; XLVI: 24-41.
- Jonsson G, Magnússon M. Hagskinna: Icelandic historic statistics. *Statistics Iceland*. 1998.
- Jensson O, Guðmundsson G, Arnason A, et al. Hereditary cystatin C (gamma-trace) amyloid angiopathy of the CNS causing cerebral hemorrhage. *Acta Neurol Scand* 1987; 2: 102-14.
- Sokol JP, Schiemann WP. Cystatin C antagonizes transforming growth factor beta signaling in normal and cancer cells. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 183-95.
- Liu RM, Liu Y, Forman HJ, et al. Glutathione regulates transforming growth factor-beta-stimulated collagen production in fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L121-8.
- Liu RM, Gaston Pravia KA. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 1-15.
- Ono A, Utsugi M, Masubuchi K, et al. Glutathione redox regulates TGF-beta-induced fibrogenic effects through Smad3 activation. *FEBS Lett* 2009; 583: 357-62.
- Jarrett SG, Milder JB, Liang LP, et al. The ketogenic diet increases mitochondrial glutathione levels. *J Neurochem* 2008; 106: 1044-51.
- Urata Y, Yamamoto H, Goto S, et al. Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 15146-52.
- Kent KD, Harper WJ, Bomser JA. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 2003; 17: 27-33.

## ENGLISH SUMMARY

doi 10.17992/Ibl.2022.12.721

## Did ketogenic diet in past centuries protect against the consequence of the cystatin L68Q mutation in carriers of HCCAA?

Ástríður Pálsdóttir<sup>1</sup>Ásbjörg Ósk Snorraddóttir<sup>2,3</sup>Hákon Hákonarson<sup>2,4,5</sup>

<sup>1</sup>Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Reykjavík, Iceland, <sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Iceland, Reykjavík, Iceland, <sup>3</sup>Department of Pathology, Landspítali University Hospital, Reykjavík, Iceland, <sup>4</sup>The Center for Applied Genomics, Children's Hospital of Philadelphia, <sup>5</sup>Divisions of Human Genetics and Pulmonary Medicine, Department of Pediatrics, The Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania.

Correspondence: Ástríður Pálsdóttir, [astripal@hi.is](mailto:astripal@hi.is)

**Key words:** *n-acetylcysteine, HCCAA, cystatin C, amyloid, L68Q, glutathione.*

Hereditary cystatin C amyloid angiopathy (HCCAA) is a dominantly inherited disease caused by a mutation (L68Q) in the cystatin C gene, *CST3*. Mutant cystatin C protein accumulates as amyloid in arterioles in the brain leading to repeated brain hemorrhages and death of young carriers.

Recently a possible treatment option was reported for HCCAA carriers involving an oral treatment with N-acetyl-cysteine in order to increase glutathione which was found to dissolve aggregates of mutant cystatin C. An earlier study described how the life span of carriers of the L68Q mutation shortened in the latter half of the 19th century. During the same decades a drastic change occurred in the diet in Iceland. In the beginning of the century the diet was simple and low in carbohydrates, which mostly came from milk products. Import of grains and sugar was limited, but increased greatly according to import records. Due to lack of salt, food was preserved in acid whey, but gradually salt replaced whey as means of preserving food.

This study aims to explore if changes in the diet of Icelanders during the same decades could possibly affect the amount of glutathione in people.