

CURRICULUM VITAE

Nume: TIRZIU
Prenume: SIMONA ELENA
Adresa : Cluj-Napoca, str.Plopilor nr.73, Bl.P11, Sc.2, ap.25,
cod poștal 400383
E-mail : tardsimona@yahoo.com
**Data și locul
nașterii** 9 aprilie 1976
Râmnicu Vâlcea

Experiența profesională

- 2009** Diplomă de studii universitare „Hépatites virales, cytokines et anti-viraux” la Spitalul Universitar Pitie-Salpetriere, Paris, Franța
- 2007 până
în prezent** Medic specialist (Praticien contractuel) pe secția Gastroenterologie a Spitalului Inter-regional din Vesoul, Franța
- 2007** Curs de Competență în Ultrasonografie Generală la Clinica Medicală III din Cluj-Napoca finalizat prin Diplomă de Competență în Ultrasonografie Generală
- 2006** Diplomă de Medic Specialist în Medicină Internă în urma concursului național cu media 9.33
- 2005-2006** Stagiul de Gastroenterologie în Clinica Medicală III din Cluj-Napoca în cadrul rezidențiatului pe specialitatea Medicină Internă
- 2003-2005** Diplomă d'Attestation d'Etudes Spécialisée en Hepato-Gastroenterologie în secția de Hepatogastroenterologie a Spitalului Universitar din Besançon, Franța
- 2002-2009** Doctorandă în Gastroenterologie pe tema « Rolul eredității și al factorilor de risc de mediu în litiiza biliară colesterolică »
- 2002-2003** Stagii în cadrul rezidențiatului pe specialitatea Medicină Internă
- 2001-2002** Stagiul de pregătire în departamentul de Gastroenterologie al Clinicii Medicale III din Cluj-Napoca

- 2000-2001** Masterat de Informatică Medicală
- 1994-2000** Facultatea de Medicină și Farmacie « Iuliu Hațieganu » din Cluj-Napoca, burse de merit 1994/1995, 1995/1996, 1998/1999
- 1999** Bursă Erasmus pentru un stagiu de trei luni la Grenoble, pe secția de Medicină Internă-Geriatrie a Spitalului Universitar din Grenoble, Franța
- 1990-1994** Liceul de Matematică Fizică „Mircea cel Batrân” Râmnicu Vâlcea, cu media 10 la examenul de bacalaureat

Activitate științifică

- 2008** colaborator la monografia "Litiaza biliară colesterolică-de la epidemiologie la genetică"-autor Prof. Dr. Monica Acalovschi, Editura Clusium 2008
- 2008** „ Risk factors for gallstone disease in patients with gallstones having gallstone heredity-a case-control study” – S.Tirziu și colab, Romanian Journal of Internal Medicine 2008
- 2007** „Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol”-F. Grunhage, M.Acalovschi, S.Tirziu et al., Hepatology 2007
- 2007** „Factori de risc pentru litiaza biliară colesterolică-referate generale” – S.Tirziu, M.Acalovschi, articol *in extenso* publicat în Revista de Medicină Internă 2007
- 2007** Asocierea între polimorfismele genelor ABCG5/ABCG8 și nivelele plasmatiche ale lipidelor la perechi de frați cu litiază biliară”- premiul I la sesiunea de comunicări orale la Al 28-lea Simpozion Național de Gastroenterologie, Hepatologie și Endoscopie Digestivă, Sibiu

- 2006** Rolul genei ABCB4 în patogeneza litiazei biliare simptomatice-poster
Tîrziu S, Acalovschi M, Bresson-Hadni S. Al doilea Congres Național
de Genetică Medicală, Cluj-Napoca 2006
- 2005** „Echinococose alveolaire peritoneale : deux observations”- poster
S.Tirziu și colab. expus la Congresul Societății Naționale de
Parazitologie, Besancon, Franța
- 2004-2005** Sesiuni de comunicări științifice pe regiunea Nord-Est a Franței :
2004-Dijon „ Enterita radică ” ; 2005-Reims „Gastrite de cauze rare” ;
2005-Besancon „Rolul salicilaților în bolile inflamatorii intestinale”
- 2002** „ Corelația între simptomele de reflux gastro-esofagian și semnele
endoscopice de esofagită ”- Simpozionul Național de
Gastroenterologie, Hepatologie și Endoscopie Digestivă, Cluj-Napoca
- 2001** „Studiul morfometric al poligonului lui Willis la embrioni”- Sesiunea
de comunicări științifice de la Facultatea de Medicină și Farmacie
„Iuliu Hațieganu ”, Cluj-Napoca
- 2000** „Variații ale calibrului segmentelor arteriale ale poligonului lui Willis
la embrioni”- Sesiunea de comunicări științifice de la Facultatea de
Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu ”, Cluj-Napoca
- 1998** Premiul al doilea la concursul pe teme de Farmacologie « Eli
Lilly&Alsifcom »

Limbi străine:

- Franceză : Diplomă de Studii Aprofundate în limba Franceză la Centrul Cultural
Francez din Cluj-Napoca în 1999
- Engleză : Diplomă de Cambridge 2003

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT
„ROLUL EREDITĂȚII ȘI AL FACTORILOR DE RISC DE MEDIU ÎN
LITIAZA BILIARĂ COLESTEROLICĂ”**

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC: PROF. DR. MONICA ACALOVSCI

DOCTORAND : TIRZIU SIMONA-ELENA

Cuvinte cheie: litiaza biliară colesterolică-gene-ABCG5-ABCG8-polimorfisme-obezitate-hipertrigliceridemia-HDL-colesterol-diabet-factori de risc de mediu

CUPRINS

Prefață	4
I. Introducere	6
II. Litiaza biliară colesterolică - date de epidemiologie	7
III. Noțiuni de fiziologie	8
IV. Patogeneza litiazei biliare colesterolice	11
V. Factorii de risc pentru litiaza biliară colesterolică	14
V.1. Factorii de risc de teren în litiaza biliară colesterolică	14
V.1.1. Factorul genetic	14
V.1.1.1. Agregarea familială	15
V.1.1.2. Variații populaționale	16
V.1.1.3. Bazele genetice ale susceptibilității pentru litiaza biliară colesterolică	17
V.1.1.3.A. Susceptibilitatea monogenică	18
V.1.1.3.B. Susceptibilitatea poligenică	23
V.1.1.4. Aplicații clinice ale informației genetice	41
V.1.1.5. Perspective	43
V.1.2. Vârsta	43
V.1.3. Sexul	45
V.1.4. Sarcina	45
V.1.5. Obezitatea	46
V.1.6. Scăderea bruscă în greutate	48
V.1.7. Dislipidemiile	49
V.1.8. Diabetul zaharat	50
V.1.9. Sindromul metabolic	52
V.1.10. Bolile inflamatorii intestinale	52
V.2. Factori de risc de mediu în litiaza biliară colesterolică	53
V.2.1. Medicamente	53
V.2.2. Dieta	56
V.2.3. Fumatul	60
V.2.4. Sedentarismul	61
V.2.5. Statusul socio-economic și nivelul educațional	62
V.2.6. Speciile de Helicobacter	62

Cercetări personale	63
I. Gena <i>ABCG8</i> care codifică transportorul hepatic de colesterol - factor de risc pentru litiaza biliară la om-studiu pe perechi de frați cu litiază biliară	64
I.1. Introducere	64
I.2. Obiective	65
I.3. Material și metode	65
I.4. Rezultate	73
I.5. Discuții	82
I.6. Concluzii	87
II. Asocierea polimorfismelor genelor <i>ABCG5</i> și <i>ABCG8</i> cu valorile plasmatice ale lipidelor la pacienții cu litiază biliară și la subiecții fără litiază biliară	88
II.1. Introducere	88
II.2. Obiectivul studiului	89
II.3. Material și metode	89
II.4. Rezultate	93
II.5. Discuții	127
II.6. Concluzii	140
II.6.1. Concluzii la studiul lotului IIA	140
II.6.2. Concluzii la studiul lotului IIB	140
II.6.3. Concluziile finale	141
III. Factorii de risc de mediu și de teren asociați cu litiaza biliară-studiu caz-martor-	142
III.1. Introducere	142
III.2. Obiectivele studiului	142
III.3. Material și metode	143
III.4. Rezultate	145
III.5. Discuții	162
III.6. Concluzii	173
IV. Factorii de risc de teren și de mediu asociați cu litiaza biliară-studiu pe perechi de frați cu litiază biliară	175
IV.1. Introducere	175
IV.2. Obiectivele studiului	175
IV.3. Material și metode	175
IV.4. Rezultate	178
IV.5. Discuții	194
IV.6. Concluzii	197
V. Concluzii generale și contribuții personale	199
VI. Bibliografie	202

I. Introducere

Lucrarea de doctorat cu titlul „Rolul eredității și al factorilor de risc de mediu în litiaza biliară colesterolică” este centrată pe rolul factorului genetic în patogeneza litiazei biliare colesterolice la om.

II. Litiaza biliară-epidemiologie

Litiaza biliară prezintă variații geografice, prevalența acestei afecțiuni fiind ridicată în țările industrializate din Europa, America de Nord și America de Sud. În țara noastră datele despre prevalența litiazei biliare au fost obținute pe baza rezultatelor

necropsiilor efectuate în Cluj-Napoca și care au arătat o prevalență acestei afecțiuni de 7,6% la bărbați și de 16,9% la femei.

III. Noțiuni de fiziologie

Secreția biliară a lipidelor și a bilirubinei se realizează prin procese controlate de proteine transportor dependente de ATP. Proteinele ABCG5 și ABCG8 sunt proteine transportori și formează heterodimeri ce restricționează absorbția intestinală și stimulează secreția biliară de steroli.

IV. Patogeneza litiazei biliare colesterolice

Se cunosc patru mecanisme responsabile de formarea calculilor de colesterol: suprasaturarea în colesterol a bilei; accelerarea nucleației cristalelor de colesterol; hipomotilitatea (staza) veziculei biliare; hipomotilitatea intestinală.

V. Factorii de risc pentru litiaza biliară colesterolică

Litiaza biliară este o afecțiune complexă, ce rezultă din interacțiunea dintre gene multiple și din interacțiunea genelor cu un mediu litogenetic.

V.1. Factori de risc nemodificabili și boli asociate

Sunt reprezentați de: factorul genetic, vârsta avansată, sexul feminin, sarcina, obezitatea și scăderea bruscă în greutate, hipertrigliceridemia, diabetul zaharat, sindromul metabolic.

V.1.1. Factorul genetic

Rolul factorului genetic este demonstrat de studii care evidențiază agregarea familială a acestei boli, de studiile pe gemeni monoziгоți/diziгоți, precum și de diferențele etnice în prevalența litiazei biliare.

Situațiile în care există o singură mutație genetică responsabilă de formarea calculilor biliari de colesterol sunt rare: genele ce codifică transportorii de fosfatidilcolină (ABCB4) sau de săruri biliare (ABCB11), colesterol 7 α -hidroxilaza (CYP7A1) și receptorul de tip A al colecistokininei (CCK1R). Dintre acestea, cea mai cunoscută este gena *ABCB4* ce codifică o proteină membranară din clasa ABC-transportorilor situată la polul canalicular al hepatocitului, cu rol de translocare a fosfatidilcolinei în bilă. Rosmorduc și colab. au constatat asocierea mutațiilor genei *ABCB4* cu fenotipul litiazei biliare simptomatice și recurente la tineri și au descris o nouă entitate clinică denumită „low phospholipid-associated cholelithiasis”.

Susceptibilitatea genetică pentru formarea calculilor de colesterol este multifactorială și este demonstrată de studii pe modelul animal. Pentru identificarea genelor care conferă susceptibilitate la formarea calculilor de colesterol (genele *LITH*) se folosește tehnica genetică numită locusul trăsăturilor cantitative (“**quantitative trait locus**”-QTL). Prin această metodă se identifică, localizează și estimează efectele genelor implicate în trăsături complexe, precum litiaza biliară. Cercetările s-au îndreptat spre acele gene care pot influența formarea calculilor de colesterol și acestea au fost numite „gene candidate”. Există șase clase majore de gene candidate care codifică enzime, proteine transportori, receptori, proteine pronucleare. În cadrul clasei de gene candidate

care codifică transportori, o abordare mai amplă am acordat-o genelor *ABCG5* și *ABCG8* care codifică proteinele *ABCG5* și *ABCG8* implicate în transportul hepatic și intestinal de colesterol. Cele două proteine funcționează ca heterodimer și au rolul de a limita absorbția intestinală și de a promova excreția biliară a sterolilor neutrii. Polimorfismele genelor *ABCG5* și *ABCG8* pot avea efecte importante asupra metabolismului sterolilor și pot contribui la variația inter-individuală a concentrației plasmatice a fitosterolilor.

Pe modelul animal, au fost identificate 23 de locusuri litogenice *lith* care conțin gene candidate pentru litiaza biliară. Genele *Abcg5* și *Abcg8* care codifică proteinele transportori *ABCG5* și *ABCG8* se află pe locusul lithogenic murin *Lith 9*. Până în prezent, au fost identificate doar două locusuri litogenice la om.

V.1.2. Vârsta

Studiile epidemiologice au arătat că prevalența litiazei biliare crește liniar cu vârsta.

V.1.3. Sexul

Majoritatea studiilor epidemiologice au arătat că litiaza biliară este mai frecventă la femei decât la bărbați datorită modificărilor hormonale.

V.1.4. Sarcina

Aceleași mecanisme hormonale explică și faptul că sarcina favorizează dezvoltarea litiazei biliare.

V.1.5. Obezitatea, scăderea bruscă în greutate și dislipidemiile

Obezitatea este un factor de risc important, evidențiat prin asocierea liniară între indicii de masă și incidența acestei afecțiuni. Mecanismele patogenetice ce stau la baza asocierii dintre obezitate și formarea calculilor de colesterol sunt suprasaturarea în colesterol a bilei și scăderea motilității veziculei biliare. Scăderea bruscă în greutate a pacienților obezi este frecvent asociată cu formarea calculilor de colesterol. Nivelul plasmatic crescut de trigliceride și concentrația scăzută a HDL-colesterolului sunt factori de risc ce se corelează semnificativ cu riscul de litiază biliară.

V.1.8. Diabetul zaharat și sindromul metabolic

Diabetul zaharat favorizează formarea calculilor colesterolici datorită hiperinsulinemiei ce determină creșterea saturației în colesterol a bilei și scăderea motilității veziculei biliare. Studii epidemiologice au arătat o asociere semnificativă între componentele sindromului metabolic și formarea calculilor biliari de colesterol.

V.2. Factori de risc de mediu în litiaza biliară colesterolică

Factorii de risc de mediu cuprind: hipolipemiantele, dieta hipercalorică, hidrații de carbon rapid absorbabili, dieta săracă în fibre vegetale, abținerea la alcool, fumatul, sedentarism.

V.2.1. Medicamente

Fibrații sunt medicamente hipolipemiante ce produc suprasaturarea în colesterol a bilei și conduc la formarea calculilor biliari. Estrogenii și contraceptivele orale ce conțin

doze mari de estrogeni cresc riscul de dezvoltare a calculilor biliari prin creșterea sintezei hepatice de colesterol.

V.2.2. Dieta

Factori din dietă precum aportul caloric crescut, acizii grași saturați, carbohidrații rafinați se asociază cu risc crescut de formare a calculilor biliari. Factori precum acizii grași nesaturați, regimul bogat în fibre vegetale, cafeaua sau consumul moderat de alcool sunt factori protectori pentru litogeneză.

V.2.3. Fumatul, sedentarismul, statussocio-economic, specii de Helicobacter

Fumatul, sedentarismul, statusul socio-economic, sunt factori de mediu asociați cu risc crescut de litiază biliară. Speciile de Helicobacter sunt implicate în formarea calculilor biliari pe modelul anima, dar această ipoteză nu s-a confirmat la om.

Cercetări personale

Partea a doua a lucrării este dedicată cercetării personale și cuprinde patru capitole corespunzătoare a patru studii.

I. Gena *ABCG8* care codifică transportorul hepatic de colesterol - factor de risc pentru litiaza biliară la om-studiu pe perechi de frați cu litiază biliară

Primul studiu a studiat efectele polimorfismelor genelor *ABCG5/ABCG8* asupra susceptibilității la litogeneză pe perechi de frați cu litiază biliară și la martori fără litiază biliară, folosind analiza genetică de linkage. Pacienții cu litiază biliară și martorii fără litiază au fost recrutați prospectiv din Clinica Medicală III a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu“ din Cluj-Napoca, în perioada noiembrie 2002-aprilie 2006. Izolarea ADN-ului s-a efectuat Universitatea Babes-Bolyai din Cluj-Napoca. Analiza genetică a fost realizată în continuare în laboratorul de genetică al Universității din Bonn, Germania, sub îndrumarea Profesorului Frank Lammert. Am inclus în studiu 178 de frați cu litiază biliară aparținând la 84 de familii și 70 de martori fără antecedente personale sau heredocolaterale de litiază biliară. Acest studiu de linkage genetic și de asociație arată contribuția variantei D19H a genei *ABCG8* care codifică transportorul hepatobiliar al colesterolului la formarea calculilor biliari de colesterol. Am demonstrat în acest studiu că polimorfismul D19H al genei *ABCG8* contribuie cu 8% la riscul total de dezvoltare a litiazei biliare în populația generală și cu 30% la riscul pentru litiază biliară dat de factorul genetic. Rezultatele studiului nostru sunt comparabile cu cele al studiului de analiză genomică realizat în Germania care localizează susceptibilitatea la litogeneză la nivelul aceluiși polimorfism. În plus, studiul nostru a confirmat pentru prima dată în literatură, asocierea unui locus litogenic murin (*Lith 9*, care cuprinde genele murine candidate *Abcg5* și *Abcg8*) cu riscul de litiază biliară la o populație umană.

II. Asocierea polimorfismelor genelor *ABCG5* și *ABCG8* cu valorile plasmatiche ale lipidelor la pacienții cu litiază biliară și la subiecții fără litiază biliară

Al doilea studiu a evaluat asocierea între polimorfismele genelor *ABCG5* și *ABCG8* cu nivelele plasmatiche ale lipidelor la pacienții cu antecedente personale și

heredocolaterale de litiază biliară și la subiecți fără litiază biliară. Am inclus 108 pacienți cu litiază biliară și 259 de subiecți fără antecedente personale sau heredocolaterale de litiază biliară. Purtătorii alelei comune au fost comparați cu purtătorii alelei minore atât la pacienți cât și la martorii fără litiază biliară. Nu s-au constatat diferențe semnificative statistice ale vârstei medii, IMC-ului, ale distribuției pe sexe, ale valorilor trigliceridelor serice, ale colesterolului, HDL-colesterolului sau ale glicemiei între homozigoții pentru alela majoră și purtătorii alelei minore a polimorfismelor genelor *ABCG5* și *ABCG8* la pacienții cu litiază biliară. Aceste rezultate arată că polimorfismele genelor *ABCG5* și *ABCG8* nu s-au corelat semnificativ cu valorile plasmatiche ale trigliceridelor, colesterolului, HDL-colesterolului la pacienții cu litiază biliară, deși pe un lot mai redus de pacienți au fost evidențiate corelații semnificative. Acest fapt arată că sunt necesare loturi mai ample de pacienți pentru a evidenția astfel de corelații pentru studiile de asociație. La pacienții cu litiază biliară, în analiză multivariată, prin ajustare după vârstă și IMC, polimorfismul Y54C al genei *ABCG8* singur sau în asociație cu litiaza biliară a avut o influență semnificativă asupra nivelului glicemiei bazale.

La subiecții fără litiază biliară nu s-au constatat diferențe semnificative statistice ale valorilor IMC-ului ale între homozigoții alelele majore sau purtătorii alelei minore ale polimorfismelor studiate. Polimorfismul T400K al genei *ABCG8* s-a corelat semnificativ cu sexul masculin la subiecții fără litiază biliară, iar polimorfismul Q604E al genei *ABCG5* s-a corelat semnificativ cu concentrația plasmatică a colesterolului. Polimorfismul T400K al genei *ABCG8* s-a corelat semnificativ cu nivelul plasmatic de LDL-colesterol la subiecții fără litiază biliară, în timp ce în studii din literatură pe alte populații, acest polimorfism s-a asociat semnificativ cu nivelul trigliceridelor serice.

Am constatat o prevalență semnificativ crescută a purtătorilor alelei minore 604E a polimorfismului Q604E al genei *ABCG5* și a purtătorilor alelei minore 19H a polimorfismului D19H al genei *ABCG8* la pacienții cu litiază biliară față de martorii fără litiază biliară. Prevalența polimorfismelor Y54C, T400K și A632V ale genei *ABCG8* a fost similară la pacienții cu litiază biliară și la martorii fără litiază biliară. Frecvențele genotipurilor polimorfismelor genelor *ABCG5/ABCG8* sunt aproximativ similare la loturile studiului nostru cu populațiile europene, dar sunt diferite semnificativ statistic la pacienții cu litiază biliară din studiu față de pacienții cu litiază biliară din populația asiatică.

III. Factorii de risc de mediu și de teren asociați cu litiaza biliară-studiu caz-martor

În al treilea studiu am urmărit principalii factori de risc de mediu și de teren cunoscuți a avea o influență semnificativă asupra formării calculilor de colesterol. Am realizat un studiu caz-martor în care am inclus 109 pacienți cu antecedente personale și heredocolaterale de litiază biliară (cu frați afectați) și 271 de martori fără litiază biliară.

În studiul nostru, pacienții cu litiază biliară au avut vârsta medie similară cu a martorilor, fapt datorat criteriilor de includere în studiu a martorilor, aceștia fiind selectați

potrivit după vârstă și sex cu pacienții. Totuși au existat semnificativ mai mulți pacienți cu litiază biliară cu vârsta peste 60 de ani față de martori și acest lucru confirmă creșterea prevalenței acestei afecțiuni după 60 ani dovedită de studii populaționale. În studiul nostru media numărului de sarcini la pacientele cu litiază biliară a fost similară cu a pacientelor din grupul de martori. IMC-ul a avut un efect semnificativ asupra riscului de litiază biliară, atât în analiză univariată cât și în analiză multivariată. Hipetrigliceridemia și scăderea HDL-colesterolului sunt factori de risc pentru litiaza biliară: 1) nivelele plasmatică ale trigliceridelor semnificativ mai mari și ale HDL-colesterolului semnificativ mai reduse la pacienții cu litiază biliară față de martori; 2) prevalența hipertrigliceridemiei semnificativ mai mare la pacienții cu litiază biliară față de martori; 3) în analiză univariată trigliceridele serice și HDL-colesterolul s-au asociat semnificativ cu riscul de litiază biliară, dar nu și în analiza multivariată datorită corelației între IMC și trigliceridele serice și HDL-colesterol. Concentrația medie a colesterolului seric a fost mai mare la martori decât la pacienții cu litiază biliară, fapt explicat probabil prin modificarea stilului de viață și a dietei în cazul pacienților simptomatici și colecistectomizați. Diabetul zaharat este factor de risc pentru litiaza biliară: 1) prevalența diabetului zaharat și glicemia *a jeun* semnificativ mai mare la grupul de pacienți cu litiază biliară față de martori; 2) hiperglicemia mai frecventă la pacienții cu litiază biliară față de martori; 3) asocierea semnificativă în analiză univariată a glicemiei bazale cu riscul crescut de litiază biliară, dar nu și în analiza multivariată datorită corelației semnificative între IMC și glicemia *a jeun*.

Factorii de risc de mediu urmăriți au fost reprezentați de: dieta, consumul de alcool, fumatul. În studiul nostru nu am obținut o diferență semnificativă statistic privind consumul de hidrocarburi rafinate, de grăsimi saturate și nesaturate sau de fibre vegetale între pacienții cu litiază biliară și martorii fără litiază. În grupul nostru, prevalența consumul alcool a fost semnificativ mai mare la martori față de pacienți, dar rezultatele au fost obținute pe un număr relativ mic de subiecți. De asemenea, nu am constatat o diferență semnificativă între pacienți și martori privind prevalența fumătorilor în cele două grupuri. Din analiza multivariată a valorilor calitative ale factorilor de risc de teren, a rezultat că vârsta >60 de ani, IMC>25 kg/m², polimorfismul Q604E al genei *ABCG5* și polimorfismul D19H al genei *ABCG8* au reprezentat un risc semnificativ pentru litiaza biliară.

IV. Factorii de risc de teren și de mediu asociați cu litiaza biliară-studiu pe perechi de frați cu litiază biliară

Al patrulea studiu a fost un studiu pe perechi, realizat pe un lot de perechi de frați cu litiază biliară (109 de pacienți și frații lor cu litiază biliară), la care am urmărit factorii de risc de mediu și genetici cu rol litogenic. Agregarea familială importantă evidențiată prin identificarea a 109 familii având cel puțin 2 membrii afectați confirmă rolul important al factorului genetic în dezvoltarea litogenezei. Nu au existat diferențe semnificative statistic între pacienții index și frații acestora privind distribuția pe sexe,

vârsta, IMC, prevalența diabetului zaharat, valorile plasmaticice ale glicemiei *a jeun* sau numărul de sarcini. De asemenea, în ceea ce privește factorii de mediu, precum dieta, consumul de alcool sau fumatul, nu s-au constatat diferențe semnificative statistic între pacienți și frații lor. Acest lucru sugerează rolul important în litogeneză al factorului genetic la frații la care factorii de mediu au pondere similară. IMC s-a corelat pozitiv între pacienții index și frații cu litiază biliară, ceea ce arată influența factorilor genetici asupra obezității. Am identificat în acest studiu o corelație semnificativă pentru nivelele plasmaticice de trigliceride, colesterol și HDL-colesterol la perechile de frați cu litiază biliară, ceea ce arată determinarea genetică a profilului lipidic. Polimorfismul A632V al genei *ABCG8* s-a corelat semnificativ cu nivelele plasmaticice ale trigliceridelor și a colesterolului la frații cu litiază biliară ceea ce confirmă rolul genei *ABCG8* în determinarea genetică a profilului lipidic la pacienții cu litiază biliară având importanță agregare familială.

V. Concluzii generale și contribuții personale

În această lucrare am demonstrat că anumite polimorfisme genelor *ABCG5/ABCG8* reprezintă un factor de risc pentru litiaza biliară la om. Studiul nostru pe perechi de frați cu litiază biliară confirmă pentru prima dată, asocierea unui locus litogenic murin (*Lith 9*, care cuprinde genele murine candidate *Abcg5* și *Abcg8*) cu riscul de litiază biliară la o populație umană.

Dintre factorii de risc genetici și de mediu studiați, IMC-ul, polimorfismul Q604E al genei *ABCG5* și polimorfismul D19H al genei *ABCG8* au reprezentat un risc semnificativ pentru litiaza biliară în analiza multivariată.

VI. Bibliografie

1. Acalovschi M, Pascu M, Iobagiu S, et al. Increasing gallstone prevalence and cholecystectomy rate in a large Romanian town. A necropsy study. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2582-2586
2. Paigen B, Carey M C. Gallstones. In: King R A, Rotter J F, Motulsky A G, eds. *The Genetic Basis of Common Disease*. 2nd ed. New York: Oxford University Press 2002: 298-335
3. Acalovschi M, Dumitrașcu D, Calușer I, Ban A. Comparative prevalence of gallstones disease at 100-year interval in a large Romanian town, a necropsy study. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 354-357
4. Grunhage F, Acalovchi M, Tirziu S, et al. Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol. *Hepatology* 2007; 46: 793-801
5. Lammert F, Matern S. The genetic background of cholesterol gallstone formation: an inventory of human lithogenic genes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5: 163-170
6. Acalovschi M V, Blendea D, Pascu M, Georoceanu A, Badea R I, Prelipceanu M. Risk of asymptomatic and symptomatic gallstones in moderately obese women: a longitudinal follow-up study. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 127-31

7. Acalovschi M, Blendea D, Feier C, et al. Risk factors for symptomatic gallstones in patients with liver cirrhosis: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1856-60
8. Lammert F, Sauerbruch T. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 9: 423-433
9. Rosmorduc O, Poupon R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the *MDR3/ABCB4* gene. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2: 29
10. Lammert F, Carey M C, Paigen B. Chromosomal organisation of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: A murine Gallstone Map. *Gastroenterology* 2001; 120: 221-238
11. Berge K E, Von Bergmann K, Lutjohann D, et al. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 2002; 43: 486-494.
12. Acalovschi M, Ciocan A, Moştean O, et al. Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones. *Eur J Intern Med* 2006; 17: 490-494

CURRICULUM VITAE

Last name: TIRZIU
First name: SIMONA ELENA
Address : Cluj-Napoca, str.Plopilor nr.73, Bl.P11, Sc.2, ap.25,
cod poștal 400383
E-mail : tardsimona@yahoo.com
**Date and place
of birth** 9 april 1976
Râmnicu Vâlcea

Professional experience

- 2009** Diploma of University „Hépatites virales, cytokines et anti- viraux at University Hospital Pitie-Salpetriere, Paris, France
- 2007 up
to present** Specialist physician (Praticien contractuel) in the department of Gastroenterology of the Hospital from Vesoul, France
- 2007** Diploma of Competence in General Ultrasonography at the 3rd Medical Clinic, Cluj-Napoca
- 2006** Diploma of specialist physician in Internal Medicine with an average of 9.33
- 2005-2006** Clinical fellowship in 3rd Medical Clinic from Cluj-Napoca
- 2003-2005** Diploma d'Attestion d'Etudes Spécialisée en Hepato-Gastroenterologie in Gastroenterology Departement of University Hospital, Besançon, France
- 2002-2009** Candidate for doctor degree « The role of heredity and of the environment risk factors in cholesterol gallstone disease »
- 2001-2003** Clinical fellowships in 3rd Medical Clinic from Cluj-Napoca
- 2000-2001** Diploma of Master in Medical Informatics
- 1994-2000** Faculty of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hațieganu” from Cluj-Napoca, bourse 1994/1995, 1995/1996, 1998/1999
- 1990-1994** College of Mathematics and Physics „Mircea cel Batrân” Râmnicu Vâlcea, with the average 10 at baccalaureate
- 1999** Bourse Erasmus for three months on the department of Internal Medicine, University Hospital in Grenoble, France

Scientific activity

- 2008** collaborator at the monography "Litiaza biliară colesterolică-de la epidemiologie la genetică"-author PhD. Monica Acalovschi, Ed Clusium 2008
- 2008** „Risk factors for gallstone disease in patients with gallstones having gallstone heredity-a case-control study” – S.Tirziu și colab, Romanian Journal of Internal Medicine 2008
- 2007** „Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol”-F. Grunhage, M.Acalovschi, S.Tirziu et al., Hepatology 2007
- 2007** „Risk factors in gallstone disease” –S.Tirziu, M.Acalovschi, article *in extenso* published in Revista de Medicină Internă 2007
- 2007** „Association of the polymorphisms of ABCG5 and ABCG8 genes with serum lipid levels in siblings with gallstone disease”- the first price at the session of oral presentations at The 28th National Symposium of Gastroenterology, Hepatology and Digestive Endoscopy, Sibiu
- 2006** „The role of ABCB4 gene in symptomatic gallstone disease”-poster, Tîrziu S, Acalovschi M, Bresson-Hadni S. The Second National Congress of Medical Genetics, Cluj-Napoca 2006
- 2005** „Echinococose alveolaire peritoneale : deux observations”- poster S.Tirziu et al. presented at the Congress of the National Society of Parasitology, Besancon, France
- 2004-2005** Sessions of oral presentations of the North-Est region in France: 2004-Dijon „ Post-radiotherapy enteritis”; 2005-Reims „Rare causes of gastritis”; 2005-Besancon „The role of salyciles in inflammatory bowel disease”
- 2002** „Correlation between the symptoms of gastro-oesophageal reflux and endoscopic signs of oesophagitis”-National Symposium of Gastroenterology, Hepatology and digestive Endoscopy, Cluj-Napoca
- 2001** „Morphometric study of Willis’polygon in embrions”- Session of scientific presentations of the Faculty of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca
- 2000** „Variations in the calibre of arterial segments of Willis’polygon in embrions”- Session of scientific presentations of the Faculty of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

1998 Second price at the context of Pharmacology „Eli Lilly&Alsifcom”

Foreign languages:

French : Diploma of Study in French language at the French Cultural Centre
from Cluj-Napoca 1999

English : Diploma of Cambridge 2003

Summary of the doctor thesis
“The role of heredity and of the environment risk factors in
cholesterol gallstone disease” by Simona Tîrziu

PhD coordinator: PhD. Monica Acalovschi

Key words: cholesterol gallstones – ABCG5-ABCG8-polymorphisms-obesity-HDL-cholesterol – triglycerides – diabetes - environmental risk factors

CONTENTS

Preface	4
I. Introduction	6
II. Cholesterol gallstone disease – epidemiology	7
III. Physiology	8
IV. Pathophysiology of cholesterol gallstone disease	11
V. Risk factors for cholesterol gallstone disease	14
V.1. Unmodifiable risk factors and associated conditions with risk	14
V.1.1. Genetic/family history factor	14
V.1.2. Age	43
V.1.3. Gender	45
V.1.4. Pregnancy	45
V.1.5. Obesity	46
V.1.6. Rapid weight loss	48
V.1.7. Dyslipidemia	49
V.1.8. Diabetes mellitus	50
V.1.9. Metabolic syndrome	52
V.1.10. Inflammatory bowel disease	52
V.2. Environmental risk factors/lifestyle	53
V.2.1. Drugs	53
V.2.2. Diet	56
V.2.3. Smoking	60

Personal research and contributions	63
I. <i>ABCG8</i> gene encoding cholesterol hepatic transporter is a risk factor for gallstone disease- a study in siblings with gallstone disease	64
I.1. Introduction	64
I.2. Aim of study	65
I.3. Methods	65
I.4. Results	73
I.5. Discussions	82
I.6. Conclusions	87
II. Association of polymorphisms of <i>ABCG5/ABCG8</i> genes to plasma lipids levels in patients with gallstone disease and in controls	88
II.1. Introduction	88
II.2. Aim of study	89
II.3. Methods	89
II.4. Results	93
II.5. Discussions	127
II.6. Conclusions	140
II.6.1. Conclusions in the group IIA	140
II.6.2. Conclusions in the group IIB	140
II.6.3. Final conclusions	141
III. Environment risk factors and gallstone disease – a case-control study	142
III.1. Introduction	142
III.2. Aim of study	142
III.3. Methods	143
III.4. Results	145
III.5. Discussions	162
III.6. Conclusions	173
IV. Risk factors for cholesterol gallstone disease- a study in siblings pairs with gallstones	175
IV.1. Introduction	175

IV.2. Aim of study	175
IV.3. Methods	175
IV.4. Results	178
IV.5. Discussions	194
IV.6. Conclusions	197
V. General conclusions and personal contributions	199
VI. References	202

I. Introduction

The doctor thesis untitled “The role of heredity and of the environment risk factors in cholesterol gallstone disease” is based on the role of the genetic factor in gallstone disease.

II. Cholesterol gallstone disease – epidemiology

The prevalence rates of gallbladder stones show remarkable geographic variations. Gallstone disease is common in most European countries, as well as in North and South America. Data about the prevalence of gallstone disease in our country were available from the studies of necropsies in Cluj-Napoca, which showed a prevalence of 7.6% in men and 16.9% in women.

III. Bile physiology

The biliary secretion of lipids and of bilirubin involved ATP-binding protein transporters. Among these transporters there are two proteins, ABCG5 and ABCG8, which formed heterodimers that limited intestinal absorption and promote biliary excretion of sterols.

IV. Pathophysiology of cholesterol gallstones

Four mechanisms contribute to the formation of cholesterolgallbladder stones: cholesterol supersaturation of bile; nucleation and growth of cholesterol crystals; gallbladder hypomotility; intestinal hypomotility.

V. Risk factors for cholesterol gallstones

Cholesterol gallstone disease is a common disease, which is the result of the interaction between genetic and environmental factors.

V.1. Unmodifiable risk factors and associated conditions with risk

These are represented by: genetic susceptibility, age, female sex, pregnancy, obesity and rapid weight loss, hypertriglyceridaemia, type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome.

V.1.1. Genetic factor

Genetic susceptibility to gallstones is suggested by family clustering of gallstone disease, studies on monozygotic or dizygotic twins, and the ethnic differences in gallstone prevalence.

Gallstone formation is a complex genetic trait that involves multiples genes. In small groups of patients with gallstones, monogenic predisposition has been described as mutations in genes that encode the ABC transporters for phosphatidilcholine (ABCB4) or bile salts (ABCB11), cholesterol 7 α -hydroxylase and the cholecystokinin type A receptor. The gene *ABCB4* encodes a protein transporter situated at the apical membrane of the hepatocyte and its function is to translocate phosphatidilcholine into the bile. Rosmorduc *et al.* have identified point mutations in *ABCB4* gene associated with a symptomatic and recurrent form of cholelithiasis in young patients and described a new clinical entity named „low phospholipid-associated cholelithiasis”.

Genetic susceptibility to gallstone formation involves multiples genes and has been studied on mouse model. The technique of quantitative trait locus (QTL) analysis is used to analyse polygenic traits as gallstone disease and provided the approach for identifying, locating and estimating the effect of genes involved in gallstone formation. The research was focused on those whose functions can potentially influence cholesterol gallstone formation and were named “candidate genes”. There are six major classes of candidate gallstone genes that encode enzymes, protein transporters, receptors and nucleating agents. We investigated two genes that encode two protein transporters, ABCG5 and ABCG8, involved in intestinal and hepatic cholesterol transport. These two proteins function as heterodimers and they limit intestinal absorption and promote biliary secretion of sterols. The polymorphisms of the two genes *ABCG5* and *ABCG8* seem to have an important effect on serum levels of fitosterols, by also to influence the function of the heterodimer.

Twenty-three lithogenic loci containing candidate genes for gallstone disease have been identified on mouse model. The murine genes are localised on *Lith 9*. Up to now, two lithogenic loci were identified in humans.

V.1.2. Age

Populational studies showed that gallstone disease increased linearly with age.

V.1.3. Gender

Gallstone disease had a higher prevalence in women than in men due to hormonal influences.

V.1.4. Pregnancy

The same hormonal mechanisms explain the higher prevalence of gallstone disease in pregnancy.

V.1.5. Obesity, rapid weight loss and dyslipidaemia

Obesity represents an independent risk factor for gallstone disease, correlated linearly with the body mass index. The pathophysiological link between obesity and cholesterol gallstone disease is caused by supersaturated bile and altered gallbladder motility. Rapid weight reduction in obese persons is associated with gallstones formations. High plasma triglycerides and low HDL-cholesterol levels are independent risk factors for cholesterol gallstone disease.

V.1.8. Diabetes mellitus and metabolic syndrome

Diabetes mellitus favours gallstone disease due to hyperinsulinaemia that increases cholesterol saturation of the bile and decrease gallbladder motility. Studies found a significant association between the components of the metabolic syndrome and gallstones formation.

V.2. Environmental risk factors/lifestyle

The environmental risk factors are represented by: hypolipidic treatment, hypercaloric diet, enriched refined carbohydrates and low fiber diet, alcohol consuming, smoking, low physical activity.

V.2.1. Drugs

Fibrates are hypolipemiant agents in humans. Estrogens and oral contraceptive drugs increase gallstone formation risk by increasing hepatic cholesterol synthesis. Somatostatin and Octreotid favour the development of gallstones by reducing gallbladder motility.

V.2.2. Diet

A high energy intake, saturated fats or refined carbohydrates are crucial environmental triggers for cholesterol gallstone formation. Unsaturated fats, a fibre enriched diet coffee and moderate alcohol consumption have protective effects against gallstone formation.

V.2.3. Smoking, low physical activity, economic status and Helicobacter species

Cigarette smoking, low physical activity, economic status are environmental factors associated with an increased risk of gallstone disease. Species of Helicobacter were involved in gallstone formation in animals, but this was not confirmed in studies on humans.

Personal research and contributions

The second part of the thesis contains personal research and is composed of four chapters.

I. *ABCG8* gene encoding cholesterol hepatic transporter is a risk factor for gallstone disease- a study in siblings with gallstones

The first study evaluated the influence of the *ABCG8/ABCG5* genes polymorphisms on gallstone susceptibility in siblings with gallstones and in controls without gallstones, using linkage analysis. The patients and controls were recruited prospectively at the Department of Gastroenterology of the 3rd Medical Clinic of Cluj-Napoca, between November 2002 and April 2006. Genomic DNA was isolated at the University Babeş-Bolyai from Cluj-Napoca. All five SNP's were genotyped using *TaqMan* assays in a Real-time polymerase chain reaction system in Genetic Laboratory of University of Bonn, coordinated by Professor Franck Lammert. We included in this study 178 siblings with gallstones and 70 controls without personal or family history of

gallstone disease. This combined linkage and association study provided strong evidence that the D19H variant of the hepatocanalicular transporter gene *ABCG8* contributes to gallstone formation in humans. This study showed that D19 variant of *ABCG8* gene account for 8% to the total gallstone risk and to approximately 30% to the genetic risk of gallstone disease. These findings are in line with the results of a large genomwide association scan in German gallstone patients that localised susceptibility for gallstone disease to the same *ABCG8* polymorphism. Our study represented also a successful translational study that confirmed an association of a mouse *Lith* locus (*Lith* 9 on chromosome 17) as a susceptibility factor for cholelithiasis in humans.

II. Association of polymorphisms of *ABCG5/ABCG8* genes to plasma lipids levels in patients with gallstone disease and in controls

The influence of *ABCG5/ABCG8* genes polymorphisms on plasma lipids levels was investigated in gallstone carriers and in stone-free controls. We studied 108 patients with gallstone disease and 259 controls without personal or family history of gallstones. The carriers of the common allele of each SNPs were compared with carriers of the minor allele, both in patients and controls. There were no significant differences regarding age, BMI, gender, plasmatic levels of triglycerides, cholesterol, HDL-cholesterol or glycaemia between the carriers of the common allele and the carriers of the minor allele. We found that *ABCG5/ABCG8* polymorphisms did not correlate with plasma lipids levels, although significant correlations were obtained on smaller groups. This confirms that, much larger association studies are needed to prove such correlations. Gallstone disease was significantly associated with serum triglycerides and HDL-cholesterol, but the association gallstone disease/SNP was not related to plasma lipid levels. We found a significant influence of the SNP Y54C and both SNP/lithiasis on the basal glycaemia in patients with gallstone disease, in multiple logistic regression analysis, adjusting after age and BMI.

We did not obtain significant correlations of BMI in stone-free controls between carriers of the common allele and the carriers of the minor allele. The SNP T400K of *ABCG8* gene was significantly correlated with male gender in controls and the SNP Q604E of *ABCG5* gene with serum cholesterol levels. The SNP T400K of *ABCG8* gene was also significantly associated with plasma levels of LDL-cholesterol in stone-free controls, while in other studies it was correlated with triglycerides levels.

We found a significantly higher prevalence of carriers of the minor allele 604E of *ABCG5* gene and of the allele 19H of the *ABCG8* gene in patients with gallstone disease compared with controls. The frequencies of the genotypes of the studied SNPs were similar in our study compared to European population, but significantly different than those from Asian population.

III. Risk factors for gallstone disease- a case-control study

In a third study we evaluated the risk factors associated with gallstone disease in a case-control study which included 109 patients with personal and family history of

gallstone disease and 271 controls. The patients and the controls were age-matched and sex-matched. However, there were significantly more patients over 60 years old with gallstone disease than controls, confirming the increased prevalence of gallstones with age. There was no significant difference regarding pregnancy in patients and in controls. The BMI significantly correlated with gallstone risk in univariate and in multivariate analysis. Hypertriglyceridaemia and low HDL-cholesterol increased the risk of gallbladder stones: 1/serum triglycerides were significantly higher and HDL-cholesterol levels are significantly lower in patients with gallstones than in controls; 2/ the prevalence of hypertriglyceridaemia was significantly higher in patients than in controls; 3/ serum triglycerides and HDL-cholesterol were significantly associated with the risk of gallstone disease in univariate analysis, but not in multivariate analysis, probably due to a significant correlation between BMI and triglycerides and HDL-cholesterol plasma levels. Serum cholesterol level was higher in controls than in patients, possibly due to the diet changes post-cholecystectomy. Diabetes mellitus was confirmed as a risk factor for gallstone disease: 1/ the prevalence of diabetes mellitus significantly higher in patients with gallstones than in controls; 2/ higher value of serum basal glycaemia in patients than in controls; 3/ prevalence of hyperglycaemia significantly higher in patients than in controls; 4/ significant correlation with basal glycaemia in gallstone patients in univariate analysis, but not in multivariate analysis.

Regarding environmental risk factors we found no significant difference in the diet content in refined carbohydrates, saturated and unsaturated fats and vegetal fibres in patients with gallstone disease compared with controls. Alcohol consumption was significantly higher in controls than in patients, but it was investigated in a small number of subjects. There was also no significant difference regarding prevalence of smokers between patients and controls.

Age over 60 years old, BMI over 25 kg/m², polymorphism Q604E of *ABCG5* gene and polymorphism D19H of *ABCG8* gene were significantly correlated with the risk of gallstone formation in multiple logistic regression analysis of qualitative values.

IV. Risk factors for cholesterol gallstone disease - a study in sibling pairs with gallstones

The fourth study was realized in siblings with gallstone disease (109 patients and their siblings). The family aggregation revealed by the identification of 109 families with at least 2 members affected is a strong evidence of the important role of the genetic factor in gallstones formation. There were no significant differences regarding gender, age, BMI, diabetes mellitus, basal glycaemia or pregnancy between patients and their siblings. Concerning the environmental factors like diet, alcohol consumption and smoking, there was no differences between patient and their siblings. The similarity of environmental factors in siblings with gallstone disease demonstrates the important role of the genetic factor in lithogenesis. BMI correlated between patients and siblings and that proved the influence of genetic factor on obesity. The significant correlation between serum

triglycerides, cholesterol and HDL-cholesterol found in siblings with gallstones demonstrates the genetic control of plasma lipid levels. The polymorphism A632V of *ABCG8* gene significantly correlated with triglyceride and cholesterol plasma levels in siblings with gallstones, which confirms the role of *ABCG8* gene in the genetic determination of lipid profile.

V. General conclusions and personal contributions

Our research demonstrated that some polymorphisms of the *ABCG5* and *ABCG8* genes represent a risk factor of gallstone disease. It was confirmed for the first time the association of a mouse *Lith* locus (*Lith 9* on chromosome 17) as a susceptibility factor for cholelithiasis in humans. BMI, polymorphism Q604E of *ABCG5* gene and polymorphism D19H of *ABCG8* gene are the main risk factors for cholesterol gallstone formation in patients with positive family history.

VI. References

1. Acalovschi M, Pascu M, Iobagiu S, et al. Increasing gallstone prevalence and cholecystectomy rate in a large Romanian town. A necropsy study. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2582-2586
2. Paigen B, Carey M C. Gallstones. In: King R A, Rotter J F, Motulsky A G, eds. *The Genetic Basis of Common Disease*. 2nd ed. New York: Oxford University Press 2002: 298-335
3. Acalovschi M, Dumitraşcu D, Calușer I, Ban A. Comparative prevalence of gallstones disease at 100-year interval in a large Romanian town, a necropsy study. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 354-357
4. Grunhage F, Acalovschi M, Tirziu S, et al. Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol. *Hepatology* 2007; 46: 793-801
5. Lammert F, Matern S. The genetic background of cholesterol gallstone formation: an inventory of human lithogenic genes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5: 163-170
6. Acalovschi M V, Blendea D, Pascu M, Georoceanu A, Badea R I, Prelipceanu M. Risk of asymptomatic and symptomatic gallstones in moderately obese women: a longitudinal follow-up study. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 127-31
7. Acalovschi M, Blendea D, Feier C, et al. Risk factors for symptomatic gallstones in patients with liver cirrhosis: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1856-60
8. Lammert F, Sauerbruch T. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 9: 423-433
9. Rosmorduc O, Poupon R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the *MDR3/ABCB4* gene. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2: 29

10. Lammert F, Carey M C, Paigen B. Chromosomal organisation of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: A murine Gallstone Map. *Gastroenterology* 2001; 120: 221-238
11. Berge K E, Von Bergmann K, Lutjohann D, et al. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 2002; 43: 486-494.
12. Acalovschi M, Ciocan A, Moştean O, et al. Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones. *Eur J Intern Med* 2006; 17: 490-494