

*Prikaz slučaja/
Case report*

ZNAČAJ ODREĐIVANJA BAKRA U JETRI
KOD OBOLELIH OD WILSONOVE BOLESTI
- Prikaz slučaja

IMPORTANCE OF HEPATIC COPPER
DETERMINATION IN PATIENTS WITH
WILSON DISEASE - Case report

Correspondence to:

Biljana Stalović, Dipl.farm.-medicinski
biohemičar,
Institut za medicinu rada, Sektor za pre-
ventivnu medicinu, Vojnomedicinska
akademija,
Crnotravska 17, 11000 Beograd
Tel/Phone: +381-11-3609229,
+381-60-0804010;
E-mail: bidzi_84@yahoo.com

Biljana Stalović¹, Snežana Đorđević², Irina Brčerević³

¹ Institut za medicinu rada, Vojnomedicinska akademija

² Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija

³ Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju, Vojnomedicinska akademi-
ja

Ključne reči

Wilsonova bolest, bakar,
ICP-OES metoda

Key words

Wilson disease, copper,
ICP-OES method

Sažetak

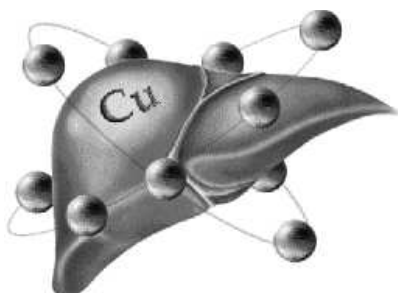
Wilsonova bolest je prvi put opisana 1912. godine kada je Kinnier Wilson opisao ovu bolest kao "progresivnu lentikularnu degeneraciju", familijarno neurološko oboljenje udruženo sa cirozom jetre.

Primarnu ulogu u patogenezi Wilsonove bolesti imaju toksični efekti samog bakra. Defekt gena za ATP-azu, ATP7B, transportnog proteina, koji vezuje bakar u serumu, prouzrokuje smanjenu bilijarnu ekskreciju bakra i dovodi do nakupljanja bakra u jetri i ispoljavanja bolesti. Jedan deo viška bakra raspoređuje se i u druge organe: mozak, bubrege i korneu. Sadržaj bakra u tkivu jetre > 250 µg/g suvog ostatka je najbolji biohemijski test za potvrdu Wilsonove bolesti.

U ovom radu prikazana je optička emisiona spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom kao značajna metoda u dijagnostici Wilsonove bolesti.

UVOD

Wilsonova bolest je redak urođeni poremećaj metabolizma bakra koji se nasleđuje po autozomno-recesivnom tipu. Naziv Wilsonova bolest usvojen je 1912. godine kada je Britanski neurolog Samuel Alexander Kinnier Wilson opisao ovaj poremećaj kao kompleksno nasledno oboljenje, koje se manifestuje cirozom jetre, degeneracijom bazalnih ganglija mozga i zelenobraonkastim (Kayser-Fleisher-ovim) prstenom na rožnjači. (1)



Wilsonova bolest prolazi kroz dug asimptomatski period u toku koga se bakar nagomilava u jetri bez ikakvih vidljivih posledica. Asimptomatski period može trajati od 5 do 14

godina, veoma retko i preko 40 godina, pa se ova bolest karakteriše kao bolest pretežno mladih ljudi. Postoje endemska područja u kojima se bolest ispoljava ranije, u odnosu na životnu dob, a pretpostavlja se da je tome uzrok visok sadržaj bakra u namirnicama i vodi za piće. Prevalenca oboljevanja je 1:160 000 a u nekim krajevima gde su česti brakovi između bliskih srodnika (Japan) učestalost je češća: 1:30 000. (2)

Primarnu ulogu u patogenezi Wilsonove bolesti imaju toksični efekti samog bakra koji se javljaju pri endogenoj akumulaciji velikih količina bakra zbog poremećaja metabolizma bakra.

Bakar

Kao normalan konstituent krvi i esencijalni mikronutrijent, bakar je neophodan za apsorpciju gvožđa, stvaranje eritrocita i hemoglobina, sintezu kolagena i elastina, formiranje kostiju, održavanje mijelina u nervnom tkivu i detoksikaciju organizma od slobodnih radikala. Sastojak je brojnih enzima, pa su simptomi deficita bakra upravo odraz poremećaja enzimske aktivnosti. Bakar u ceruloplazminu ima ulogu u oksidaciji gvožđa pre nego što se transportuje u plazmu. Takođe je sastojak enzima superoksid-dismutaze,

koji štiti organizam od dejstva slobodnih radikala i promoviše sintezu melanina i kateholamina. Rasprostranjen je u različitim namirnicama, uključujući namirnice životinjskog porekla (osim mleka), tako da se u organizam odraslog čoveka ishranom unosi između 0,6 i 2 mg bakra dnevno. Namirnice koje su posebno bogate bakrom su iznutrice, školjke, meso, čokolada, suve mahunarke i suvo voće.

Deo unete količine apsorbuje se, najvećim delom u tankom crevu, u obliku rastvorljivih kompleksa sa L-aminokiselinama i proteinom tipa metaloproteina. Askorbinska kiselina, fitati, sulfidi, cink, gvožđe i kadmijum su u kompeticiji sa bakrom, vezuju se za metaloproteine i smanjuju apsorpciju bakra što je od značaja u terapiji Wilsonove bolesti.

U cirkulaciji, bakar se vezuje za albumin koji ga transportuje u jetru gde se deponuje vezan za metalotionein, u vidu kuproproteina. U kompleksu sa metalotioneinom bakar je netoksičan i služi kao mesto privremenog skladištenja bakra ili kao donor za sintezu proteina plazme - ceruloplazmina. Iz jetre se otpušta u cirkulaciju, gde se transportuje vezan za ceruloplazmin i u vidu eritrokupreina u eritrocitima. Sadržaj u eritrocitima je približno jednak sadržaju u plazmi, gde je najveća količina bakra, oko 95 % od ukupne količine bakra koja cirkuliše u plazmi, sadržana u strukturi ceruloplazmina i koji predstavlja stabilni *pool* bakra u netoksičnom obliku.

Ceruloplazmin je pozitivni reaktant akutne faze, njegova koncentracija povećava se u infekcijama, inflamacijama, malignim bolestima a posebno u bolestima retikuloendotelnog sistema. Deluje kao antioksidans jer sprečava lipidnu peroksidaciju i stvaranje slobodnih radikala, a pokazuje i enzimsku aktivnost feroksidaze (katalizuje oksidaciju Fe^{+2} u Fe^{+3}), i na taj način omogućuje vezivanje gvožđa za transferin, pa je nedostatak bakra u interakciji sa anemijom zbog smanjenog iskorišćenja gvožđa.

Vezan za ceruloplazmin, bakar se distribuira do ćelija i organa kojima je potreban: u jetru, bubrege, srce, mozak, mišiće i kosti. Mišići sadrže manju koncentraciju bakra, ali s obzirom na veliku ukupnu masu, u mišićima je sadržano 40% ukupnog bakra u organizmu. U normalnim uslovima, ćelije koriste samo mali deo unetog bakra za svoje funkcionisanje, a ostali deo predstavlja nepotrebnii višak koji se izlučuje uglavnom putem žuči, a znatno manje urinom i preko kože. (3-5)

Homeostaza bakra u organizmu održava se ravnotežom između intestinalne apsorpcije i bilijarne ekskrecije. U Wilsonovoj bolesti, bilijarna ekskrecija bakra je smanjena pa se od rođenja svakog dana nagomilavaju nove količine bakra a kada se zasite svi depoi, višak bakra se akumulira u jetri i lentikularnom jedru mozga. Otuda potiče i latinski naziv ovog oboljenja: *degeneratio hepatolenticularis* (hepatolenticularna degeneracija). (6)

Genetika

Ispitivanja su pokazala da Wilsonova bolest predstavlja autozomno-recesivno prenosivi defekt gena za ATP-azu, *ATP7B*, transportnog proteina, P-tipa, koji vezuje bakar u serumu (Copper-Binding P-type ATPase). (7)

Kliničke manifestacije Wilsonove bolesti

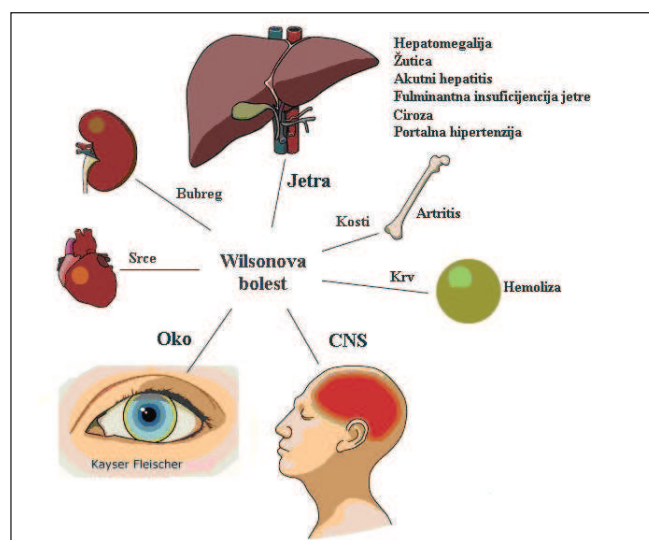
Ciroza, hronični hepatitis i fulminantna insuficijencija jetre su tri glavna oblika hepatične forme bolesti a ispoljavaju se u mlađem životnom dobu (muškarci, 8-12 godina). Početna faza ciroze može biti bez simptoma sa normalnim funkcionalnim testovima jetre. U kasnijem toku, ispoljava se: slabost, anoreksija, žutica i krvarenje iz variksa. Za razliku od ostalih bolesnika sa cirozom jetre, pacijenti sa Wilsonovom bolešću koji pate od ciroze ispoljavaju veliku sklonost ka brzom razvoju portalne hipertenzije.

Fulminantnu hepatičnu insuficijenciju karakteriše klinička slika intravaskularne hemolize, splenomegalije, Kayser- Fleisher-ov prsten i fulminantni tok bolesti. Serumske transaminaze su umereno povećane sa jasnim povećanjem serumskog bilirubina i niskim nivoom serumske alkalne fosfataze i evidentnom hemolitičkom anemijom. Serumski ceruloplazmin može biti u granicama normale, dok su 24h izlučivanje bakra urinom i serumski nivo bakra obično povišeni. Biopsija jetre može jasno pokazati povećanje koncentracije bakra i obično već formiranu cirozu jetre. (8)

Neurološke manifestacije javljaju se kasnije, u drugoj i trećoj deceniji života. Najčešći rani simptomi su dizartrija, tremor, skandiran govor, ukočenost udova i muskulature lica, nevoljni pokreti, povećano lučenje pljuvačke i otežano gutanje hrane i tečnosti zbog čega Wilsonova bolest može ličiti na Parkinsonovu bolest.

Kod velikog broja pacijenata sa Wilsonovom bolešću javljaju se psihijatrijski poremećaji: uznemirenost, iritabilnost, depresija, razdražljivost, vrlo često sa poremećenom kognitivnom funkcijom. Psihijatrijski i neurološki poremećaji se obično povlače uz helatnu terapiju. (9)

Kayser- Fleisher-ov prsten je uglavnom odsutan kod pacijenata sa hepatičnom formom bolesti. Javlja se kod simptomatskih pacijenata, u 90-100% njih sa neurološkim manifestacijama. Kayser- Fleisher-ov prsten nije specifičan simptom Wilsonove bolesti jer se može javiti i kod pacijenata sa intrahepatičnom holestazom, primarnom bilijarnom cirozom i atrezijom. Povlači se, u 80% slučajeva, sa helatnom terapijom nakon 3-5 godina. (10)



Slika 1. Kliničke manifestacije Wilsonove bolesti

U Wilsonovoj bolesti može se javiti i oštećenje drugih organa prvenstveno oštećenje bubrega zbog disfunkcije bubrežnih tubula koja vodi stvaranju bubrežnih kamenaca i acidozi, a mogu se javiti hematurija, proteinurija, glukozurija i Fanconijev sindrom. Zbog gubitka fosfata mogu se javiti promene na kostima: demineralizacija kostiju i osteoporoza. Oboleva i kardiovaskularni sistem. Akutna inter-vaskularna hemoliza javlja se kod 15 % pacijenta a udružena je sa zakasnelim pubertetom, ginekomastijom i amenorejom. Kod pojedinih pacijenata izražena je i hiperpigmentacija kože a kod nekih se može javiti i hipoparatiroidizam. (11)

Dijagnostički testovi

* **Biohemijski testovi za procenu funkcije jetre su:** bilirubin i žučne kiseline za procenu ekskretorne funkcije; albumin, faktori koagulacije, urea, lipidi i lipoproteini za procenu sintetske funkcije jetre i aktivnost enzima: AST, ALT, GGT, ALP za procenu oštećenja tkiva jetre.

Ukoliko postoji neobjašnjivo povećanje nivoa serumskih transferaza, povećanje ukupnog bilirubina, sniženje vrednosti parametara sintetske funkcije jetre uz fulminantnu insuficijenciju jetre, hronični hepatitis ili cirozu jetre postoji sumnja na Wilsonovu bolest.

* Ceruloplazmin

Od dijagnostičkih parametara najvažnije je određivanje serumskog ceruloplazmina. Nivo serumskog ceruloplazmina je fiziološki veoma nizak odmah po rođenju do 6 meseca života, potom dostiže najveći pik u ranom detinjstvu (približno 0,3 - 0,5 g/L), a u kasnijem životnom dobu dostiže nivo odraslih (0,2 - 0,6 g/L). Koncentracija ceruloplazmina je izrazito snižena u Wilsonovoj bolesti i smatra se da je rezultat smanjene inkorporacije bakra u apoceruloplazmin, koji ima kraći poluživot nego bakar vezan za ceruloplazmin.

* Serumski nivo bakra

Ukupan nivo serumskog bakra, koji uključuje i bakar inkorporiran u ceruloplazmin, je obično snižen kao i nivo serumskog ceruloplazmina. Referentne vrednosti za muškarce su 0,6-1,4 mg/L a za žene 0,7-1,6 mg/L.

* Bakar u 24h urinu

Normalne vrednosti bakra u 24h urinu su ispod 0,05 mg/24h.

PRIKAZ BOLESNIKA

Pacijentu L.M. (životne dobi od 21 god.) na sistematskom pregledu urađeni su parametri opšte biohemije i kompletna krvna slika pri čemu je uočeno da pacijent ima povišene vrednosti serumskih transferaza AST i ALT, povišen ukupni bilirubin, holesterol i blagu neutropeniju. Propisan je higijensko-dijetetski režim ishrane.

Zbog nespecifično povišenih vrednosti enzima jetre pacijent je, u više navrata, kontrolisan pri čemu su dobijene povišene vrednosti AST, ALT, blago povećanje alkalne fosfataze i gama-GT dok je pankreasna amilaza bila blago snižena. Radi dodatnih ispitivanja, pacijent je upućen hepatologu i infektologu pri čemu su zahtevane i analize specifičnih proteina plazme: alfa-1-antitripsina koji je bio u okviru referentnih vrednosti i ceruloplazmina čiji je nivo bio izrazito snižen 0,03 g/L u odnosu na referentnu vrednost 0,2-0,6 g/L. Određen je nivo bakra u serumu: 0,13 mg/L i bakar u 24h urinu: 0,28 mg/24h.

Uz povišene enzime jetre sa incidentno uočenim poremećajem hepatograma, bez znakova uvećane slezine i variksa sa uputnom dijagnozom Hepatitis chr. pacijentu je urađena biopsija jetre sa zaključnom dijagnozom: *Steatohepatitis minimalne aktivnosti u stadijumu umerene fibroze*.

Takođe, urađeni su markeri na virusni hepatitis B i C, CMV, herpes virus, VZV, Epstein Barr, ANA, cANCA, pANCA, AMA, ASMA, anti LKM 1 antitela, pri čemu su dobijeni negativni nalazi.

Sa dijagnozom *Laesio hepatis* i uz terapiju hepatoprotektiva pacijent je upućen na Kliniku za gastroenterologiju i hepatologiju VMA gde mu je urađen ultrazvuk abdomena sa sledećim zaključkom: Jetra 160 mm, sa hipoehogenom zonom fokalne nodularne hiperplazije promera 36 mm u IV segmentu jetre. V. porte 16 mm. Slezina 120 x 35 mm, a pregledom oftalmologa Kayser-Fleisher prsten bio negativan.

Nalaz nakon doplera krvnih sudova portnog sistema bio je uredan kao i ponovni pregled oftalmologa. Kako se nalaz sniženih vrednosti ceruloplazmina i serumskog bakra održavao, a vrednost bakra u 24h urinu bila povišena, kod bolesnika je učinjena **biopsija jetre sa određivanjem suvog ostatka bakra** zbog sumnje na Dg: *Morbus Wilson*.

Koncentracija bakra u suvom ostatku određena je metodom optičke emisije spektrometrije sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP-OES metodom) na Institutu za medicinu rada VMA. Parametri metode za određivanje bakra definisani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Parametri ICP-OES metode za određivanje bakra

• Brzina pumpe pri ispiranju i pri analizi:	50 rpm
• RF Snaga:	1150 W
• Protok gasa u rasprivaču:	0,5 L/min
• Protok gasa za hlađenje:	12 L/min
• Protok pomoćnog gasa:	0,5 L/min
• Jedinica za izražavanje rezultata:	ppm
• Emisija zračenja iz plazme se posmatra:	aksijalno
• Izabrane radne talasne dužine:	324,754 nm
	327,396 nm

Od osnovnog standardnog rastvora za bakar (*Copper ICP standard CertiPUR® MERCK*) koncentracije 1000 mg/L, razblaživanjem sa 1% rastvorom HNO₃, napravljena je serija mernih standardnih rastvora bakra koncentracija 0,01 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L i 2 mg/L. Za svaku koncentraciju urađena su po tri uzastopna merenja a odgovor detektora registrovan je preko površine pika za dati element. Očekivane vrednosti koncentracija postavljene su na x-osu a dobijene srednje vrednosti površine pikova na y-osu. Na osnovu dobijenih vrednosti konstruisana je kalibraciona kriva.

Priprema uzorka

Uzorak tkiva jetre primljen je u plastičnoj sterilnoj čašici. Na analitičkoj vagi izmerena je masa vlažnog tkiva: 0,0216 g. Vlažan uzorak je osušen u struji vazduha, zaštićen od kontaminacije iz spoljašnje sredine, pri čemu je dobijena masa suvog ostatka: 0,0087 g.

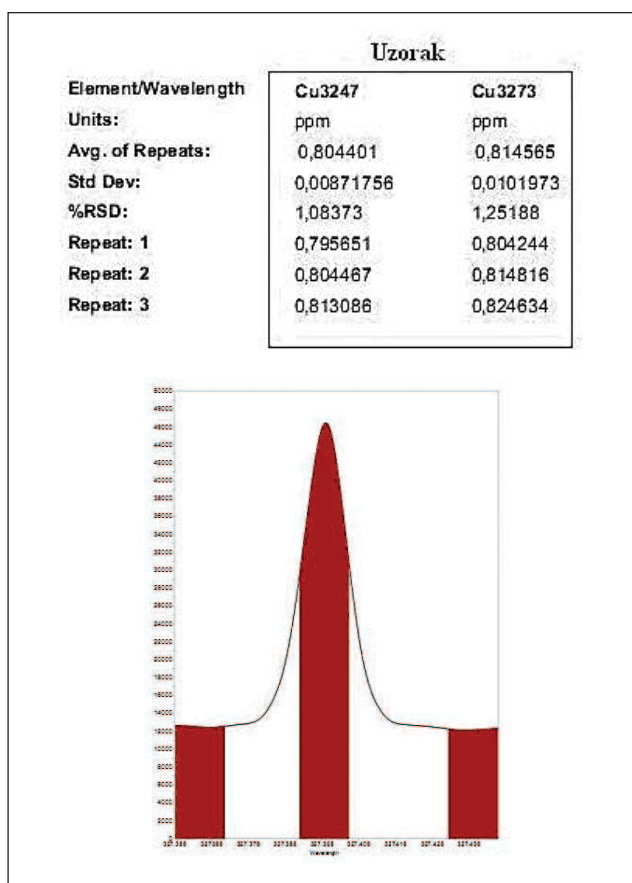
Uzorak je nakon dodatka 65% HNO₃ razoren u mikrotalasnoj pećnici po programu digestije kreiranom prema *Application Note HPR-CL-02*:

Tabela 2. Program digestije na mikrotalasnoj pećnici

	Vreme	Temperatura	Snaga
1	00:25:00	200 °C	1000 Watt
2	00:15:00	200 °C	1000 Watt
3	00:10:00	Hlađenje	

Po završenoj digestiji uzorak je uparen do zapremine od oko 2 ml i kvantitativno prenet u odmerni sud od 10 mL. Pripremljen uzorak je potom profiltriran kroz membranski filter CHROMAFIL pp/RC 20/25 (veličina pore 0.20 μm , \emptyset 25mm, Regenerated Cellulose 20/25) i analiziran na spektrometru. Nepoznata koncentracija bakra u analiziranom uzorku suvog ostaka izračunata je metodom kalibracione krive na osnovu merenja inteziteta signala ispitivanog uzorka. Dobijeni rezultat prikazan je grafički.

Koncentracija bakra u uzorku iznosila je 931 $\mu\text{g/g}$ suvog ostatka, što je više puta veće od normalne vrednosti (< 50 μg bakra/g suvog ostatka bakra).



Slika 2. Koncentracija bakra u uzorku i emisijski spektar na $\lambda=327,396$ nm.

Na osnovu laboratorijskih nalaza i dobijenih vrednosti suvog ostatka bakra zaključeno je da se radi o Wilsonovoj bolesti, zbog čega je indikovana primena D- penicilamina u terapiji. Terapija je započeta sa nešto nižim dozama leka (D- penicilamin tbl 2x1) uz praćenje krvne slike i biohemizma sa enzimima na 7 dana.

Penicilamin deluje tako što gradi helatna jedinjenja sa bakrom, povlači bakar iz tkiva i povećava njegovo izlučivanje urinom zbog čega je neophodno u budućem vremenu pratiti izlučivanje bakra urinom i serumski nivo bakra.

ZAKLJUČAK

Uspješnost terapije i prognoza Wilsonove bolesti zavisi od trenutka kada je lečenje započeto, naročito kada je u pitanju hepatična forma bolesti, zbog čega je posebno važno dijagnostifikovati Wilsonovu bolest u pravo vreme.

Dijagnoza može biti teška jer 50% pacijenata sa umerenim povećanjem serumskih aminotransferaza i prisustvom teške hepatocelularne nekroze i inflamacije (koji ukazuju na Wilsonov hronični hepatitis) nema ispoljen Kayser-Fleisher-ov prsten ni neurološke manifestacije, dok pacijenti sa teškom hepatičnom inflamacijom mogu imati čak normalan nivo serumskog ceruloplazmina.

Algoritam dijagnostičkog postupka podrazumeva: određivanje nivoa serumskog ceruloplazmina, rutinski pregled očiju radi otkrivanja Kayser- Fleisher-ov prstena, određivanje bakra u suvom ostatku tkiva jetre (kada je koncentracija Cu/g suvog ostatka > 250 $\mu\text{g/g}$ suvog ostatka postoji sumnja na WB ali treba biti oprezan jer vrednosti ispod 250 $\mu\text{g/g}$ suvog ostatka ne isključuju u potpunosti WB dok vrednosti iznad ovog nivoa mogu ukazati i na obstruktivne bolesti jetre).

U svim dijagnostički nejasnim slučajevima, naročito kada je nivo serumskog ceruloplazmina normalan, konačnu potvrdu da li se radi o Wilsonovoj bolesti ili ne daje test inkorporacije radioaktivnog izotopa bakra Cu 64 u ceruloplazmin. Test nije rutinska metoda i ne primenjuje se u našoj zemlji.

Kod mladih ljudi, kada standardni biohemijski testovi ne daju definitivni odgovor, neophodno je uraditi i genetsku analizu ATP7B gena na 13. hromozomu. Za nasleđivanje WB oba roditelja moraju biti nosioci mutiranog gena a verovatnoća da dete nasleđi bolest je 25%.

Abstract

Wilson disease was first described in 1912 by Kinnear Wilson as "progressive lenticular degeneration," a familial, neurological disease accompanied by chronic liver disease leading to cirrhosis.

Toxic effect of copper have a main role in the pathogenesis of Wilson disease. Reduced function of ATP7B protein, which is expressed mainly in hepatocytes and functions in the transport of copper within hepatocytes leads to decreased hepatocellular excretion of copper into bile. This results in hepatic copper accumulation and injury. Copper is released into the blood and deposited in other organs: the brain, kidneys, and cornea. Hepatic copper content $> 250 \mu\text{g/g}$ dry weight remains the best biochemical evidence for Wilson disease.

The paper describes case report of diagnostic Wilson disease with review a method for determination of copper in dry hepatic weight: inductively coupled plasma/optical emission spectrometry.

LITERATURA:

1. Kinnear Wilson SA, Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver, *Brain* 1912; 34 (1): 295-507
2. Sherlock S, Dooley J, Diseases of the liver and biliary system, London: Blackwell Scientific Publications 1993; 54: 35-42
3. Raden S, Ishrana uloga u unapredenju zdravlja i prevenciji bolesti, Medija centar "Odbrana", Beograd 2012
4. Vidaković A, Profesionalne bolesti izazvane hemijskim agensima, *Medicina rada* II, 1997:647-739
5. Majkić N, Medicinska biohemija, Beograd 2006
6. Ješić R, Krstić MN, Wilsonova bolest, *Glasnik Inst. za št. žle. i meta. "Zlatibor"*, 2001; 5(3):82-92
7. Schilsky ML, Wilson disease: genetic basis of copper toxicity and natural history, *Semin Liver Dis* 1996; 16:83-95
8. Saito T, Presenting symptoms and natural history of Wilson disease, *Eur J Pediatr*, 1987; 146: 261-265
9. Zudenigo M, Relja M, Hepatolenticular degeneration, *Neurologija* 1990; 39(2):115-27
10. Cairns JE, Walshe JM, The Kayser-Fleischer ring, *Trans. Ophthalmol.Soc UK*, 1971; 90: 187-190
11. Bearn AG, Yu TF, Gutman AB, Renal function in Wilson disease, *J Clin Invest* 1957; 36- 1107-1114