

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ GENERALĂ**



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ULMEANU CORIOLAN EMIL

Doctorand:

COROLEUCĂ (MORARU) ALEXANDRA

București

2019

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ GENERALĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

*BOALA WILSON LA COPIL-
CORELAȚII CLINICO-BIOLOGICE ȘI IMPLICAȚII EVOLUTIVE PE TERMEN LUNG*

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ULMEANU CORIOLAN EMIL

Doctorand:

COROLEUCĂ (MORARU) ALEXANDRA

ANUL 2019

Cuprins

Listă lucrări științifice publicate.....	5
Listă cu abrevieri	6
Introducere	8
1. Partea generală – stadiul actual al cunoașterii.....	10
1.2. Etiologie.....	10
1.3. Fiziopatologie	10
1.4. Genetica în boala Wilson	11
1.5. Epidemiologie	12
1.6. Manifestările clinice în boala Wilson	12
1.7. Stabilirea diagnosticului pozitiv de boală Wilson	14
1.7.1. Teste paraclinice folosite pentru diagnosticul bolii Wilson la copil:	15
1.7.2. Testarea genetică.....	16
1.7.3. Biopsia hepatică.....	17
1.7.4. Scorul de diagnostic.....	17
1.7.5. Screeningul familial.....	18
1.8. Tratamentul în boala Wilson.....	19
2. Partea a doua – contribuția personală	20
2.1 Motivația alegerii temei și obiectivele tezei.....	20
2.2. Material și metodă.....	21
2.3. Caracteristicile epidemiologice ale lotului studiat	23
2.3.1. Material și metodă.....	23
2.3.2 Rezultate și concluzii	23
2.4 Manifestările clinice în boala Wilson – rezultatele lotului studiat.....	23
2.4.1 Material și metodă.....	24
2.4.2. Rezultate și concluzii	24
2.5. Stabilirea unei corelații între parametri hematologici și forma de boală Wilson	25
2.5.1 Material și metodă.....	25
2.5.2. Rezultate și concluzii	25
2.6. Analiza parametrilor biochimici la pacienții cu boală Wilson.....	26
2.6.1. Material și metodă.....	26
2.6.2. Rezultate și concluzii	26
2.7. Analiza parametrilor biochimic implicați în diagnosticul bolii Wilson.....	27
2.7.1. Material și metodă.....	27
2.7.2. Rezultate și concluzii	27

2.8. Corelații între parametri biochimici și hematologici în BW	28
2.8.1 Material și metodă.....	28
2.8.2. Rezultate și concluzii	28
2.9. Investigații imagistice în boala Wilson	28
2.9.1. Material și metodă.....	28
2.10. Aplicarea scorului diagnostic Ferenci la pacienții incluși în studiu și corelații între acesta și alți parametri	29
2.10.1. Material și metodă.....	29
2.10.2. Rezultate și concluzii	29
2.11. Biopsia hepatică în boala Wilson, date din lotul studiat	29
2.11.1. Material și metodă.....	29
2.11.2 Rezultate și concluzii	30
2.12. Importanța screening-ului familial în boala Wilson.....	30
2.12.1. Material și metodă.....	30
2.12.2. Rezultate și concluzii	30
2.13. Importanța testării genetice în boala Wilson.....	31
2.13.1. Material și metodă.....	31
2.13.2. Rezultate și concluzii	31
2.14. Elaborarea unui scor de prezicere pentru forme severe	31
2.14.1 Material și metodă.....	31
2.14.2. Rezultate și concluzii	32
3. Partea a treia - Cercetare multidisciplinară - Apecte socioeconomice implicate în boala Wilson la copil	33
3.1. Material și metodă.....	33
3.2. Rezultate și concluzii	33
4. Protocoale de diagnostic și de screening pentru pacienții cu BW.....	33
5. Concluzii finale.....	38
Bibliografie	41

Listă lucrări științifice publicate

Lucrări publicate :

1. **Alexandra Moraru** “Assessment of Wilson Disease from the view point of complication’s socioeconomic costs and the relationship between disease complications and the quality of life” Annals of the University of Bucharest, Economic and Administrative Series, ISSN: 1842-9327, Volume 9 – 2015, p. 67 – 77, published online: September 2015
2. **Alexandra Moraru** “Epidemiological features and socioeconomic burden of childhood Wilson Disease” Romanian Journal of Economics, available at <http://www.revecon.ro/articles/2015-1/2015>
3. Pacurar Daniela, **Alexandra Moraru**, Lesanu Gabriela, Oraseanu Dumitru: Wilson’s disease from pathophysiology to treatment, Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology, Vol XIX, Number 2, June 2015
4. Daniela Pacurar, **Alexandra Moraru**, Raluca Maria Vlad, Irina Andronie, Gabriela Lesanu, Dumitru Oraseanu: Phenotypical features in childhood Wilson disease: the experience of a hepatology center from Bucharest, 5th Congress of the European Academy of Paediatric Societies (EAPS), Barcelona, Oct. 2014 In Arch Dis Child, 99 (Suppl.2): A295 (ISSN: 1468-2044);
6. **A. Coroleucă**, D. Păcurar, C.E. Ulmeanu: Boala Wilson la copil – criteriile și scoruri de diagnostic. Revista Română de Pediatrie, 2019, Vol. LXVIII, Nr2.

Listă cu abrevieri

ADN – acid dezoxiribonucleic

ALT – alanin transaminază

AP – activitate protrombină

APOE – apolipoproteina E

APTT – timp de tromboplastină parțial activată

AST – aspartat transaminază

ATOX1 - proteina antioxidantă1

BTX – toxină botulinică

BW – Boala Wilson

Ca – Calciu

CCS uman – copper chaperone superoxide dismutase

Cl - Clor

cMOAT (MRP2) – multidrug resistance-associated protein2

COX 17 – ciclooxigenază 17

CPK – creatin fosfokinază

CTR1 – transportor de absorbție a cuprului

Cu – Cupru

Cu EXC – cuprul schimbabil

CT – computer tomograf

DBS – deep brain stimulation

EDTA – acid diaminotetraacetic

Eo – eozinofile

G6PD – glucozo6fosfat dehidrogenaza

GGT – gamma-glutamil transferază

Grd – grad

HELLP – sindrom format din hemoliză, citoliză hepatică și trombocitopenie

hCTR – human copper transporter

HUGO – Organizația Genom Umană

IHA – insuficiență hepatică acută

Inel K-F – inel Kayser-Fleischer

INR – international normalized ratio
LCR – lichid cefalo-rahidian
LDH – lactat dehidrogenază
LEC – șobolani Long Evens Cinnamon
LSN – limita superioară a normalului
MARS – sistem de recirculare a absorbantilor moleculari
MCV – volum mediu eritocitar
MCH – cantitate hemoglobină medie
MDB – domeniul N terminal al ATP7B
Mg - Magneziu
MT I și II– metalotionină I și II
MTHFR – metilentetrahidrofolatreductaza
Na – Sodiu
NASH – steatoză hepatică non-alcoolică
PrP^(c) – proteine prionice celulare
PLT – trombocite
PT – timpul de protrombină
rAAV – virus recombinat adeno-asociat
REC – cuprul schimbabil relativ
RMN – rezonanță magnetică nucleară
SAM – S-adenosilmetioinina
SAH – S-adenozilhomocisteina
SHPL – secvență de aminoacizi
SPECT – single photon emission computed tomography
TIPS – șunt transjugular portosistemic intrahepatic

Introducere

Boala Wilson (BW) numită și degenerescenta hepatolenticulară este o afecțiune genetică rară transmisă autosomal recesiv, determinată de mutații la nivelul genei ATP7B, localizată pe cromozomul 13, responsabilă de sinteza ATP-azei (ATP7B) cu rol cheie în metabolismul cuprului. Aceste modificări moleculare determină acumularea toxică a cuprului în celulele țesuturilor țintă, producând leziuni tisulare.

BW reprezintă o tulburare severă a metabolismului cuprului, ce este exprimată printr-un spectru larg de manifestări clinice, între care predomină cele hepatice, neurologice, oculare, psihiatrice, dar pot apărea și manifestări osteoarticulate, cutanate, endocrinologice etc (1). Este o afecțiune autozomal recesivă caracterizată prin excreția deficitară a cuprului, având o incidență între 1:30.000 și 1:100.000. Elementele clinice sunt rezultatul acumulării cuprului la nivel hepatic, cerebral, dar și la nivelul altor organe.

Gena ATP7B, este localizată pe brațul lung al cromozomului 13. Aceasta codifică o proteină transportoare de cationi din familia ATP-azelor tip P exprimată în special la nivelul hepatocitelor. Mutațiile apărute la nivelul acestei gene determină acumularea intracelulară de cupru conducând la producerea de leziuni tisulare responsabile pentru BW.

Tabloul clinic în BW este extrem de polimorf înglobând manifestări clinice hepatice, neurologice, psihiatrice, oftalmologice, hematologice, renale, osteoarticulare, cutanate, endocrine etc. Diagnosticul pozitiv poate fi astfel, în unele cazuri, laborios și foarte dificil. Testarea genetică deține un rol important atât în stabilirea diagnosticului cât și pentru screening-ul familial. Efectuarea analizei moleculare a mutațiilor genei ATP7B, dacă este disponibilă, poate fi diagnostică. Aceasta metoda este costisitoare și nu poate determina toate mutațiile cauzatoare de boală. Au fost descrise mai mult de 500 mutații ale genei responsabile, dintre care pentru 380 dintre ele s-a confirmat rolul în patogeneza acestei afecțiuni (2).

Variabilitatea fenotipică și lipsa unor corelații genotip-fenotip în BW reprezintă o problemă de actualitate. În ultima perioadă au fost studiate corelații genotip-fenotip, care au avut rezultate contradictorii. Dintre mutațiile implicate în această afecțiune, câteva au fost prezente cu o frecvență mai mare în anumite populații sau regiuni geografice. În Europa, cea mai frecventă mutație este H1069Q (3).

Stabilirea diagnosticului pozitiv de BW la copil este un proces dificil care implică alcătuirea unei echipe multidisciplinare formate din: medic pediatru specializat în gastroenterologie și hepatologie, medic neurolog pediatru, medic psihiatru, medic oftalmolog,

medic radiolog și medic anatomopatolog. Ridicarea suspiciunii de boală și stabilirea precoce a diagnosticului pozitiv sunt elemente cruciale în managementul cazurilor de BW. Inițierea terapiei chelatoare în stadiile incipiente sau chiar din perioada presimptomatică întârzie apariția modificărilor ireversibile din BW, oferind astfel pacientului o speranță de viață adesea comparabilă cu populația sănătoasă și în plus, îmbunătățind calitatea vieții acestora.

Datele din literatură privind BW la copil sunt puține în țara noastră. Studiile efectuate până în prezent sunt rare și implică cel mai frecvent pacienți de vârstă adultă.

Lucrarea de față își propune să aducă date noi despre BW la copil, atât din punct de vedere epidemiologic cât și din punct de vedere al fenotipurilor clinice prezente la copil. De asemenea se vor aduce în discuție noi markeri biologici ce ar putea facilita diagnosticul pozitiv.

Stabilirea unui protocol clar de diagnostic este un obiectiv primordial al lucrării. Acesta ar facilita procesul de diagnostic și ar scădea semnificativ rata de subdiagnosticare a afecțiunii. De asemenea, se dorește întocmirea unui registru național în care să fie incluși pacienții diagnosticați cu BW, lucru care ar permite o mai bună colaborare între centrele universitare privind această afecțiune. Ulterior ar facilita transferul datelor către echipele de medici ce vor prelua pacienții după vârsta de 18 ani.

Teza este structurată în 3 părți. Prima parte reprezintă stadiul actual al cunoașterii și înglobează cele mai noi noțiuni din literatura de specialitate privind BW. În partea a doua este inclusă contribuția personală, în care sunt notate rezultatele studiului, discuții și concluzii pe baza rezultatelor obținute. Partea a treia este alcătuită dintr-un studiu multidisciplinar, realizat pe parcursul participării la proiectul POSDRU/159/1.5/S/141086 (Pluri și interdisciplinaritate în programe doctorale si postdoctorale), în colaborare cu Academia Româna, Institutul Român de Economie și Institutul Calității Vieții și constă în studiul aspectelor socioeconomice ale afecțiunii.

1. Partea generală – stadiul actual al cunoașterii

Partea generală reprezintă o sinteză a literaturii de specialitate recente privind boala Wilson, de la aspect legate de etiologie, fiziopatologie, genetică, până la epidemiologie, manifestări clinice, modalități de diagnostic și tratament.

1.2. Etiologie

Boala Wilson (BW) este determinată de mutații la nivelul genei ATP7B răspunzătoare de sinteza protezei transportoare de cupru ATP7B. Aceste mutații sunt responsabile de tulburări ale metabolismului celular al cuprului, ducând la diminuarea eliminării acestui element, determinând acumularea excesivă în celulă. Inițial, cuprul se depune la nivelul celulei hepatice, ulterior în celelalte țesuturi țintă.

În celulă cuprul pătrunde prin intermediul CTR1 și apoi este distribuit prin chaperonul de cupru ATOX1 la ATP7A (în enterocit) sau ATP7B (în hepatocit) localizate la nivelul aparatului Golgi. După o creștere a concentrațiilor de cupru, ATP7A și ATP7B se relocalizează de la nivelul aparatului Golgi la periferia celulei, iar în cazul ATP7A, la nivelul membranei plasmactice, pentru a facilita excreția cuprului. Principala diferență între aceste două căi de transport de cupru se află în direcția de transport. În enterocite, ATP7A facilitează excreția de cupru în fluxul sanguin la polul bazolateral, în timp ce în hepatocite, cuprul este excretat la polul apical în bilă (4).

1.3. Fiziopatologie

În BW, funcția, expresia și direcționarea intracelulară a ATP7B sunt perturbate, cu alte cuvinte sunt diminuate atât încorporarea cuprului în ceruloplasmină, cât și eliminarea excesului, conducând la acumularea sa excesivă intracelulară.

Mutațiile la nivelul genei ATP7B determină diminuarea excreției biliare a cuprului, conducând la acumularea sa progresivă în ficat, urmată de depunerea treptată în alte organe. Acumularea hepatică de cupru începe din primii ani de viață și poate fi substanțială. La acest fenomen poate contribui și incapacitatea de eliminare a cuprului în exces din celulă, specific perioadei neonatale. La debutul decadelor a doua de viață, acumularea mare de cupru intracelular determină eliminarea și vehicularea lui în fluxul sanguin, ducând la acumularea în alte țesuturi. În timp concentrația de cupru hepatic scade, acesta este redistribuit către alte organe țintă: la nivelul sistemului nervos central, ochiului, rinichiului etc (5).

1.4. Genetica în boala Wilson

Gena ATP7B, responsabilă de codificarea proteinei transportoare a cuprului este localizată pe brațul lung al cromozomului 13. Locusul genei este restrâns la regiunea 13q14-13q21. Este o genă mare cu 21 de exoni, care conține de la 77 la 1234 perechi de baze (6).

Au fost descrise peste 500 de mutații dintre care pentru 380 s-a confirmat rolul în patogenia BW (2). Frecvența de purtători este estimată la 1:90 sau 1:100. Estimările frecvenței mutației genetice se bazează pe pacienții deja diagnosticați cu BW. O anchetă genetică recentă efectuată pe 181 de pacienți cu BW din Marea Britanie a confirmat faptul că frecvența heterozigoților este considerabil mai mare decât cea raportată anterior de 1:90 (7).

Majoritatea bolnavilor sunt heterozigoți și au două mutații diferite ale genei ATP7B. Există o mare heterogenitate genică în BW în funcție de rasă și regiunea geografică. În baza de date a Organizației Genom Uman (HUGO) au fost incluse 300 de mutații diferite, cu rol demonstrat în BW, la nivelul genei ATP7B (8).

Cea mai frecventă mutație întâlnită la pacienții din Europa Centrală, Estică și de Nord a fost reprezentată de H1069Q (exon 14). Aproximativ 50-80% dintre pacienții din aceste țări au cel puțin o alelă cu această mutație, cu frecvența alelelor de 30-70% (9).

Frecvența mutațiilor homozigote și heterozigote a fost intens studiată în țările europene. Vrabelova et al. prezintă în 2005 într-un studiu, frecvența mutației H1069Q în populația cehă comparativ cu alte state europene. Frecvența mutației H1069Q a fost de 57% în Cehia comparativ cu Rusia 49% (10). Alte studii efectuate în Europa au evidențiat mutația H1069Q frecventă în Italia, România și Suedia (11).

Marea variabilitate a fenotipului clinic poate fi legată de genotipul ATP7B. Mulți autori au încercat să stabilească o legătură de cauzalitate între genotipul ATP7B și fenotipul clinic, dar datele sunt conflictuale și încă nu s-a stabilit o relație definitivă de cauzalitate. Dintre mutațiile implicate în această afecțiune, câteva au fost prezente cu o frecvență mai mare în anumite populații sau regiuni geografice. Factorii responsabili de existența acestor dificultăți în determinarea corelațiilor genotip-fenotip sunt reprezentați de marea heterogenitate genetică, cu un număr foarte mare de mutații și de incidența relativ rară a bolii. Examinări ale corelațiilor genotip-fenotip au scos în evidență anumite direcții, de exemplu: pacienți cu mutații proteice trunchiate au în general un debut precoce (12).

1.5. Epidemiologie

Primele date despre prevalența bolii Wilson au fost publicate în 1968 de către Strenlieb și Scheinberg care au raportat o prevalență de 5 la 1000000 de locuitori pentru această afecțiune (13). Autorii și-au revizuit lucrarea în 1984 când au comunicat o prevalență a BW de 30 la 1000000 locuitori cu o frecvență a purtătorilor heterozigoți de 1 la 90. De asemenea au afirmat faptul că există prevalențe diferite în populații izolate. De la prima descriere în literatură, a prevalenței până în prezent au fost efectuate progrese considerabile. Cu cât tehnicile de diagnostic au devenit mai sofisticate, s-a putut permite evidențierea mutației cauzatoare a BW ceea ce a facilitat diagnosticul pozitiv (14).

1.6. Manifestările clinice în boala Wilson

Manifestările clinice ale BW pot varia foarte mult, dar sunt preponderent hepatice în prima și a doua decadă de vârstă, iar apoi neurologice și psihiatrice. Mulți pacienți au o simptomatologie combinată. Copiii cel mai adesea se prezintă ca boală hepatică cronică cu valori anormale ale testelor hepatice. Manifestările hepatice variază de la steatoză hepatică la hepatită acută sau cronică care poate complica cu ciroză sau chiar insuficiență hepatică acută. Pe măsură ce BW progresează, mulți pacienți dezvoltă complicații ale hipertensiunii portale și ale insuficienței hepatice.

Pacienții cu BW prezintă cel mai frecvent manifestări neurologice sau psihiatrice în a doua sau a treia decadă de viață (15). Simptomele neurologice pot fi subtile la debut dar sunt rapid progresive, ducând la dizabilități severe de la săptămâni la luni. La pacienții cu ciroză, manifestările neurologice pot fi interpretate greșit ca encefalopatie hepatică sau pot fi exacerbate de encefalopatia hepatică. Tulburările comportamentale și psihiatrice sunt mai frecvente la pacienții cu afectare neurologică decât la pacienții cu afectare hepatică izolată. Cu toate acestea, simptomele psihiatrice pot preceda debutul simptomatologiei neurologice și pot întârzia diagnosticul pozitiv. Atunci când manifestările neurologice sau psihiatrice precedă boala hepatică clinică, diagnosticul de BW este adesea întârziat cu 1 până la 2 ani (16).

Aproximativ 10% dintre pacienți sunt asimptomatici la momentul diagnosticului, fiind diagnosticați prin screening familial sau prin descoperirea unui sindrom citolitic hepatic inexplicabil la efectuarea unor investigații de laborator de rutină (15).

Conform studiilor recente, s-a stabilit faptul că BW poate apărea la orice vârstă între 3 ani și 74 ani (în medie 13,2 ani), dar rareori simptomatică înainte de vârsta de 5 ani (17). BW este o afecțiune multisistemică având un tablou clinic variabil. În primele decade de viață

predomină manifestările hepatice. După vârsta de 20 ani, 75% dintre cazuri se prezintă cu manifestări neurologice, iar 25% atât cu manifestări hepatice, cât și neurologice (18),(19).

Afectarea hepatică în BW este datorată acumulării toxice a cuprului la nivelul hepatocitului, ce determină injurie ireversibilă și apoptoză. Majoritatea copiilor se prezintă inițial cu boală hepatică, în general după vârsta de 5 ani (20). Au fost raportate însă și cazuri de BW hepatică severă la copii mai mici, cu vârstă 2-3 ani (12). Severitatea bolii hepatice variază de la descoperirea accidentală a citolizei hepatice până la hepatita acută, hepatomegalie, insuficiență hepatică și ciroză (21). Dintre pacienții care au indicație de transplant hepatic de urgență datorită insuficienței hepatice acute, 6-12% au boala Wilson (22). Într-un studiu pe 156 pacienți cu BW efectuat în Polonia, s-a evidențiat faptul că 94,23% din cazurile de pacienți cu BW, s-au prezentat cu manifestări hepatice, dintre care 16,23% cu insuficiență hepatică (21). *Ciroza hepatică* poate fi prezentă în unele cazuri, de la diagnostic (22).

Noile recomandări ale Societății Europene de Gastroenterologie, Hepatologie și Nutriție Pediatrică (ESPGHAN) sunt de a suspiciiona BW la orice copil cu vârstă mai mare de 1 an, care prezintă orice semn de boală hepatică de la citoliză asimptomatică la ciroză hepatică cu hepatomegalie și ascită sau insuficiență hepatică acută. (Recomandare Grad 1A, nivel de acord 86%) (23).

Manifestările neurologice ale bolii sunt datorate depunerii cuprului predominant la nivelul ganglionilor bazali (nucleu caudat, putamen, globus pallidus), dar și la nivel talamic și ocazional la nivelul trunchiului cerebral (18). Deși simptomele neurologice/psihiatrice de obicei apar în a doua sau a treia decadă a vieții, pot ocazional să fie prezente înainte de vârsta de 10 ani și au fost raportate la 4% - 6% din cazurile de copii și adolescenți cu debut hepatic (11). Conform recomandărilor ESPGHAN, BW ar trebui exclusă la orice adolescent cu tulburări cognitive, psihiatrice sau de tulburări motorii inexplicabile (Recomandare Grad 1A, nivel de acord 96%) (23).

Inelul pericornean Kayser-Fleischer (IKF) și cataracta „în floarea soarelui” reprezintă manifestările oftalmologice ale BW. Ambele manifestări sunt reversibile cu terapia medicamentoasă sau după transplantul hepatic. IKF reprezintă marca bolii Wilson și apare în urma depunerii cuprului la nivelul membranei corneene Descemet. Unii pacienți pot prezenta doar schițe de IKF. Prezența acestuia este înalt sugestivă pentru diagnostic. Poate lipsi la pacienții de vârstă mică, la cei cu patologie hepatică. În 95% din cazuri este prezent la pacienții cu simptomatologie neurologică (15).

Anemia hemolitică Coombs-negativă poate fi singura manifestare inițială a bolii Wilson. Hemoliza marcată este frecvent asociată cu afecțiunea hepatică cronică. Lezarea celulelor hepatice eliberează cantități mari de cupru care agravează hemoliza (1). Anemia hemolitică severă asociată cu insuficiență hepatică poate fi un indiciu pentru BW. Hemoliza izolată este rar întâlnită în absența afectării hepatice semnificative. Diagnosticul este îngreunat în cazul în care anemia hemolitică este simptomul inaugural (20).

Alte manifestări sau forme de prezentare ale BW sunt mai rar întâlnite. Acestea sunt enumerate în Tabelul 1. I.

Tabel 1.I. Alte manifestări, mai rare ale BW.

Organ țintă	Manifestare clinică
Rinichi	Disfuncție tubulară renală (Sindrom Fanconi, acidoză tubulară renală, aminoacidurie) Nefrolitiază Nefrocalcinoză
Cord	Cardiomiopatie Aritmii
Sistem endocrin	Hipogonadism hipogonadotrofic secundar afecțiunii cronice hepatice Hipoparatiroidism Tulburări ale ciclului menstrual Infertilitate
Sistem osteoarticular	Osteopenie, osteoporoza Artrită
Cutanate	Lipoame, lunuae cerulae
Gastrointestinale	Pancreatită

(21-25)

I.7. Stabilirea diagnosticului pozitiv de boală Wilson

Tabloul clinic în BW poate avea variabilitate foarte mare, astfel încât, stabilirea diagnosticului pozitiv poate fi dificil de realizat. Diagnosticul pozitiv este laborios în special la copil și la adultul tânăr. Markerii biologici nu sunt specifici pentru BW, din acest motiv a fost elaborat un scor diagnostic care vine să sprijine acuratețea diagnosticului (26). Stabilirea

diagnosticului pozitiv precoce, încă din perioada asimptomatică, are un impact pozitiv asupra prognosticului pe termen lung (27).

BW trebuie luată în considerare la pacienții care prezintă valori crescute ale transaminazelor, neexplicate, hepatită cronică cu steatoză hepatică, hepatită autoimună care nu răspunde la tratament, ciroză hepatică, manifestări neurologice (tulburări de comportament, incoordonare motorie, tremor diskinezic), în cazul pacienților neurologici sau psihiatrici care prezintă și afectare hepatică, în cazul pacienților la care se detectează prezența inelului K-F la o examinare oftalmologică de rutină, în cazul pacienților cu anemie hemolitică dobândită Coombs-negativă și în cazul fraților sau părinților pacienților cu BW (28).

1.7.1. Teste paraclinice folosite pentru diagnosticul bolii Wilson la copil:

Evaluarea funcției hepatice. În formele ușoare de afectare hepatică se poate constata un sindrom de citoliză hepatică moderată, cu valorile transaminazelor între 100-500UI. În formele severe de boală, asociate cu insuficiență hepatică, se întâlnesc în mod tipic, valori foarte crescute ale bilirubinei serice ($> 17,5\text{mg/dl}$) și valori scăzute ale fosfatazei alcaline, cu raport fosfatază alcalină (UI)/bilirubină $\text{mg/dl} < 1$. Aceste caracteristici nu sunt totuși patognomonice pentru BW (3).

Ceruloplasmina serică este transportorul major al cuprului în sânge. De asemenea, este un reactant de fază acută. Concentrația de ceruloplasmină serică este scăzută la nou-nascuți, apoi crește treptat cu vârsta, atingând un maxim la jumătatea copilăriei, înainte de a scădea ușor în timpul punertății (26). Din acest motiv se recomandă determinarea ceruloplasminei după vârsta de 1an. Concentrația ceruloplasminei este $< 20\text{ mg/dl}$ la majoritatea pacienților cu BW (27). Nivelurile serice scăzute se întâlnesc, de asemenea, în aproximativ 20% din cazurile de purtători heterozigoți, pacienți cu insuficiență hepatică, malabsorbție, tulburări de glicozilare, boală Menkes, malnutriție protein-calorică, sindrom nefrotic, enteropatie cu pierdere de proteine, deficit de cupru dobândit și aceruloplasminemie ereditară (6). Studiile recente au arătat cel mai bun prag al valorii ceruloplasminei care conferă precizie diagnosticului, a fost $< 14\text{mg/dl}$ (cu sensibilitate de 93% și specificitate de 100%), într-un studiu în care au fost incluși 57 de pacienți adulți și copii cu BW ce prezentau disfuncție hepatică și/sau deficite neurologice (28). Valoarea cut-off a ceruloplasminei $< 20\text{ mg/dl}$ a avut o sensibilitate 95% și specificitate 84,5%, într-un studiu în care au fost incluși 40 de copii cu citoliză asimptomatică (29).

Cupremia sau cuprul seric total include valoarea cuprului liber, nelegat de ceruloplasmină și cuprul legat de ceruloplasmină. În BW, valoarea cupremiei poate fi scăzută, normală sau crescută. Cuprul „liber”, nelegat de ceruloplasmină, poate fi calculat folosind următoarea formulă: [cuprul total seric ($\mu\text{g/dl}$) - (3,15 x ceruloplasmina serică (mg/dl))]. Valorile cuprului liber sunt reduse la pacienții care primesc tratament, de obicei sunt situate între 5 și 15 $\mu\text{g/dl}$. Acest marker este foarte util în monitorizarea tratamentului pacienților cu BW (28).

Cupruria/24ore cuantifică excreția urinară de cupru în 24 de ore. La copiii cu forme asimptomatice sau la copiii cu afecțiuni hepatice ușoare, valorile cupruriei sunt adesea normale. Pragul de diagnostic a fost stabilit la valoarea de 40mg/24 ore (0,65mmol/24 ore) cu o sensibilitate de 78,9% și o specificitate de 87,9% (29). Testul de provocare cu penicilamină se realizează prin administrarea a 500mg D-penicilamină la începutul colectării urinei pe 24 de ore și încă 500mg administrate cu 12 ore mai târziu. Nu este un test fiabil pentru excluderea diagnosticului în cazurile asimptomatice (sensibilitate 12% și specificitate 46%) pentru valoarea cut-off de 1.575mg/24 ore (25mmol/24 ore). Reducerea valorii cut-off la 200mg/24 ore (3,2mmol/24 ore) a crescut sensibilitatea la 88%, dar a dus la o scădere considerabilă a specificității la 24,1% (3),(30).

Măsurarea cuprului interschimbabil relativ (Relative exchangeable copper) este un test nou propus și folosit în anumite centre pentru diagnosticul BW. Acest test se referă la determinarea fracțiunii de cupru seric labil, care este legat de albumină și de alte peptide. Un studiu recent a evidențiat faptul ca această test are specificitate și sensibilitate de 100% pentru diagnosticul BW la adulți, cu o valoare cut-off de 15% (15). Potrivit recomandărilor ESPGHAN, acest test necesită studii suplimentare la copiii cu afectare hepatică, pentru evaluarea acurateții sale diagnostice (3).

1.7.2. Testarea genetică

Testarea genetică a crescut remarcabil rata de diagnostic, în special în cazurile în care datele clinice și paraclinice sunt dificil de interpretat. Sunt mai mult de 500 mutații ale genei ATP7B implicate în BW. Au fost identificați și indivizi heterozigoți compuși (28,30). Există o distribuție regională a mutațiilor genetice. Anumite mutații au fost descrise cu frecvență mai mare în diferite regiuni geografice astfel: în Europa de Est, cea mai frecventă mutație este H1069Q, în Spania - Met645Arg, în Sardinia s-a identificat mai frecvent mutația c-441 427del15, în Japonia - 229insC, Arg778Leu, Costa Rica - Asp1279Ser iar în China, Coreea și Taiwan este mai frecventă mutația Arg778Leu. Cunoașterea frecvenței acestor mutații

facilitează diagnosticul molecular, prin efectuarea testelor genetice rapide, specific (28). În România, întâmpinăm dificultăți în această etapa de lucru, din cauza disponibilității reduse a testelor genetice și a costurilor ridicate asociate. Pentru testarea genetică avem disponibile unele teste care studiază 4 mutații din cele 500 de mutații (H1069Q, R778L, A874V și N1270S). Secvențierea genei nu este disponibilă în țara noastră. Se poate realiza în alte state Europene dar costurile sunt foarte ridicate (30).

1.7.3. Biopsia hepatică

Pentru diagnosticul de BW, biopsia hepatică, este recomandată numai în cazurile în care diagnosticul este neclar. Prin biopsie se poate cuantifica încărcarea hepatică de cupru. Studiul histologic solitar nu poate stabili diagnosticul în absența celorlalte criterii. Particularitățile histologice sunt nespecifice în BW și includ: aspecte de steatoză hepatică atât microveziculară cât și macroveziculară, incluziuni de glicogen în nucleii hepatocitelor periportale și necroză hepatocitară focală, corpi hialini Mallory care sunt constituiți din incluziuni citoplasmice eozinofile formate din protein citoscheletice și inflamație asemănătoare cu cea din hepatita autoimună (31).

Depunerile de cupru pot fi evidențiate prin colorațiile: rodamină, orceină sau colorație cu acid rubenic, dar au o valoare de diagnostic limitată. Colorarea negativă nu poate exclude creșterea cantității de cupru hepatic, în timp ce colorarea pozitivă este observată în mai multe afecțiuni asociate cu tulburări ale secreției biliare (3).

Cuantificarea cuprului intrahepatic se recomandă a se efectua în cazurile în care diagnosticul este echivoc conform noilor recomandări ESPGHAN (3). Conform publicațiilor recente valoarea cuprului hepatic mai mare de 250ug/g de țesut uscat (unde valorile normale sunt situate între 15 și 55ug/g), acompaniată de valoarea scăzută a ceruloplasminei serice, stabilește diagnosticul de BW. Trebuie avut în vedere faptul că se întâlnesc concentrații crescute de cupru hepatic și în afecțiuni colestatice (ciroză biliară primitivă, colangită sclerozantă, atrezie biliară, colestaza intrahepatică) și de asemenea în toxicozele cuprice non-Wilsoniene (ciroza copiilor indieni, ciroză infantilă endemică, toxicoză cuprică idiopatică) (28). Cuantificarea cuprului hepatic nu se poate realiza în țara noastră.

1.7.4. Scorul de diagnostic.

Pentru a facilita diagnosticul, în anul 2001, un consens internațional de experți în domeniu, a propus un sistem de punctare, alcătuind un scor de diagnostic, folosind aspecte clinice, parametrii biochimici (ceruloplasmina serică, cupruria/24ore) și diagnosticarea

moleculară. Acest scor, cunoscut și sub numele de “Scorul Ferneci” (Tabel 1.II.) a fost adoptat ulterior pentru baza de date Eurowilson (32).

Tabel 1.II. Scorul de diagnostic Ferenci (Leipzig 2001)

Semne și simptome clinice	Scor	Biochimie	Scor
Inel Kayser-Fleischer <i>Prezent</i> <i>Absent</i>	+1 0	Conținutul de cupru hepatic (în absența colestazei) > 5 LSN (50-250μg/g țesut uscat) <5 LSN (50-250μg/g țesut uscat) Normal (<0.8 μmol/g)	+2 +1 -1
Simptome neuropsihiatrice sugestive sau modificări tipice evidențiate la RMN cerebral <i>Severe</i> <i>Moderate</i> <i>Absente</i>	+2 +1 0	Granule Rodanin pozitive (în cazul în care nu se poate realiza cuantificarea cuprului hepatic) Absente Prezente	0 +1
Anemie hemolitică Coombs negative + cupremie crescută <i>Prezentă</i> <i>Absentă</i>	+1 0	Ceruloplasmina serică Normal (>20mg/dl) 10-20mg/dl <10mg/dl	0 +1 +2
Genotipare (Analiza genetică ATP7B) Mutație detectată pe ambii cromozomi Mutație detectată pe un singur cromozom Fără mutație detectată	+4 +1 0	Cupruria (în absența hepatitei acute) Normal 1-2 X LSN > 2 LSN Normal, dar > 5 LSN după testul de provocare cu D penicilamină	0 +1 +2 +2
Scor total >4 – probabilitate foarte mare pentru BW Scor total 2-3 diagnostic probabil dar necesită testare suplimentară Scor total 0-1 diagnostic improbabil LSN* - limita superioară a normalului.			

Valoarea diagnostică a scorului a fost studiată și în populația pediatrică. Pentru o valoare cut-off de 4 s-au identificat sensibilitate 98%, specificitate 97% pentru diagnosticul pozitiv. Pentru cazurile pediatrice s-au efectuat câteva modificări ale scorului de la Leipzig (29). Aceste modificări sunt prezentate în tabelul Tabelul 1.II.

1.7.5. Screeningul familial.

Consilierea genetică este recomandată atât de ghidurile Europene cât și de cele Americane (1,19). Este obligatoriu screening-ul fraților pacienților cu BW, deoarece șansa de

a fi homozigot și a face boala este de 25% (3). Evaluarea ar trebui să includă examenul fizic complet, determinarea ceruloplasminei serice, testele funcției hepatice și teste moleculare pentru mutațiile ATP7B. Screening-ul nou-născutului nu este justificat și poate fi amânat până la vârsta de 1-2 ani (5).

1.8. Tratamentul în boala Wilson

Ghidurile actuale împart tratamentul BW în două mari categorii: tratamentul pacienților simptomatici și tratamentul celor asimptomatici. Raționamentul acestei împărțiri se bazează pe prezumția că progresia afecțiunii este mult mai rapidă la pacienții simptomatici și în aceste situații inițierea cât mai precoce a terapiei chelatoare este esențială. În cazul pacienților asimptomatici scopul tratamentului este prevenirea apariției simptomatologiei. După ceva timp, pacienții simptomatici la care s-a inițiat terapia, devin asimptomatici și vor primi în continuare terapie de întreținere. În cazurile fără răspuns la terapia medicamentoasă sau în cazurile cu insuficiență hepatică acută, efectuarea transplantului hepatic este indicată și are rate impresionante de supraviețuire (33).

Tratamentul pacienților simptomatici. Terapia acestor pacienți trebuie să includă medicamente chelatoare de cupru (D penicilamină sau Trientina) care cresc excreția urinară de cupru. Medicamentele se administrează în doze de 20 mg/kg/zi divizate în 2-4 prize. Durata tratamentului nu este strict definită. După ce enzimele hepatice și funcția hepatică se ameliorează, de obicei după 6-12 luni, dozele medicației chelatoare se pot reduce la 10-15mg/kg/zi, ceea ce reprezintă perioada de tranziție la doza de întreținere. O alternativă este reprezentată de administrarea sărurilor de zinc, care împiedică absorbția zincului din intestin (33). **Tratamentul medicamentos pentru pacienții asimptomatici** are ca scop prevenirea progresiei afecțiunii și prevenirea apariției simptomatologiei. Recomandările actuale pentru pacienții asimptomatici sunt: D penicilamină sau Treintină administrate la doză redusă 10-15mg/kg divizate în 2-4 prize sau săruri de zinc în doze de 50 mg de 3 ori pe zi pentru adulți și 25 mg de trei ori pe zi pentru copii (33).

2. Partea a doua – contribuția personală

2.1 Motivația alegerii temei și obiectivele tezei

Boala Wilson (BW) este o tulburare severă a metabolismului cuprului, determinată de mutații genetice la nivelul genei ATP7B, care conduc la acumularea tisulară a cuprului. Este o patologie cronică, evolutivă, invalidantă care necesită diagnostic și tratament precoce, pentru a preveni complicațiile. Diagnosticul pozitiv este frecvent întârziat din cauza polimorfismului simptomatologiei, al manifestărilor clinice sau al modalităților de debut. Simptomatologia BW a fost prezentată pe larg în partea generală a tezei. BW netratată devine invalidantă, având un impact negativ asupra calității vieții pacienților. Nu există nici un test diagnostic care să afirme sau să infirme cu certitudine BW. Din acest motiv pentru stabilirea diagnosticului pozitiv trebuie coroborate datele clinice, paraclinice, imagistice, histologice, genetice.

Variabilitatea fenotipică a simptomatologiei se datorază, în parte, polimorfismului mutațiilor genetice implicate în această afecțiune, însă studiile efectuate până în prezent nu au putut demonstra această legătură. Variabilitatea fenotipică și lipsa unor corelații genotip-fenotip în BW reprezintă o problemă de actualitate. Dintre mutațiile implicate în această afecțiune, câteva au fost prezente cu o frecvență mai mare în anumite populații sau regiuni geografice. De asemenea, a fost ridicată suspiciunea că acțiunea unor factori epigenetici ar putea avea rol determinant în variabilitatea tabloului clinic și a evoluției pacienților.

Boala Wilson este întâlnită la nivel mondial, cu o prevalență în creștere, evidențiată de studiile publicate în ultimele decenii. Afecțiunea este relativ puțin studiată în țara noastră, reprezentând un domeniu de interes pentru cercetare și inovare.

Am ales această temă, deoarece consider că afecțiunea nu este studiată suficient în țara noastră. Avem date limitate despre pacienții de vârstă pediatrică diagnosticați cu BW, iar studiile efectuate până în prezent au un număr redus de pacienți. Consider că cercetarea actuală poate avea impact pozitiv asupra literaturii autohtone, aducând date noi, provenite din rezultatele cercetării.

Principalul **scop** al lucrării de față este de a stabili corelații între formele de boală și parametri hematologici, biochimici, genetici, datele imagistice, în vederea elaborării unui protocol de diagnostic și terapie.

Obiectivele tezei sunt următoarele:

1. Evaluarea caracteristicilor epidemiologice ale BW la copil;

2. Stabilirea unor corelații între parametri hematologici, biochimici și formele de boală;
3. Stabilirea unor corelații genotip-fenotip;
4. Aplicarea scorului de diagnostic pozitiv (Scorul Ferenci) și depistarea unor criterii noi (sugestive pentru diagnostic) sau unor semne de alarmă;
5. Întocmirea unui protocol de diagnostic și monitorizare a pacienților cu BW;
6. Întocmirea unui protocol de screening pentru BW.

2.2. Material și metodă

Am efectuat un studiu observațional, retrospectiv în perioada ianuarie 2003 – decembrie 2012 și prospectiv, desfășurat în perioada ianuarie 2013 - martie 2018, în care au fost incluși pacienți diagnosticați cu boala Wilson, cu vârsta sub 18 ani, aflați în evidența a două centre universitare din București: Spitalul clinic de Urgență pentru Copii “Grigore Alexandrescu” București și Institutul Clinic Fundeni. Au fost înrolați 66 de pacienți diagnosticați cu BW cu forme de boală variate (asimptomatici, cu formă hepatică sau cu formă neurologică, cu formă atât hepatică cât și neurologică). Pentru fiecare pacient a fost întocmită o fișă de includere în studiu, care a cuprins: date de identificare, vârstă, sex, mediu de proveniență, antecedente herodocolaterale, data stabilirii diagnosticului, modalitatea de debut, date clinice, date biochimice. La pacienții confirmați s-a efectuat screening-ul familial. Pacienții diagnosticați în urma screening-ului au fost de asemenea incluși în studiu.

Criteriile de includere au fost:

- Vârsta sub 18 ani
- Diagnostic de boala Wilson - Scor diagnostic Ferenci ≥ 4

Criteriile de excludere:

- Scor diagnostic stabilit Ferenci ≤ 3
- Pacienți cu înaltă suspiciune dar care nu s-au prezentat pentru completarea investigațiilor
- Pacienți cu altă boală hepatică cronică

Studiul a fost desfășurat cu aprobarea Comisiei de Etică a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii “Grigore Alexandrescu” București.

Colectarea și analiza statistică a datelor

Au fost colectate date privind caracteristicile socio-demografice ale copiilor cu boală Wilson, forma bolii Wilson, antecedente heredo-colaterale de boală Wilson, simptomatologie, examinări paraclinice (de laborator și imagistice), rezultatele testelor genetice și scorul diagnostic.

Datele colectate au inclus variabile calitative și cantitative.

Variabilele calitative au fost: variabile nominale (forma de BW, sexul, mediul de rezidență, domiciliu, antecedente heredo-colaterale BW, simptomatologie, rezultatele examinărilor imagistice, rezultatele testării genetice etc.) și variabile ordinale (clasificarea examinărilor de laborator - sub normal/normal/peste normal, etc.).

Variabilele cantitative au fost: variabile cantitative de tip continuu (vârstă, vârsta la diagnosticare, examinări de laborator) și variabile cantitative de tip discret (scorul diagnostic).

Datele colectate au fost analizate astfel: Variabilele cantitative au fost analizate în funcție de distribuție (test Kolmogorov Smirnov). În cazul distribuției normale (gaussiene), au fost analizați indicatorii de tendință centrală (medie) și de dispersie (deviație standard). În cazul variabilelor cu distribuție non-gaussiană, s-au analizat indicatorii de tendință centrală (mediană – percentila 50) și de dispersie (valoare minimă și valoare maximă, percentilele 25 și 75).

Variabilele calitative au fost analizate ca frecvențe absolute și relative.

Au fost realizate comparații în funcție de forma BW, de sexul pacientului, de mediul de rezidență al acestuia, deprezența bolii Wilson față de lotul martor. În acest scop, pentru variabilele calitative utilizând testul chi square sau Fisher în funcție de situație, iar pentru variabilele cantitative testul t sau testul Mann Whitney U (pentru două loturi – sex, mediu de rezidență, lot cu BW/lot martor), respectiv testul one way ANOVA sau testul Kruskal Wallis H (pentru mai mult de trei loturi - forma de boală), în funcție de distribuție (gaussiană/nongaussiană).

Au fost studiate corelațiile dintre parametrii paraclinici, scorul diagnostic, rezultatul testării genetice, utilizând testul de corelație Pearson sau testul de corelație Spearman, după caz. Pentru prezentarea rezultatelor, s-a recurs la utilizarea graficelor adecvate. Pragul semnificației statistice a fost stabilit la valoarea de 0,05.

Datele au fost colectate cu ajutorul programului Microsoft Office Excel, iar, mai apoi, aceste date au fost recodificate în format SPSS. Analiza statistică a datelor s-a realizat cu ajutorul programului SPSS 23.0.X

2.3. Caracteristicile epidemiologice ale lotului studiat

2.3.1. Material și metodă

Au fost incluși în studiu 66 pacienți diagnosticați cu boală Wilson, diagnosticați în perioada ianuarie 2003 - martie 2018, dintre care 35 pacienți (53%) aflați în evidența Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii “Grigore Alexandrescu”, respectiv 31 pacienți (47%) aflați în evidența Institutului Clinic Fundeni Pentru fiecare pacient am notat: vârsta, sexul, momentul de includere în studiu, mediul de proveniență, zona geografică de proveniență, antecedentele heredo-colaterale de BW.

Diagnosticul de BW a fost stabilit conform criteriilor Ferenci. Toți pacienții incluși în studiu au avut valori ale scorului ≥ 4 . Pentru rudele de gradul I și gradul II ale pacienților incluși, cu vârste < 18 ani, s-a efectuat screening pentru BW (teste ale funcției hepatice: transaminaze, coagulogramă, proteinemie, bilirubina; determinări ale ceruloplasminei serice și cupruriei/24 ore sau în unele cazuri s-a efectuat test genetic).

2.3.2 Rezultate și concluzii

Pacienții incluși în studiu au fost diagnosticați în perioada 2003-2018, dintre care 70% au fost diagnosticați în perioada 2012-2018. Lotul a fost alcătuit din 66 pacienți. Există o ușoară predominanță a sexului masculin, dar fără semnificație statistică. Vârsta medie a pacienților la momentul diagnosticului a fost de 10,59 ani, aproximativ egală între sexe, fără diferențe semnificative.

Dintr-un total de 774 de pacienți cu hepatită cronică aflați în evidența clinicii, BW a reprezentat etiologia hepatitei cronice în 4,01% din cazuri. Majoritatea cazurilor au fost de hepatită cronică virală cu virus B sau C (86,05%), urmate de BW (4,01%) și de hepatită autoimună (3, 62%).

2.4 Manifestările clinice în boala Wilson – rezultatele lotului studiat

Tabloul clinic în BW este polimorf. Pacienții pot fi asimptomatici, diagnosticați prin screening familial sau incidental, sau pot fi simptomatici, având o varietate de manifestări: hepatice, neurologice, psihiatrice, hematologice, oftalmologice, renale, etc. Recunoașterea precoce a semnelor și simptomelor de boală este importantă în vederea ridicării suspiciunii de BW și stabilirea unui diagnostic corect.

2.4.1 Material și metodă

Pentru pacienții incluși în studiu am notat principalele manifestări clinice la momentul diagnosticului. Pacienții au fost împărțiți în patru grupuri în funcție de forma de boală, astfel: BW hepatică (pacienții care au avut numai afectare a funcției hepatice – citoliză hepatică asimptomatică, icter, hepatomegalie, hepatită cronică, insuficiență hepatică acută, ciroză hepatică), BW neurologică (pacienții care au avut numai simptomatologie neurologică în absența afectării hepatice), BW hepatică și neurologică (pacienții care au avut atât modificări hepatice cât și neurologice) și BW asimptomatică (pacienții diagnosticați în stadiul asimptomatic, în urma screening-ului familial). De asemenea, am notat vârsta medie la diagnostic în funcție de forma de boală și de manifestările clinice.

S-a efectuat analiza statistică, conform descrierii anterioare folosind programul SPSS statistics 23X.

2.4.2. Rezultate și concluzii

Pacienții incluși în studiu au fost împărțiți în 4 grupuri în funcție de forma de boală: formă hepatică (66,67 %), formă hepatică și neurologică (13,64%), formă asimptomatică (13,64%) și formă neurologică (6,06%). Nu au existat diferențe semnificative statistice în ceea ce privește distribuția pacienților în funcție de forma de BW și sexul sau mediul de proveniență al pacienților. Dintre manifestările clinice cel mai frecvent întâlnite au fost manifestările hepatice: citoliză asimptomatică 48,5%, hepatomegalie 40,90 %, splenomegalie 22,7 %, icter 16,70 %, ascită 13,6 %, ciroză hepatică 13,6%, insuficiență hepatică 9,1%.

Manifestările neurologice la pacienții din lotul studiat au avut o frecvență de 19,7 %. Anemia hemolitică la diagnostic a fost prezentă în 7,6 % din cazuri și inelul Keyser-Fleischer în 6,1 % din cazuri. Nu au existat diferențe semnificative din punct de vedere statistic în ceea ce privește distribuția manifestărilor clinice de boală și genul pacienților, cu excepția icterului care a fost semnificativ statistic mai frecvent în lotul masculin (26,32%) ($p=0,014$) în comparație cu lotul feminin (3,57%). Prevalența inelului Keyser-Fleischer este înalt semnificativ statistic diferită ($p=0,001$) în funcție de forma de boală. Inelul K-F apare la 33,33 % din pacienții cu afectare atât hepatică cât și neurologică și la 25 % dintre pacienții cu formă neurologică. Pacienții cu forma hepatică de boală și forma asimptomatică nu au prezentat inel K-F.

Cea mai mare vârstă la diagnostic au avut-o pacienții cu formă cu neurologică ($M = 14,5 \pm 1,73$), urmați de cei cu afectare atât hepatică cât și neurologică ($M = 12,22 \pm 2,95$), ceea ce sugerează diagnosticul tardiv. Pacienții asimptomatici au avut cea mai mică vârstă medie la

diagnostic ($M = 10,00 \pm 3,57$). Pacienții cu afectare neurologică au avut media de vârstă la diagnostic semnificativ statistic mai mare în comparație cu cei care nu aveau afectare neurologică ($p=0,014$). De asemenea, media de vârstă a pacienților care au avut anemie hemolitică la diagnostic a fost semnificativ statistic mai mare în comparație cu cei care nu prezentau această manifestare ($p=0,028$). Pacienții cu citoliză asimptomatică au avut media de vârstă înalt semnificativ statistic mai mică ($p<0,001$).

Complicațiile apărute în evoluția BW sunt: anemie hemolitică, boala neurologică, decompensarea bolii hepatice, inelul pericornean K-F pot fi prevenite dacă diagnosticul este stabilit precoce. Astfel, diagnosticul precoce, din stadiul asimptomatic, este de dorit.

2.5. Stabilirea unei corelații între parametri hematologici și forma de boală Wilson

2.5.1 Material și metodă

Pentru pacienții incluși în studiu s-au notat parametri din hemogramă (numărul de leucocite, limfocite, neutrofile, eozinofile, valoarea hemoglobinei, a MCV, a MCH, numărul de trombocite) și parametri biochimici (transaminaze, bilirubină totală, directă și indirectă, GGT, fosfataza alcalină, parametri de coagulare, uree, creatinină, acid uric, valoarea colesterolului, ionogramă, sideremie).

Au fost realizate comparații ale valorilor parametrilor notați în funcție de forma de boală pentru variabilele calitative utilizând testul chi square sau Fisher în funcție de situație, iar pentru variabilele cantitative s-a folosit testul t sau testul Mann Whitney U, respectiv testul ANOVA sau testul Kruskal Wallis H (pentru mai mult de trei loturi - forma de boală), în funcție de distribuție (gaussiană/nongaussiană). Datele au fost analizate cu programul SPSS.

2.5.2. Rezultate și concluzii

Deoarece valoarea medie a eozinofilelor în procent este mai mare decât valoarea normală, am decis compararea acesteia cu valoarea eozinofilelor într-un lot martor din populația generală. A fost alcătuit un lot martor din pacienți internați în clinică cu intercorențe respiratorii și alte afecțiuni decât gastrointestinale și hepatologice. Indivizii din lotul martor au avut vârsta medie aproximativ egală cu pacienții din lotul de BW. De asemenea, distribuția lotului martor a fost egală din punct de vedere al genului pacienților. S-a studiat riscul de apariție a bolii Wilson în funcție de existența valorilor crescute ale eozinofilelor %, utilizând OR (odds ratio – raportul cotelor).

În lotul studiat nu au existat diferențe semnificative statistic între valorile medii ale leucocitelor, limfocitelor, hemoglobinei în funcție de formele de BW. Valorile medii ale trombocitelor diferă semnificativ statistic în funcție de forma de boală astfel: trombocitopenia este semnificativ statistic mai frecventă în grupul pacienților cu formă de boală atât hepatică cât și neurologică. Pacienții asimptomatici au avut valori normale ale trombocitelor. De asemenea, valorile medii ale neutrofilelor diferă semnificativ statistic în funcție de forma de boală. Valori semnificativ statistic mai mari au fost întâlnite la pacienții cu formă atât hepatică cât și neurologică.

A fost observată o valoare mai mare a eozinofilelor la pacienții cu BW, care a fost comparată cu un lot martor. Mediana eozinofilelor pentru copiii cu BW este 3,5%, semnificativ mai mare ($p=0,003$) față de cea a copiilor din lotul martor (2%). Valori crescute aveau 34,09% dintre copiii cu BW și doar 6,06% dintre cei din populația generală. Un procent de 43,18% dintre copiii cu BW și 60,61% dintre cei din lotul martor au valori normale ale eozinofilelor. Importanța practică și posibilitatea utilizării acestui marker pe viitor, ar trebui evaluate pe loturi mai mari de pacienți.

2.6. Analiza parametrilor biochimici la pacienții cu boală Wilson

2.6.1. Material și metodă

Pentru lotul studiat, am notat parametri biochimici ai pacienților cu BW la momentul diagnosticului. Dintre aceștia, am studiat parametri implicați în studiul funcției hepatice: pentru sindromul de citoliză am evaluat - transaminazele serice, valoarea LDH; pentru sindromul de colestază - valoarea bilirubinei totale, directe și indirecte, fosfataza alcalină, GGT; pentru sindromul hepatopriv – proteinemia, electroforeza proteinelor serice, coagulograma. Au fost calculate valorile medii ale parametrilor pacienților cu BW și ulterior comparate cu valorile normale. De asemenea, au fost determinate diferențele valori ale parametrilor în funcție de fenotipul de BW studiat.

2.6.2. Rezultate și concluzii

Valoarea transaminazelor serice a fost moderat crescută în lotul studiat, în medie de 2-3 ori mai mare comparativ cu valoarea normală. Mediana valorilor raportului AST/ALT a fost 0,79 (cu valoarea minimă 0,29 și maximă 6,38). Distribuția AST/ALT nu diferă semnificativ statistic în funcție de forma de boală. S-au întâlnit valori supraunitare ale raportului la 55,56% dintre pacienții asimptomatici, dar fără semnificație statistică. Este posibil ca valorile crescute ale AST/ALT la pacienții asimptomatici ar putea fi un factor de prognostic.

Valoarea albuminei diferă semnificativ statistic în funcție de forma de boală, fiind mai mici în grupul pacienților cu formă hepatică și manifestări neurologice (3,77 g/dl) ($p=0,014$). De asemenea, valoarea gamaglobulinelor diferă semnificativ statistic în funcție de forma de boală. Se întâlnesc valori semnificativ statistic mai mari în grupul pacienților cu formă hepatică și neurologică, sugerând cronicitatea hepatopatiei ($p=0,031$). Valorile medii ale colesterolului, lipidelor, trigliceridelor au fost în limite normale în lotul studiat, fără diferențe semnificative statistic în funcție de forma de boală. S-au evidențiat valori medii ale lipazei serice semnificativ statistic mai mici la pacienții asimptomatici și la pacienții cu formă hepatică de boală ($p=0,005$).

Pacienții incluși în studiu au avut funcție renală normală. Acidul uric a avut valori medii mai mici la 71,43% din pacienții cu formă hepatică și neurologică și la 47% dintre pacienții cu formă pur hepatică, dar fără a avea semnificație statistică.

2.7. Analiza parametrilor biochimici implicați în diagnosticul bolii Wilson

2.7.1. Material și metodă

Au fost introduse în studiu valorile parametrilor biochimici cu rol în diagnosticul bolii Wilson: ceruloplasmina serică, cupruria pe 24 ore, cupremia. Valoarea cuprului liber a fost calculată folosind formula: [cuprul total seric ($\mu\text{g/dl}$) - (3,15 x ceruloplasmina serică (mg/dl))] (28), preluată din literatura de specialitate. S-au calculat valorile medii ale acestor parametri și au fost comparate rezultatele pentru cele patru grupuri de pacienți din studiu.

Pentru analiza statistică am folosit testele amintite mai sus: chi square sau Fisher în funcție de situație; testul t sau testul Mann Whitney U (pentru două loturi – sex, mediu de rezidență, lot cu boală Wilson/lot martor), respectiv testul one way ANOVA pentru compararea mai multor loturi de pacienți sau testul Kruskal Wallis H (pentru mai mult de trei loturi - forma de boală), în funcție de distribuție (gaussiană/nongaussiană).

2.7.2. Rezultate și concluzii

Ceruloplasmina a avut valori normale într-un procent de 2,439% la pacienții cu formă hepatică. De asemenea, a avut valori normale la 25% dintre pacienții asimptomatici și la 25% dintre pacienții neurologici și la 11,11% dintre pacienții cu formă hepatică și neurologică. Valorile medii ale ceruloplasminei diferă semnificativ statistic în funcție de forma de boală. Acestea sunt semnificativ statistic mai mici la pacienții cu formă hepatică și neurologică ($p=0,024$).

Valorile cupruriei pe 24 ore diferă semnificativ statistic în funcție de forma de boală. S-au evidențiat valori semnificativ statistic mai mari în rândul pacienților cu formă de BW hepatică și neurologică ($p=0,07$). Aproximativ 80% dintre pacienții asimptomatici au avut cupruria/24 ore normală.

Se constată o diferență semnificativă statistic ($p=0,039$) în ceea ce privește valorile medii ale cuprului liber între forma hepatică ($20,00\pm 13,96$) și forma neurologică ($-2,29\pm 15,14$). Astfel, cuprul liber poate fi un parametru important în monitorizarea pacienților cu BW.

2.8. Corelații între parametri biochimici și hematologici în BW

2.8.1 Material și metodă

Pentru acesta cercetare s-au selectat parametri biologici cu diferențe semnificative statistic ale valorilor în funcție de forma de boală și s-au studiat corelațiile între aceștia. Valorile parametrilor au fost analizate statistic folosind testele prezentate în capitolul 2.2 Material și metodă, cu ajutorul programului SPSS 23, folosind diagrame de dispersie și regresia lineară.

2.8.2. Rezultate și concluzii

Raportăm corelații pozitive semnificative statistic între valoarea cupruriei/24 ore și valoarea APTT ($r=0,483$; $p=0,001$) și INR ($r=0,313$; $p=0,027$). De asemenea, s-au evidențiat corelații pozitive semnificative între valorile ceruloplasminei serice și ale acidului uric ($r=0,416$; $p=0,018$) și o corelație inversă semnificativă statistic între valoarea ceruloplasminei serice și valoarea APTT ($r= -0,384$; $p=0,0212$).

2.9. Investigații imagistice în boala Wilson

2.9.1. Material și metodă

Pentru evaluarea imagistică a pacienților incluși în studio, s-au efectuat următoarele investigații: ecografie abdominală, RMN hepatic, RMN cerebral. Rezultatele au fost analizate și comparate în funcție de forma de boală. Pentru evaluarea afecțiunii oculare s-a efectuat examen oftalmologic și examinare la lampa cu fantă. Pacienții cu ciroză hepatică compensată sau decompensată au fost evaluați pentru prezența varicelor esofagiene prin endoscopie digestivă superioară. Rezultatele obținute în urma investigațiilor au fost introduse în programul SPSS statistics 23 pentru studiul statistic.

Cele mai frecvente modificări hepatice decelabile prin ecografie abdominală la pacienții cu BW, în lotul studiat au fost: ficat neomogen la 44,8% din pacienți, aspect de steatoză hepatică în 34,5% din cazuri. Aspect de fibroză hepatică la ecografia abdominală au avut 17,2% din cazuri.

Leziunile cerebrale decelabile prin RMN cerebral, au fost localizate la nivelul ganglionilor bazali, în globus palidus și la nivel capsulolenticular. Modificările imagistice cerebrale au fost evidențiate la jumătate din pacienții cu formă hepatică și neurologică. Niciunul dintre pacienții cu formă hepatică sau cu formă pur neurologică nu au prezentat modificări neuroimagistice pe secvențele RMN efectuate.

2.10. Aplicarea scorului diagnostic Ferenci la pacienții incluși în studiu și corelații între acesta și alți parametri

2.10.1. Material și metodă

Pentru pacienții incluși în studiu s-a notat valoarea scorului diagnostic Ferenci (Tabelul 1.III). Această valoare a fost calculată conform criteriilor de diagnostic din literatura de specialitate, date au fost prezentate în partea general a tezei. Ulterior, valorile scorului au fost corelate cu sexul și mediul de proveniență al pacienților, cu forma de BW și cu alți parametri biochimici și imagistici neincluse în scor.

2.10.2. Rezultate și concluzii

Scorul Leipzig (Ferenci) pentru diagnosticul pozitiv de BW a fost mai mare sau egal cu 4 pentru toți pacienții incluși în studiu. Nu au existat diferențe semnificative statistic între valorile scorului și sexul pacienților sau mediul de proveniență. De asemenea nu s-au evidențiat corelații semnificative statistic între valoarea scorului și forma de BW.

Raportăm corelații pozitive, semnificative statistic între valoarea scorului diagnostic și anumiți parametri hematologici și biochimici: limfocite, neutrofile, GGT, APTT, beta2 globulinele, valoarea IgG. Cu cât valoarea acestor parametri a fost mai mare, cu atât valoarea scorului a fost mai mare.

De asemenea, valoarea scorului a fost corelată pozitiv cu prezența insuficienței hepatice și a ascitei și cu aspectul ecografic de steatoză hepatică.

2.11. Biopsia hepatică în boala Wilson, date din lotul studiat

Biopsia hepatică s-a efectuat în scop diagnostic numai în cazurile în care diagnosticul pozitiv a fost incert după efectuarea markerilor biochimici, a evaluării oftalmologice și a evaluărilor imagistice atât cerebrale cât și hepatice.

2.11.1. Material și metodă

Din lotul studiat, 10 pacienți au avut biopsie hepatică, pentru completarea diagnosticului de certitudine

2.11.2 Rezultate și concluzii

Biopsia hepatică poate aduce informații utile în diagnosticul BW, dacă pentru evaluarea fragmentelor se folosesc colorații speciale cu rodanină sau orceină.

Principalele aspecte care se pot observa la microscopia optică sunt reprezentate de modificări sugestive pentru steatoză hepatică macro și microveziculară. De asemenea în funcție de gradul afectării hepatice se pot observa punți de fibroză sau noduli de regenerare. Cuantificarea concentrației hepatice de cupru aduce acuratețe diagnosticului, dacă este disponibilă.

2.12. Importanța screening-ului familial în boala Wilson

2.12.1. Material și metodă

Pentru fiecare pacient diagnosticat cu BW, s-a efectuat screening-ul familial. Pentru screening s-a evaluat funcția hepatică din punct de vedere biochimic (evaluarea transaminazelor, a bilirubinei, a funcției hepatoprive) și imagistic, s-a determinat ceruloplasmina, cupruria pe 24 ore și s-a efectuat probă de încărcare cu Dpenicilamină, în cazurile în care cupruria/24 ore avea o valoare normală sau la limită.

Pacienții cu antecedente heredocolaterale de BW au fost împărțiți în pacienți cu rude de gradul I (mama, tată cu BW) și pacienți cu rude de gradul II (soră, frate, bunic, bunică cu BW).

Screening-ul familial al pacienților cu BW este important pentru diagnosticul cazurilor asimptomatice sau ale cazurilor cu debut tardiv. Se recomandă efectuarea screening-ului fraților pacienților cu BW dar în același timp și screening-ul părinților sau descendenților pacienților nou diagnosticați.

2.12.2. Rezultate și concluzii

În lotul studiat, 23 pacienți au prezentat rude cu BW dintre care 6 pacienți au avut rude de gradul I cu BW (mamă, tată) și 17 pacienți au avut rude de gradul II (frate, soră, bunic, bunică) cu BW. Nu au fost diferențe semnificative statistic în funcție de sex, mediul de proveniență și frecvența rudelor cu BW.

Rudele de gradul I au fost semnificativ statistic mai frecvente la pacienții asimptomatici (55,6%) comparativ cu forma hepatică de boală, la care 2,3% dintre pacienți au prezentat rude de gradul I cu BW. De asemenea, 66,7% dintre pacienții asimptomatici au avut rude de gradul al II-lea cu BW, comparativ cu pacienții cu formă de boală hepatică și neurologică (22,2%) și

cu pacienții cu formă pur hepatică (20,5%), Niciunul dintre pacienții cu formă pur neurologică nu a avut rude de gradul I sau II cu BW.

2.13. Importanța testării genetice în boala Wilson

2.13.1. Material și metodă

Pentru BW sunt mai mult de 500 de mutații cunoscute responsabile de afecțiune la nivelul genei ATP7B. Detectarea afecțiunii și tratamentul precoce sunt esențiale pentru prevenirea dizabilităților neuropsihiatrice, hepatice și sistemice pe tot parcursul vieții. Datorită heterogenității marcate din punct de vedere al vârstei de debut și a manifestărilor clinice, diagnosticul de BW rămâne provocator. Secvențierea directă a genei ATP7B este cea mai sensibilă și mai răspândită metodă de testare confirmată la nivel mondial, iar testarea biochimică concomitentă îmbunătățește precizia diagnosticului.

2.13.2. Rezultate și concluzii

Un total de 39 de pacienți au fost evaluați pentru patru dintre cele mai frecvente mutații. Determinările s-au efectuat prin metoda MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification), într-un laborator privat. Această metodă permite screeningul pentru mutațiile: R778L, A874V, H1069Q și N1270S și screeningul pentru deleții/insertii în cei 21 de exoni ai genei. MLPA este o metodă de screening pentru care literatura citează o acuratețe mai mare de 95%. Analiza a fost efectuată utilizând mixul de sonde P098-C2. Pentru alți trei pacienți testele genetice au fost efectuate de către părinți în Republica Moldova (2 testări) și în Germania (1 testare). Acestea au fost realizate prin secvențiere genică.

Cea mai frecventă mutație dintre cele investigate, a fost H1069Q. A fost prezentă la 11 din 12 pacienți cu testare genetică pozitivă, atât în stare homozigotă, cât și heterozigotă sau heterozigot compus.

Mutațiile genetice au fost identificate la 10 pacienți cu formă hepatică (38,46%) și la 2 pacienți cu formă asimptomatică (40%). Pentru niciunul dintre pacienții cu formă hepatică și neurologică sau cu formă pur neurologică nu s-a evidențiat prezența uneia dintre cele patru mutații evaluate (fără semnificație statistică).

2.14. Elaborarea unui scor de precizie pentru forme severe

2.14.1 Material și metodă

Pornind de la rezultatele obținute în urma efectuării analizei statistice a parametrilor hematologici și biochimici, ai pacienților cu BW, am elaborat un scor de precizie pentru forma severă de boală.

2.14.2. Rezultate și concluzii

Am alcătuit scorul de prezicere în care am introdus mai multe variabile care au fost punctate în funcție de rezultatele semnificative statistic obținute la capitolele 2.5, 2.6, 2.7. Acestea au fost notate după cum urmează. Au fost cuprinși atât parametri hematologici cât și biochimici. Dintre acești am luat în considerare: valoarea neutrofilelor pentru care am acordat 1 punct pentru valori mai mari de $4700/\text{mm}^3$, restul valorilor au primit 0 puncte. Pentru valoarea eozinofilelor $> 4\%$ și $< 9\%$ am acordat 1 punct, pentru valorile $\geq 10\%$ am acordat 2 puncte, iar valorile normale ale eozinofilelor au primit 0 puncte. Trombocitopenia a fost notată în scorul calculat astfel: valori între $150000-100000/\text{mm}^3$ au primit 1 punct, valorile între $50000-90000/\text{mm}^3$ au primit 2 puncte, valorile mai mici de $50000/\text{mm}^3$ au primit 3 puncte, iar valorile normale au fost notate cu 0. Am selectat raportul AST/ALT ca parametru în scorul de prezicere. Valorile supraunitare ale raportului au primit 1 punct. APTT a fost inclus în scorul calculat, pentru valori mai mari decât valoarea normal am acordat 1 punct iar pentru valori ale INR $> 1,3$ am acordat 1 punct. Pentru valori scăzute ale ceruloplasminei am acordat punctaj astfel: pentru valori între $15-20\text{mg/dl}$ am acordat 1 punct, pentru valori între $10-14\text{mg/dl}$ am acordat 2 puncte, iar pentru valori mai mici de 10mg/dl am acordat 3 puncte. Cupruria/24 ore cu valori peste $40 \mu\text{g}/24$ ore a fost punctată astfel: valori între $40-100 \mu\text{g}/24$ ore au primit 1 punct, valorile între $100-200 \mu\text{g}/24$ ore au primit 2 puncte, iar valorile peste $200 \mu\text{g}/24$ ore au primit 3 puncte.

A fost calculat scorul de prezicere pentru 35 pacienți cu BW. Rezultatele au fost comparate cu programul SPSS. A fost folosită curba și regresie pentru a evalua puterea de diagnostic a scorului.

Media scorului calculate pentru cei 35 pacienți a fost de $5,94 \pm 2,13$. Aceasta este ne semnificativ statistic ($p=0,402$) mai mare la pacienții cu formă hepatică comparativ cu pacienții cu formă asimptomatică, diferența fiind de $-0,68$ ($-2,32-0,96$). Pacienții cu formă hepatică și neurologică au scorul calculat semnificativ mai mare ($p=0,047$) comparativ cu al celor cu formă hepatică, diferența fiind de $-1,98$ ($-3,94 - -0,03$).

Scorul calculat se corelează pozitiv semnificativ statistic cu forma bolii Wilson, cu cât forma bolii este mai **gravă** cu atât scorul calculat este mai mare ($r=0,362$; $p=0,033$).

3. Partea a treia - Cercetare multidisciplinară - Apecte socioeconomice implicate în boala Wilson la copil

Cercetare desfășurată în cadrul proiectului POSDRU/159/1.5/S/141086, "Pluri și interdisciplinaritate în programe doctorale și postdoctorale", Proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 – 2013.

3.1. Material și metodă

Lucrarea de față își propune o abordare multidisciplinară a problemei și constă în studiul factorilor socio-economici implicați atât în diagnosticul cât și în managementul bolii Wilson la copil. Acest studiu reprezintă un element de noutate și inovare. Este un studiu observațional în care au fost incluși copiii diagnosticați cu BW și aflați în evidența clinicii Pediatrie III a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii "Grigore Alexandrescu" București. Pentru fiecare copil s-au notat date clinice, paraclinic, iar părinții au completat un chestionar care conține întrebări privind nivelul socioeconomic (Anexa 2). S-a alcătuit o bază de date, iar rezultatele au fost analizate prin programul SPSS statistics23.

3.2. Rezultate și concluzii

S-au constatat diferențe semnificative statistic ale costurilor de evaluare în funcție de forma de BW. Costurile pentru investigațiile pacienților cu formă de boală hepatică și neurologică au fost semnificativ mai mari comparativ cu pacienții asimptomatici. De asemenea, s-au evidențiat diferențe semnificative statistic privind numărul de zile de spitalizare și forma de boală. Numărul de zile de spitalizare a fost semnificativ statistic mai mare la pacienții cu forma de boală hepatică și neurologică comparative cu celelalte forme de boală.

A fost stabilită o relație semnificativă între nivelul de educație, venitul declarant și costul total al spitalizării și cu numărul de zile de spitalizare. Pacienții proveniți din familii cu statut socioeconomic scăzut au mai multe șanse de a avea un număr mai mare de zile de spitalizare.

4. Protocoale de diagnostic și de screening pentru pacienții cu BW

Pe baza datelor obținute în urma cercetării personale, s-au întocmit protocoale de diagnostic și de screening pentru pacienții pediatrici cu suspiciune de BW sau pentru rudele pacienților diagnosticați cu BW. Pe baza datelor existente în literatură și pe baza rezultatelor obținute s-a întocmit un protocol de monitorizare pentru pacienții diagnosticați.

- Pacienți cu vârste >1an cu semne de boală hepatică de la citoliză asimptomatică până la ciroză hepatică (în absența cauzelor infecțioase)
 - Pacienți cu insuficiență hepatică acută ± anemie hemolitică
 - Adolescenți cu tulburări motorii, psihiatrice, tulburări cognitive

Testarea funcției hepatice (transaminaze, bilirubină, fosfataza alcalină, coagulogramă)
Ecografie abdominală

- Ceruloplasmină (VN=20-60mg/dl)
- Cuprurie pe 24 ore (VN < 40μg/24 ore)
- ± determinare cupru liber

Normale
Copil > 15 ani

Considerăm alt diagnostic

Normale
Copil < 15 ani
Se completează investigațiile:

- Test de provocare cu D penicilamină
- Consult oftalmologic
- IRM cerebral
- Testare genetică

- Ceruloplasmină 10-20mg/dl
- Cuprurie N sau < 2xN

Scor diagnostic =2
Se va face test de provocare cu D penicilamină (cuprurie/24 ore > 5XN după provocare) = 2 pct

Ceruloplasmină 10mg/dl
Cuprurie N sau >2xN

Scor diagnostic = 4
Diagnostic stabilit – se continuă evaluarea funcției hepatice

Se evaluează
Gradul afectării hepatice:

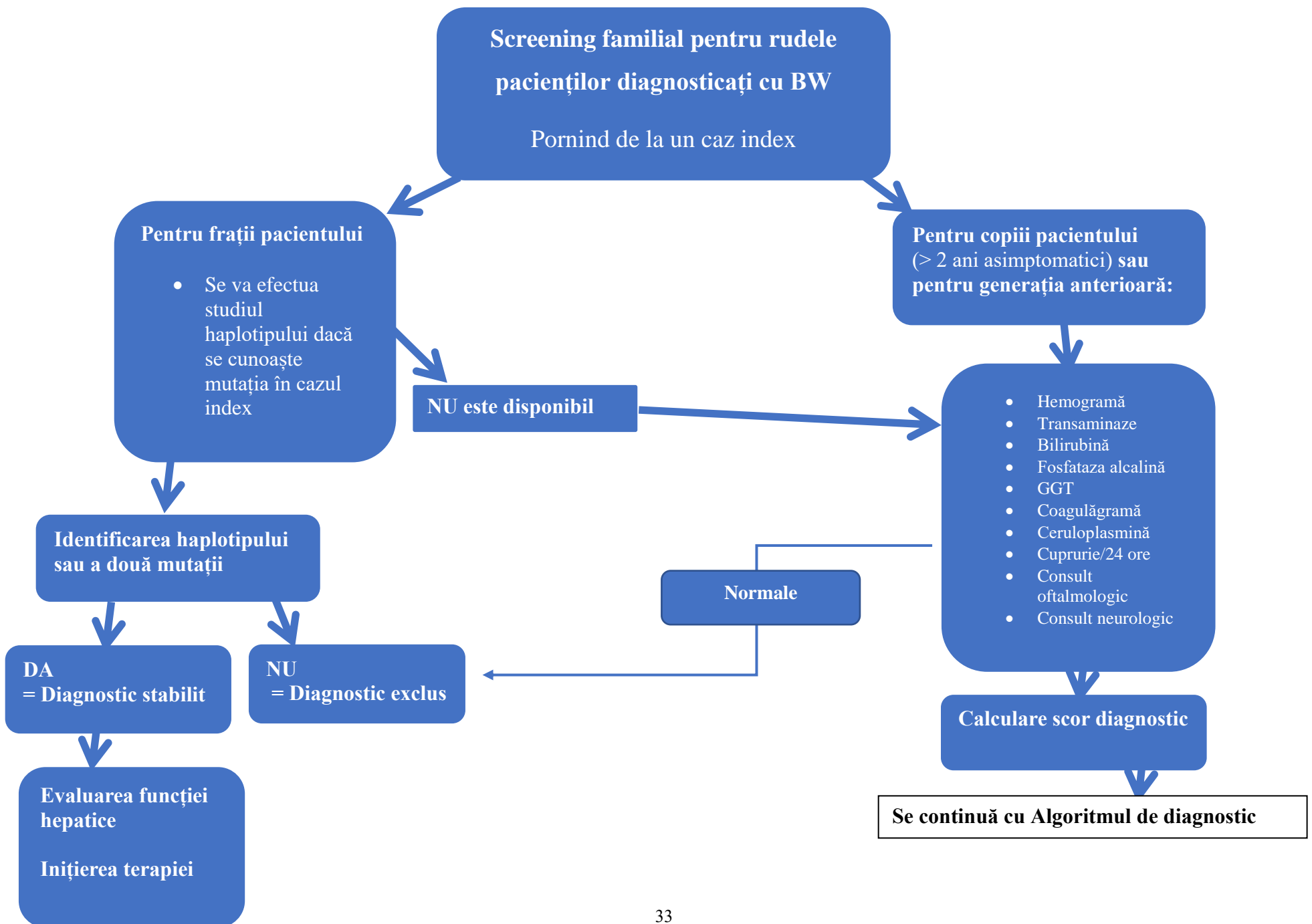
- Proteinemie
- Electroforeza proteinelor serice
- Coagulograma
- Ecografie abdominală
- IRM hepatic
- Gradul de fibroză hepatică (FibroMAX, Fibroscan)
- EDS pentru evaluarea complicațiilor

Se completează investigațiile:

- Test de provocare cu D penicilamină
- Consult oftalmologic – inel K-F +1
- IRM cerebral – leziuni cerebrale +1
- Testare genetică – homozigot +4 heterozigot +1

Legendă

- N = Normal
- IRM = Imagistică Rezonanță Magnetică
- Inel K-F = Inel Kayser-Fleischer
- EDS = Endoscopie digestivă



Protocol de monitorizare pentru pacienții cu BW

Monitorizarea tratamentului cuprinde monitorizarea eficacității terapiei, a aderenței la tratament și apariția efectelor adverse. După inițierea terapiei la pacienții simptomatici, monitorizarea clinică și paraclinică trebuie să fie intensivă și adaptată fiecărui pacient în funcție de severitatea bolii și de posibilitatea agravării simptomatologiei. În primul an de terapie chelatorie, pacienții trebuie monitorizați la 3 luni, apoi la interval de 6 luni, facilitând astfel evidențierea precoce a dificultăților sau non-aderenței la terapie. Pacienții complianți vor avea normalizarea enzimelor hepatice între 6 și 18 luni de tratament.

Analizele necesare monitorizării pacienților cu BW după inițierea terapiei sunt:

- număr total de leucocite și trombocite,
- panel hepatic care să conțină AST, ALT, fosfataza alcalină, bilirubina totală și directă
- ceruloplasmina serică și cupruria/24 ore
- sumar de urină (pentru pacienții care primesc D penicilamină și trientina)
- zincul urinar /24 ore (pentru pacienții care primesc tratament cu zinc)

Pe parcursul terapiei poate apărea anemie, leucopenie cu neutropenie, trombocitopenie, Sumarul de urină poate evidenția proteinurie și semne inițiale de nefrită ce poate apărea ca reacție adversă pe perioada tratamentului.

Monitorizarea conținutului de cupru urinar este utilă pentru modularea dozei terapeutice și pentru evidențierea lipsei de răspuns sau nonaderenței la tratament. Pentru majoritatea pacienților simptomatici excreția urinară bazală de cupru zilnic trebuie să depășească 100 μg , iar la inițierea terapiei este tipic de 10 ori mai mult. În timp excreția urinară de cupru se va menține la 150-250 μg zilnic la pacienții care primesc tratament cu trientina și 250-500 μg pentru pacienții tratați cu D penicilamină. Prin contrast, la pacienții tratați cu săruri de zinc, excreția urinară de cupru trebuie să scadă cu tratamentul. În tabelul 4.I. sunt trecute nivelurile țintă ale cupruriei în funcție de medicația folosită:

Tratament	Scopul tratamentului	Subdozare sau non-aderență	Supradozare sau non-aderență
D penicilamină	250-500	>500	<150
Trientina	150-250	>500	<100
Zinc	30-120	>120	<30

Tabel 4. I. Nivel țintă al cupruriei /24ore în tratament (33)

O altă metodă de determinare a conținutului de cupru este măsurarea cuprului seric din care scădem cuprul legat de ceruloplasmină (ceruloplasmina în mg X 3,15) pentru a calcula cuprul nelegat de ceruloplasmină sau cuprul liber. Pacienții tratați corect au valori ale cuprului liber 5μg/dl-15μg/dl. Pentru metodele imunologice actuale de determinare ale valorilor ceruloplasminei, valoarea calculată a cuprului liber poate fi foarte mică sau chiar negativă în 20 % din cazuri. În aceste cazuri se recomandă folosirea altor parametri pentru monitorizare: examenul clinic, testele hepatice, cuprul urinar.

Monitorizarea aderenței la tratament include istoricul, examenul clinic, enzimele hepatice, cuprul nelegat de ceruloplasmină (valoarea estimată). În plus, pentru pacienții care primesc terapie cu Zinc, valoarea zincului urinar/24 ore indică aderența la tratament și confirmă buna absorbție intestinală (33).

5. Concluzii finale

1. Boala Wilson este o afecțiune genetică, transmisă autosomal recesiv, cu evoluție cronică progresivă, care netratată devine invalidantă. Nerecunoscută la timp, este fatală, punând în pericol viața pacientului. Poate îmbrăca numeroase forme clinice, fiind o afecțiune multisistemică. Stabilirea diagnosticului pozitiv este un proces laborios, îngreunat de disponibilitatea redusă a investigațiilor și de paucitatea criteriilor de diagnostic pentru pacienții de vârstă pediatrică.
2. În studiul efectuat au fost introduși 66 pacienți cu BW, cu media de vârstă la diagnostic de 10,9 ani. S-a constatat ușoară predominanță a sexului masculin în lotul studiat, dar fără semnificație statistică.
3. Manifestările clinice în BW sunt polimorfe. Pacienții pot avea mai multe forme de boală. În lotul studiat, 66,67 % au fost cu formă de boală hepatică, 13,64% din pacienți au fost cu formă hepatică și neurologică, 13,64% au fost asimptomatici și 6,06% au avut formă de boală pur neurologică. Nu am identificat diferențe semnificative statistice în ceea ce privește distribuția pacienților în funcție de forma de BW și sexul sau mediul de proveniență al pacienților.
4. Dintre manifestările clinice cel mai frecvent întâlnite, au fost manifestările hepatice: citoliză asimptomatică 48,5%, hepatomegalie 40,90 %, splenomegalie 22,7 %, icter 16,70%, ascită 13,6%, ciroză hepatică 13,6%, insuficiență hepatică 9,1%. Manifestările neurologice la pacienții din lotul studiat au avut o frecvență de 19,7 %. Anemia hemolitică la diagnostic a fost prezentă în 7,6 % din cazuri și inelul Keyser-Fleischer în 6,1 % din cazuri.
5. Valorile medii ale trombocitelor diferă semnificativ statistic în funcție de forma de boală astfel: trombocitopenia este semnificativ statistic mai frecventă în grupul pacienților cu formă de boală hepatică și neurologică. Pacienții asimptomatici au avut valori normale ale trombocitelor.
6. Am identificat valori semnificativ statistic mai mari ale neutrofilelor la pacienții cu formă mixtă hepatică și neurologică.
7. A fost observată o valoare mai mare a eozinofilelor la pacienții cu BW. Mediana eozinofilelor pentru copiii cu BW este 3,5%, semnificativ mai mare ($p=0,003$) față de cea a copiilor din lotul martor (2%). Importanța practică și posibilitatea utilizării acestui marker pe viitor, ar trebui evaluate pe loturi mai mari de pacienți.

8. Ceruloplasmina a avut valori normale într-un procent de 2,439% la pacienții cu formă hepatică. De asemenea, a avut valori normale la 25% dintre pacienții asimptomatici la 25% dintre pacienții neurologici și la 11,11% dintre pacienții cu formă hepatică și neurologică.. Valorile ceruloplasminei diferă semnificativ statistic ($p=0,024$) în funcție de forma bolii Wilson, pacienții cu formă asimptomatică înregistrând o valoare medie de 16,69 mg/dl, cei cu formă neurologică 15,58 mg/dl, cei cu formă hepatică 9,44 mg/dl, iar pacienții cu formă hepatică și neurologică o valoare medie de 8,39 mg/dl. Acestea sunt semnificativ statistic mai mici la pacienții cu formă hepatică și neurologică.
9. Valorile cupruriei pe 24 ore diferă semnificativ statistic în funcție de forma de boală. S-au evidențiat valori semnificativ statistic mai mari în rândul pacienților cu formă de BW hepatică și neurologică. Aproximativ 80% dintre pacienții asimptomatici au avut cupruria /24 ore normală.
10. Se constată o diferență semnificativă statistic ($p=0,039$) în ceea ce privește valorile medii ale cuprului liber între forma hepatică ($20,00\pm 13,96$) și forma neurologică ($-2,29\pm 15,14$). Astfel, cuprul liber poate fi un parametru important în monitorizarea pacienților cu BW.
11. Cele mai frecvente modificări hepatice decelabile prin ecografie abdominală la pacienții cu BW, în lotul studiat au fost: ficat neomogen la 44,8% din pacienți, aspect de steatoză hepatică în 34,5% din cazuri. Aspect de fibroză hepatică la ecografia abdominală au avut 17,2% din cazuri.
12. Leziunile cerebrale decelabile prin RMN cerebral, au fost localizate la nivelul ganglionilor bazali, în globus palidus și la nivel capsulolenticular. Modificările imagistice cerebrale au fost evidențiate la jumătate din pacienții cu formă hepatică și neurologică. Niciunul dintre pacienții cu formă hepatică sau cu formă pur neurologică nu au prezentat modificări neuroimagistice pe secvențele RMN efectuate.
13. Scorul Leipzig (Ferenci) pentru diagnosticul pozitiv de BW a fost mai mare sau egal cu 4 pentru toți pacienții incluși în studiu. Nu au existat diferențe semnificative statistic între valorile scorului și sexul pacienților sau mediul de proveniență. De asemenea nu s-au evidențiat corelații semnificative statistic între valoarea scorului și forma de BW.
14. Raportăm corelații pozitive, semnificative statistic între valoarea scorului diagnostic și anumiți parametri hematologici și biochimici: limfocite, neutrofile, GGT, APTT, beta2 globulinele, valoarea IgG. Cu cât valoarea acestor parametri a fost mai mare, cu atât valoarea scorului a fost mai mare. V De asemenea, valoarea scorului a fost corelată cu prezența insuficienței hepatice și a ascitei și cu aspectul ecografic de steatoză hepatică.

15. Cea mai frecventă mutație dintre cele investigate, a fost H1069Q. A fost prezentă la 11 din 12 pacienți cu testare genetică pozitivă, atât în stare homozigotă, cât și heterozigotă sau chiar heterozigot compus.
16. Raportăm corelații pozitive semnificative statistic între valoarea cupruriei/24 ore și valoarea APTT și INR. De asemenea, s-au evidențiat corelații pozitive semnificative între valorile ceruloplasminei serice și ale acidului uric și o corelație inversă semnificativă statistic între valoarea ceruloplasminei serice și valoarea APTT.
17. Pe baza rezultatelor semnificative obținute am elaborate un scor pentru prezicerea formei grave de boală. (Scorul calculat pentru prezicerea formelor severe). Media scorului calculat pentru cei 35 pacienți a fost de $5,94 \pm 2,13$. Aceasta este ne semnificativ statistic ($p=0,402$) mai mare la pacienții cu formă hepatică comparativ cu pacienții cu formă asimptomatică, diferența fiind de $-0,68$ ($-2,32-0,96$). Pacienții cu formă hepatică și neurologică au scorul calculat semnificativ mai mare ($p=0,047$) comparativ cu al celor cu formă hepatică, diferența fiind de $-1,98$ ($-3,94 - -0,03$).
18. Scorul calculat se corelează pozitiv semnificativ statistic cu forma bolii Wilson, cu cât forma bolii este mai **gravă** cu atât scorul calculat este mai mare ($r=0,362$; $p=0,033$).
19. Rudele de gradul I au fost semnificativ statistic mai frecvente la pacienții asimptomatici ($55,6\%$) comparativ cu forma hepatică de boală, la care $2,3\%$ dintre pacienți au prezentat rude de gradul I cu BW. De asemenea, $66,7\%$ dintre pacienții asimptomatici au avut rude de gradul al II-lea cu BW, comparativ cu pacienții cu formă de boală hepatică+ neurologică ($22,2\%$) și cu pacienții cu formă pur hepatică ($20,5\%$), Niciunul dintre pacienții cu formă pur neurologică nu a avut rude de gradul I sau II cu BW.
20. S-au constatat diferențe semnificative statistic ale costurilor de evaluare în funcție de forma de BW. Costurile pentru investigațiile pacienților cu formă de boală hepatică și neurologică au fost semnificativ mai mari comparativ cu pacienții asimptomatici. De asemenea, s-au evidențiat diferențe semnificative statistic privind numărul de zile de spitalizare și forma de boală. Numărul de zile de spitalizare a fost semnificativ statistic mai mare la pacienții cu forma de boală hepatică și neurologică comparativ cu celelalte forme de boală.
21. A fost stabilită o relație semnificativă între nivelul de educație, venitul declarant și costul total al spitalizării și cu numărul de zile de spitalizare. Pacienții proveniți din familii cu statut socioeconomic scăzut au mai multe șanse de a avea un număr mai mare de zile de spitalizare.

Bibliografie

1. Burkhead JL, Gray LW. Systems biology approach to Wilson's disease. *Biometals.*;24(3):455-466. 2011
2. Ferenci P, Czlonkowska A, Stremmel W, Houwen R, Rosenberg W, Schilsky M, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol*;56(3):671–85. 2012
Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827811008129>
3. Ghang IJ, Hahn H. The genetics of Wilson disease. *Handb Clin Neurol.*;142:19–34. 2017
4. de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LWJ. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet.*;47:673–88. 2007
5. O'Connor JA, Sokol RJ. Copper metabolism and copper storage disorders. In: Suchy FJ, Sokol RJ, Balisteri WF, editors. Liver disorders in children. Third. *Cambridge University Press*; p. 626–60. 1890
6. Ormerod JA. Cirrhosis of the liver in a boy, with obscure and fatal nervous symptoms. *St Bartholomew' Hosp Rep*;26:56–68. 1890
7. Coffey AJ, Durkie M, Hague S, et al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain*;136(5):1476–1487.2013
8. Coffey AJ, Durkie M, Hague S, et al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain*;136(5):1476–1487.2013
9. Muller T, Tanner S. Disorders of copper metabolism. In: Kelly DA, editor. Diseases of the liver and biliary system in children. 4th ed. *Wiley-Blackwell*; p. 323–68. 2017
10. Vrabelova S, Lotocha O, Borsky M, Kozak I. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 277 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab*;86(1–2):227–85. 2005
11. Ala A, Walker AP, Keyoumars A, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet.*;369:397–408. 2007
12. Merle U, Weiss KH, Eisenbach C, et. Truncating mutations in the Wilson disease gene ATP7B are associated with very low serum ceruloplasmin oxidase activity and an early onset of Wilson disease. *BMC Gastroenterol*;10(8) . 2010
13. Sternlieb I, Scheinberg IH. Prevention of Wilson disease in asymptomatic patients. *N Engl J Med*;278:352–9. 1968

14. Lo C, Badmann O. Epidemiology and introduction to clinical presentation of Wilson disease. In: Czlonkowska A, Schilsky ML, editors. Handbook of Clinical Neurology. Wilson dis. *Elsevier*; p. 7–17. 2017
15. Hedera P. Update on clinical management of Wilson disease. *Appl Clin Genet*;10:9–19. 2017
16. Schilsky ML. Wilson’s disease: clinical manifestation, diagnosis and treatment. *Clin Liver Dis*;3(5):104–7. 2014
17. Lin L, Wang D, Ding N, Zheng C. Hepatic Manifestations in Wilson’s Disease: Report of 110 Cases. *Hepatogastroenterology*. 62(139):657–60. 2015
18. Riordan SM, Williams R. Wilson’s disease gene and phenotypic diversity. *J Hepatol*. 34:165–71. 2001
19. Roberts E, Schilsky ML. AASLD Practice Guidelines: Diagnosis and Treatment of Wilson Disease. *Wiley Intersci*. 2089–111. 2008
20. Rukunuzzaman M. Wilson’s disease in Bangladeshi children: analysis of 100 cases. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 18:121–127. 2015
21. Eisenbach C, Sieg O, Stremmel W, Encke J, Merle U. Diagnostic criteria for acute liver failure due to Wilson disease. *World J Gastroentero*. 13:1711-1714. 2017
22. Naroniakoeska M, Dadalski M, Kaminska D, et al. Clinical presentation of Wilson disease among polish children. *Dev Period Med*. 20(3):216–21. 2016
23. Socha P, Janczyk W, Dhawan A, et al. Wilson’s disease in children: a position paper by Hepatology Committee of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *JPGN*;66:334–44. 2018
24. Krysiak R, Handzlik-Orlik G, Okopien B. Endocrine Symptoms as the Initial Manifestation of Wilson’s Disease. *Yale J Biol Med*. 249–54. 2012
25. Karrunya KJ, Bavanandam S, Dheivamani N, Vijayabhaskar CR, Manoharan K. Spectrum of cutaneous manifestations in Wilson’s disease in children in a tertiary care center in South India: a prospective study. *Int J Contemp Pediatr*. 4:2060-2064. 2017
26. Ferenci P. Diagnosis of Wilson disease. In: Handbook of Clinical Neurology. p. 171–80. 2017
27. Robers E, Socha P. Wilson disease in children. Czlonkowska A, Schilsky ML, editors. *Handb Clin Neurol*. Vol. 142;142:141–56. 2017
28. Schilsky ML. Wilson Disease and Related Disorders. In: Handbook of Liver Disease. 4th ed. p. 263–8. 2018
29. Nicastro E, Ranucci G, Vajro P, Et A. Re-evaluation of the diagnostic criteria for

- Wilson disease in children with mild liver disease. *Hepatology*. 2010;52:p1948.
30. Liu J, Luan J, Zhou X, Cui Y, Han J. Epidemiology, diagnosis, and treatment of Wilson's disease. Vol. 6, Intractable and Rare Diseases Research. 2017.
 31. Pronicki M. Wilson disease - liver pathology. *Handb Clin Neurol*. 2017;142:71–5.
 32. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Et A. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int*. 2003;23:139–42.
 33. Schilsky ML. Wilson Disease: Diagnosis, Treatment, and Follow-up. *Clin Liver Dis*;21(4):755–67. 2017