

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris

CZU: [616.831.322+616.36]-008-056.7:575.21/.22(043.2)

CUMPĂȚĂ Veronica

**INTERRELAȚIA DINTRE FENOTIPUL CLINIC ȘI GENOTIP LA PACIENȚII CU
BOALA WILSON**

321.01 – BOLI INTERNE (GASTROENTEROLOGIE ȘI HEPATOLOGIE)

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Chișinău, 2025

Teza a fost elaborată în cadrul Departamentului Medicină Internă, Disciplina de gastroenterologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu"

Conducător

Țurcanu Adela, dr. hab. șt. med., conf. univ.



Conducător prin cotutelă

Sacără Victoria, dr. hab. șt. biol., conf. cercet.

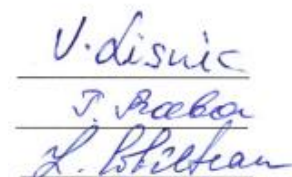


Membrii comisiei de îndrumare:

Lisnic Vitalie, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Raba Tatiana, dr. hab. șt. med., conf. univ.

Cobâlțean Lucia, dr. șt. med., conf.univ.



Susținerea va avea loc la 25 iunie 2025 ora 14:00, în incinta USMF "Nicolae Testemițanu", bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 205 în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului din 10.04.2025 (proces verbal nr.56).

Componența Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

Președinte:

Lupașco Iulianna

dr. hab. șt. med., conf. cercet.



Membri:

Țurcanu Adela

dr. hab. șt. med., conf. univ.



Referenți oficiali:

Raba Tatiana

dr. hab. șt. med., conf. univ.

Rotaru Lilia

dr. șt. med., conf. cercet.

Egorov Vladimir

dr. șt. med., cercet. șt.



Autor

Cumpătă Veronica



CUPRINS

INTRODUCERE	4
1. BOALA WILSON – EVALUAREA INTERELAȚIEI GENOTIP – FENOTIP PRIN PRISMA PROFILULUI CLINICO – EVOLUTIV	8
2. MATERIALE ȘI METODE	8
2.1 Caracteristica generală a cercetării	8
2.2 Metodele de cercetare aplicate în studiu	9
2.2.1 Testarea genetică și metodele utilizate	11
2.3 Procesarea și analiza matematico-statistică a materialului	11
3. REZULTATELE CERCETĂRII	13
3.1 Identificarea aspectelor demografice la pacienții cu boala Wilson	13
3.1.1 Identificarea cohorței de studiu prin evaluarea etapei de pre-screening și screening.....	13
3.1.2 Caracteristica demografică a pacienților cu boala Wilson din cohorta de studiu	13
3.2 Definirea fenotipurilor clinice evidențiate la pacienții cu boala Wilson	16
3.2.1 Descrierea fenotipului hepatic	16
3.2.2 Analiza fenotipului neuro-psihiatric	17
3.2.3 Evaluarea fenotipului neuro-hepatic	18
3.3 Caracteristica mutațiilor genetice determinate la pacienții cu boala Wilson	21
3.3.1 Caracteristica mutațiilor identificate în lotul de cercetare	21
3.3.2 Identificarea relației genotip-fenotip la pacienții cu boala Wilson	21
3.4 Rolul screening-ului familial la pacienții cu boala Wilson	26
3.4.1 Rezultatele obținute în screening-ul familial al pacienților cu boala Wilson	26
3.4.2 Crearea algoritmului de diagnostic în boala Wilson	27
4. CONCLUZII GENERALE	30
RECOMANDĂRI PRACTICE	30
BIBLIOGRAFIE	31
INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICARE REZULTATELOR CERCETĂRII	32

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate. Boala Wilson (BW), cunoscută și ca degenerescența lenticulară, reprezintă o patologie autozomal recesivă, cauzată de mutații ale genei ATP7B, localizată pe cromozomul 13 (locus genic: 13q 14.3–921.1) [1]. Disfuncția proteinei ATP7B rezultă în afectarea excreției biliare a cuprului (Cu) și, prin urmare, la acumularea de Cu în ficat și în țesuturile extra-hepatice. Tabloul clinic este foarte variat, afectarea hepatică și neurologică fiind formele principale de prezentare. Boala poate deveni simptomatică la orice vârstă sau poate rămâne asimptomatică pe un termen nedeterminat. [2]

Până în prezent au fost identificate peste 900 de variante patogene ale acestei gene, iar eforturile de a le asocia cu fenotipurile bolii au fost neconcludente și controversate [3]. Dificultatea de a stabili corelația genotip-fenotip poate fi atribuită mai multor factori: numărului mare de mutații care apar doar în câteva familii și heterogenității clinice a pacienților cu BW, chiar și în rândul membrilor aceleiași familii. Faptul că majoritatea pacienților sunt heterozigoți compuși, având mutații diferite pe fiecare alelă, face dificilă corelarea unui fenotip cu o alelă mutantă [4]. În plus, s-a demonstrat că expunerea profesională la Cu provoacă modificări la nivel de genom și leziuni ale ADN-ului [5]. Acest aspect, în combinație cu modulatori epigenetici și factori de mediu, poate juca un rol în heterogenitatea fenotipică a pacienților cu BW. Aceste bariere pot fi parțial depășite prin studierea genetică a BW la pacienții homozigoți. [6] Un studiu multifamilial într-o populație izolată, cu grad ridicat de omogenitate genetică și de mediu, dintr-o regiune montană din România a evidențiat o influență egală a presupușilor modifikatori genetici și a factorilor de mediu privind prezentarea clinică și vârsta la debutul BW la pacienții cu un anumit genotip [7].

Mutațiile specifice ale genei ATP7B sunt mai frecvente în populații în care predomină căsătoriile consanguine. Spre exemplu, în Liban, consangvinitatea are o prevalență de 35,5%, crescând probabilitatea de homozigocitate pentru bolile autozomal recesive. [8] Chabik și coautorii au evidențiat prezența unei manifestări clinice și biochimice similare a BW cu o concordanță intra-familială ridicată, sugerând că factorii analogi împărțiți în aceleași familii pot influența puternic prezentarea bolii [4]. Pe de altă parte, unii autori au arătat diferențe semnificative de fenotip în ciuda aceluiași genotip, presupunând o influență semnificativă asupra fenotipului BW de către factori epigenetici/de mediu [9, 10]. Un studiu din China a demonstrat o relație între unele variante patogenetice, diferite forme clinice și apariția BW. De exemplu, mutația *p.Arg919Gly* a fost corelată cu forma neurologică, iar *p.Arg778Leu* a fost corelată cu o vârstă mai tânără de debut și niveluri mai scăzute de ceruloplasmină (Cp) și Cu seric. Cu toate acestea, cercetarea a inclus doar populația chineză, astfel sunt necesare studii ulterioare pentru pacienții de rasă albă cu BW. [11] Mai mult ca atât, incidența acestei boli în anumite regiuni pare a fi strâns legată de așa-numitul „efect fondator”, indicând proprietatea anumitor comunități „izolate” de a contracta mai frecvent boli genetice autozomale recesive, deoarece mutațiile, care în mod normal sunt rare, în aceste comunități se întâlnesc mult mai frecvent [12].

Totuși, cercetări recente au stabilit că heterogenitatea fenotipurilor clinice nu depinde doar de gradul de alterare funcțională a ATP7B sau de mutația genetică, dar și de mutații patogene în alte gene implicate în homeostazia Cu, definite în aceleași studii ca „genele homeostaziei cuprului” sau CHG (“*copper homeostasis genes*”) [13], care ar putea fi analizate în viitor. Cercetările viitoare pot schimba abordarea terapeutică a pacienților cu BW în raport cu genotipul lor, sugerând necesitatea

unei terapii combinate în cazul că sunt prezente cele mai severe mutații patogene, asociate cu polimorfismul ATP7B și/sau al CHG.

Actualmente, se impune o abordare complexă în managementul BW, analizând corelarea genotip-fenotip prin prisma identificării posibilităților de diagnostic/screening, tratament și prognostic.

Ipoteza de cercetare. Ca urmare a acestei cercetări pentru prima dată în Republica Moldova, vom putea identifica un profil genetic al pacientului cu BW, fapt care va permite identificarea mutațiilor implicate în dezvoltarea bolii pe teritoriul țării, precum și a statutului moștenit (homozigot recesiv, heterozigot compus, heterozigot simplu și fără mutații detectate la nivelul genei ATP7B). Apartenența la un fenotip clinic va permite determinarea prezentării clinice predominante precum și a factorilor, care ar putea influența evoluția clinică a bolii. Evidențierea unor asocieri între fenotip și genotip, ar evidenția noi soluții în diagnosticarea și tratamentul pacientului cu BW. Evaluarea familială a probandului ar identifica noi membri de familie în stadiu clinic asimptomatic, fapt care ar permite inițierea terapiei precoce cu prevenirea de complicații și leziuni ireversibile.

Scopul cercetării științifice constă în studierea și stabilirea corelației între fenotipul clinic și genotipul pacientului cu boala Wilson pentru a elabora un algoritm de diagnostic și de screening familial al pacienților cu boala Wilson.

Pentru realizarea scopului au fost propuse următoarele **obiective generale de cercetare:**

1. Identificarea aspectelor demografice la pacienții cu boala Wilson din Republica Moldova;
2. Definirea fenotipurilor clinice determinate la pacienții cu boala Wilson;
3. Caracterizarea spectrului mutațiilor genetice la pacienții cu boala Wilson;
4. Evaluarea interrelațiilor clinico-genetice la pacienții cu boala Wilson;
5. Studierea impactului screening-ului familial la pacienții cu boala Wilson;
6. Elaborarea unui algoritm de diagnostic și de screening familial al pacienților cu boala Wilson.

Metodologia generală a cercetării științifice. Pentru a realiza scopul și obiectivele cercetării a fost planificat un studiu analitic observațional de cohortă, cu caracter bidirecțional. În studiu au fost incluși volumul integral de pacienți care sunt suspectați sau diagnosticați cu boala Wilson. Pacienții au fost selectați din cadrul secției de hepatologie a Instituției Medico-Sanitare Publice (IMSP) Spitalul Clinic Republican "Timofei Moșneaga", care este baza clinică a Disciplinei de gastroenterologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie (USMF) "Nicolae Testemițanu", precum și din cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară Umană, parte a Centrului Genetic de Excelență din Republica Moldova, din incinta IMSP Institutul Mamei și a Copilului. Conform protocolului cercetării, au fost efectuate trei etape de evaluare a pacienților: etapa de pre-screening, etapa de screening și etapa de fenotipare. Confirmarea diagnosticului suspectat la etapa de pre-screening, unde pacienții au fost evaluați clinic, biochimic și imagistic, a fost stabilit prin scorul Leipzig modificat, care a inclus și evaluarea genetică. Datele obținute în cadrul studiului au fost analizate statistic, iar rezultatele acestora au servit drept bază pentru formularea concluziilor.

Cercetarea a fost efectuată în baza avizului pozitiv al Comitetului de Etică a Cercetării (proces verbal nr. 1 din 25 mai 2021) și în baza deciziei Consiliului Științific al Consorțiului nr.1/4.16 din 02.12.2021 cu privire la aprobarea proiectului de cercetare, temei, conducătorului științific, conducătorului prin cotutelă și comisiei de îndrumare la teza de doctor în științe medicale.

Noutatea și originalitatea științifică a studiului. Pentru prima dată în Republica Moldova a fost efectuată un studiu complex care analizează nu doar profilul clinic al pacientului cu BW, dar și interrelația dintre genotip și fenotip la pacienții cu BW, ceea ce aduce o contribuție importantă în domeniul geneticii medicale și a hepatologiei. Cercetarea introduce un model integrat de analiză a pacienților cu BW ținând cont de variabile demografice legate de vârstă și sex.

În premieră, au fost listate și definite conform parametrilor genetici și fenotip, totalitatea de variante identificate la pacienții cu BW. De asemenea, acestea au fost repartizate pe regiuni (nord, centru, sud și regiunea din stânga Nistrului), astfel fiind evidențiate asocierea unor mutații cu anumite regiuni teritoriale din țară.

Au fost evidențiate aspecte ce țin de debutul bolii și durata de diagnosticare a BW, precum și impactul acesteia asupra posibilităților de diagnostic, tratament și prognostic. Studiile comparative între diferite grupuri de pacienți diferențiați pe criterii legate de tipul mutației moștenite, au scos în evidență modul de interacțiune între mutație și factorii de mediu, precum și influența acestora asupra manifestării bolii.

În premieră, a fost propus un algoritm de evaluare clinică multidisciplinară a pacientului suspect cu BW, precum și un algoritm de evaluare a membrilor de familie ai pacienților ce suferă de această tulburare. Acestea au ca scop de a facilita management-ul persoanei suspecte și pașii necesari pentru a definitiva diagnosticul, precum și tactica ulterioară de conduită în funcție de scorul obținut.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării. Realizarea studiului observațional retro-prospectiv a contribuit la completarea unor lacune în evidența științifică actuală din domeniu, remarcate în meta-analize și referate sistematice internaționale. Rezultatele obținute au o aplicabilitate directă în practica medicală și genetica clinică cu scop de a îmbunătăți diagnosticul, tratamentul și management-ul BW. Analiza lotului în funcție de organul predominant afectat, scoate în evidență caracteristici ale fiecărui fenotip, esențiale în stabilirea diagnosticului și monitorizarea bolnavului, iar ilustrarea unor studii de caz concrete demonstrează rolul direct al rezultatelor asupra practicii clinice. Întârzierea diagnosticării reprezintă unul din factori care provoacă decompensarea hepatică și leziuni neurologice ireversibile în pofida inițierii ulterioare a terapiei specifice, iar dezvoltarea unor strategii la nivel de politici de stat ar crește vigilența medicală și gradului de conștientizare al populației generale. Algoritmul propus pentru diagnostic și screening poate fi utilizat în centrele de genetică și gastroenterologie, iar recomandările practice oferite contribuie la optimizarea management-ului pacienților. Studiul evidențiază rolul screening-ului familial pentru depistarea persoanelor cu risc din cadrul familiilor pacienților cunoscuți cu BW, oferind posibilitatea de monitorizare proactivă și prevenire a complicațiilor severe. Astfel, fiind identificat un subgrup de pacienți asimptomatici, purtători de variante patogene, care au inițiat precoce tratamentul cu chelatori. Acest lucru evidențiază impactul economic al diagnosticării precoce prin reducerea costurilor legate de prevenirea complicațiilor ireversibile, iar utilizarea acestor rezultate în politici de sănătate publică ar avea beneficii semnificative asupra populației și sistemului medical.

Aprobarea rezultatelor cercetării. Rezultatele studiului și aspectele clinice cercetate au fost oglindite prin discuții la forumuri naționale și internaționale (Moldova, România, Spania, Japonia, Țările de Jos), precum și la conferințele anuale ale colaboratorilor și studenților USMF "Nicolae Testemițanu":

– EASL Congress 2025 (Amsterdam, Țările de Jos, 2025);

- Conferința Națională ”Ziua Bolilor Rare 2025” (Chișinău, Republica Moldova, 2025);
- The 5th UpDate on Hepatology Course: Refocusare și Resetare în Boli Hepatice (Chișinău, Republica Moldova, 2024);
- The 43rd National Congress of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy (Cluj Napoca, România, 2024);
- The 10th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera (Chișinău, Republica Moldova, 2024);
- The 33rd Annual Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) (Kyoto, Japonia, 2024);
- The 4th UpDate on Hepatology Course: Boli hepatice rare – tranziția îngrijirii medicale de la copil la adult (Chișinău, Republica Moldova, 2023);
- 1st ERN RARE-LIVER EASL ACADEMY (Barcelona, Spain, 2023);
- Conferința Științifică Anuală - Cercetare în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță. USMF „Nicolae Testemițanu” (Chișinău, Republica Moldova, 2023);
- The 37th Balkan Medical Week THE PERSPECTIVES OF BALKAN MEDICINE IN THE POST COVID-19 ERA (Chișinău, Republica Moldova, 2023);
- The 42nd National Congress of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy (Iași, Romania, 2023);
- The 10th UpDate on Hepatology Course (Bucharest, Romania, 2023);
- The 3rd UpDate on Hepatology Course: New Frontiers in Hepatology (Chișinău, Republica Moldova, 2022);
- Conferința Științifică Anuală - Cercetare în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță. USMF „Nicolae Testemițanu” (Chișinău, Republica Moldova, 2022);
- The 2nd UpDate on Hepatology Course: Hepatologia de precizie; 17 - 18 Decembrie 2021, (Chișinău, Republica Moldova);
- Conferința Științifică Anuală Consacrat Aniversării a 76-a de la Fondarea USMF „Nicolae Testemițanu” (Chișinău, Republica Moldova, 2021).

Rezultatele obținute au fost aprobate la ședința Disciplinei de gastroenterologie, Departamentul Medicină Internă, (proces verbal nr. 2 din 12 noiembrie 2024) și la ședința Seminarului de profil 321. Medicină Generală/Specialitatea: 321.01. Boli Interne (Gastroenterologie, Hepatologie); 321.02. Endocrinologie; 321.08 Dermatologie și Venerologie (proces verbal nr. 1 din 20 ianuarie 2025).

Publicații la tema de cercetare. Materialele tezei au fost reflectate în 20 publicații, dintre care: articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil – 5, materiale/teze la conferințe internaționale – 11, materiale/teze la conferințe naționale - 4. În baza rezultatelor obținute în cercetarea realizată au fost înregistrate 2 certificate de inovație și 2 acte de implementare.

Sumarul compartimentelor tezei. Teza este scrisă în limba română cu titlu de manuscris. Lucrarea este expusă pe 141 de pagini de text și cuprinde: lista abrevierilor, tabelor și a figurilor, introducere, 5 capitole, concluzii generale, recomandări practice, lista referințelor bibliografice cu 176 surse, anexe, declarația privind asumarea răspunderii, lista publicațiilor/participărilor la forumuri științifice și CV-ul autorului. Lucrarea conține 7 tabele, 13 figuri și 30 anexe.

Cuvinte cheie: boala Wilson, gena ATP7B, mutație patogenă, corelație genotip-fenotip, parametrii cuprului, screening familial, testare genetică

CONȚINUTUL TEZEI

1. BOALA WILSON – EVALUAREA INTERELAȚIEI GENOTIP – FENOTIP PRIN PRISMA PROFILULUI CLINICO – EVOLUTIV

În cadrul acestui capitol sunt reflectate informații ce țin de epidemiologie, viziuni contemporane privind etiopatogeneza BW, variabilitatea genetică, diversitatea fenotipică și clasificarea prezentării clinice, dificultăți de corelații fenotip-genotip și implicarea mecanismelor epigenetice, provocările de diagnostic și rolul scorului Leipzig în stabilirea diagnosticului, precum și impactul screening-ului familial în BW.

2. MATERIALE ȘI METODE

2.1. Caracteristica generală a cercetării

Având în vedere că BW este o maladie genetică rară nu se calculează eșantionul de pacienți. Astfel, în studiu au fost incluși *volumul integral* de pacienți care au fost suspecți sau diagnosticați cu această boală. Pacienții au fost selectați din cadrul secției de hepatologie al ISMP Spitalul Clinic Republican ”Timofei Moșneaga”, care este baza clinică a Disciplinei de Gastroenterologie, Departamentul Medicină Internă a USMF ”Nicolae Testemițanu”, precum și din cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară Umană, parte a Centrului Genetic de Excelență din Republica Moldova, din incinta IMSP Institutul Mamei și a Copilului.

Lotul de studiu a fost definit conform criteriilor de includere și excludere:

Criteriile de includere:

1. Scorul Leipzig modificat ≥ 4 puncte;
2. Pacient cu vârsta ≥ 5 ani;
3. Consimțământul pacientului sau al reprezentantului legal pentru a participa în studiu.

Criteriile de excludere:

1. Scorul Leipzig modificat < 4 puncte;
2. Pacient cu vârsta < 5 ani;
3. Prezența altor boli hepatice acute și cronice;
4. Lipsa consimțământului pacientului sau al reprezentantului legal pentru a participa în studiu.

Astfel, pentru realizarea scopului și a obiectivelor a fost planificat un studiu analitic observațional de cohortă. Cercetarea a cuprins mai multe etape și s-a desfășurat în perioada 2020 – 2024. Design-ul studiului este reprezentat în figura 1.

Etapa I. Identificarea conceptului și ipotezei științifice - include studierea resurselor bibliografice cu crearea conceptului de cercetare. A fost definită problema care necesită a fi studiată și a cuprins o analiză direcționată privind aspectele epidemiologice, clinice, paraclinice și de corelație genotip-fenotip, atât la nivel mondial, cât și național. De asemenea, au fost cercetate și implicarea altor factori în diversitatea fenotipică, precum și practicile internaționale privind screening-ul activ în cadrul familiilor cu membri afectați de BW.

Etapa II. Studiu descriptiv retrospectiv și prospectiv a pacienților cu BW - pentru definirea lotului de cercetare final, această etapă a fost divizată în două sub-etape:

- a) Prescreening-ul – include volumul integral de pacienți suspecți cu BW, ce prezentau manifestări clinice suspecte și/sau tulburări ai metabolismului Cu. Tot aici a fost efectuată testarea genetică pentru identificarea mutațiilor cauzatoare de BW și diferențierea membrilor asimptomatici de heterozigoții simpli.
- b) Screening-ul – definitivarea lotului de cercetare conform criteriilor de includere și excludere, care presupune calcularea scorului Leipzig modificat conform parametrilor clinici, hematologici, biochimici, imagistic și genetic.

Etapa III – evaluarea lotului de cercetare prin prisma prezentării clinice și a variantelor moștenite. Identificarea interrelațiilor genotip-fenotip.

- a) Fenotipare - repartizarea pacienților a-/presimptomatici și simptomatici clinico-biologic în funcție de organul/sistemul afectat: hepatic, neuro-psihiatric și neuro-hepatic (numit și mixt).
- b) Genotipare – caracterizarea mutațiilor genetice determinate la pacienți în funcție de frecvența alelelor, tipul variantelor, statutul moștenirii (homoziigoți recesivi, heterozigoți compuși) și distribuția regională.
- c) Evaluarea interrelațiilor clinico-genetice – distribuirea pacienților în profiluri mutaționale în funcție de alela moștenită (*p.H1069Q* versus *non-p.H1069Q*) și a tipului de variante (MMs/MMs versus MS/alte-M), pentru aprecierea unor asocieri între expresia genetică și tabloul fenotipic.

Etapa IV. Procesarea și analiza matematico-statistică a materialului.

Aspectele etice. Persoanele incluse în cercetarea au primit formularul de informare și au semnat formularul de acceptare pentru acest studiu. Pacienților le-a fost asigurată confidențialitatea pe durata acestei cercetări, toate datele colectate de la pacienți fiind stocate într-o bază de date cu acces restricționat. Avizul pentru această cercetare a fost obținut în cadrul Comitetului de Etică a Cercetării al Instituției Publice USMF „Nicolae Testemițanu” - proces verbal nr. 1 din 25 mai 2021.

2.2. Metodele de cercetare aplicate în studiu

Datele au fost colectate conform formularului de evaluare primară a pacientului cu BW, elaborat în cadrul cercetării, care a presupus colectarea următoarelor informații: date personale, date demografice, date sociale, statutul social, educație și prezența unei activități. Evaluarea clinică a inclus identificarea acuzelor cu încadrarea într-un fenotip clinic, prezența simptomelor hepatice, precum și a manifestărilor extrahepatice, semne de decompensare hepatică, istoricul bolii, date fiziologice, maladii concomitente, anamneza eredo-colaterală, identificarea viciilor; contact cu substanțe chimice sau toxice; anamneza alergologică; precum și examenul fizic. Analiza rezultatelor investigațiilor include testele de laborator generale și specifice BW, precum și investigații instrumentale. Evaluarea gradului de fibroză s-a efectuat prin aplicarea scorurilor neinvazive (scorul APRI, FIB-4). Toate investigațiile au fost efectuate atât în cadrul Centrelor Medicilor de familie, cât și la nivelul Spitalului Clinic Republican ”Timofei Moșneaga” și Centrul de Diagnostic Republican. Pentru aprecierea leziunilor extrahepatice, au fost consultați și alți specialiști: oftalmolog, neurolog, psihiatru și ginecolog. Implicarea geneticianului este una primordială în stabilirea diagnosticului și efectuarea testului genetic.

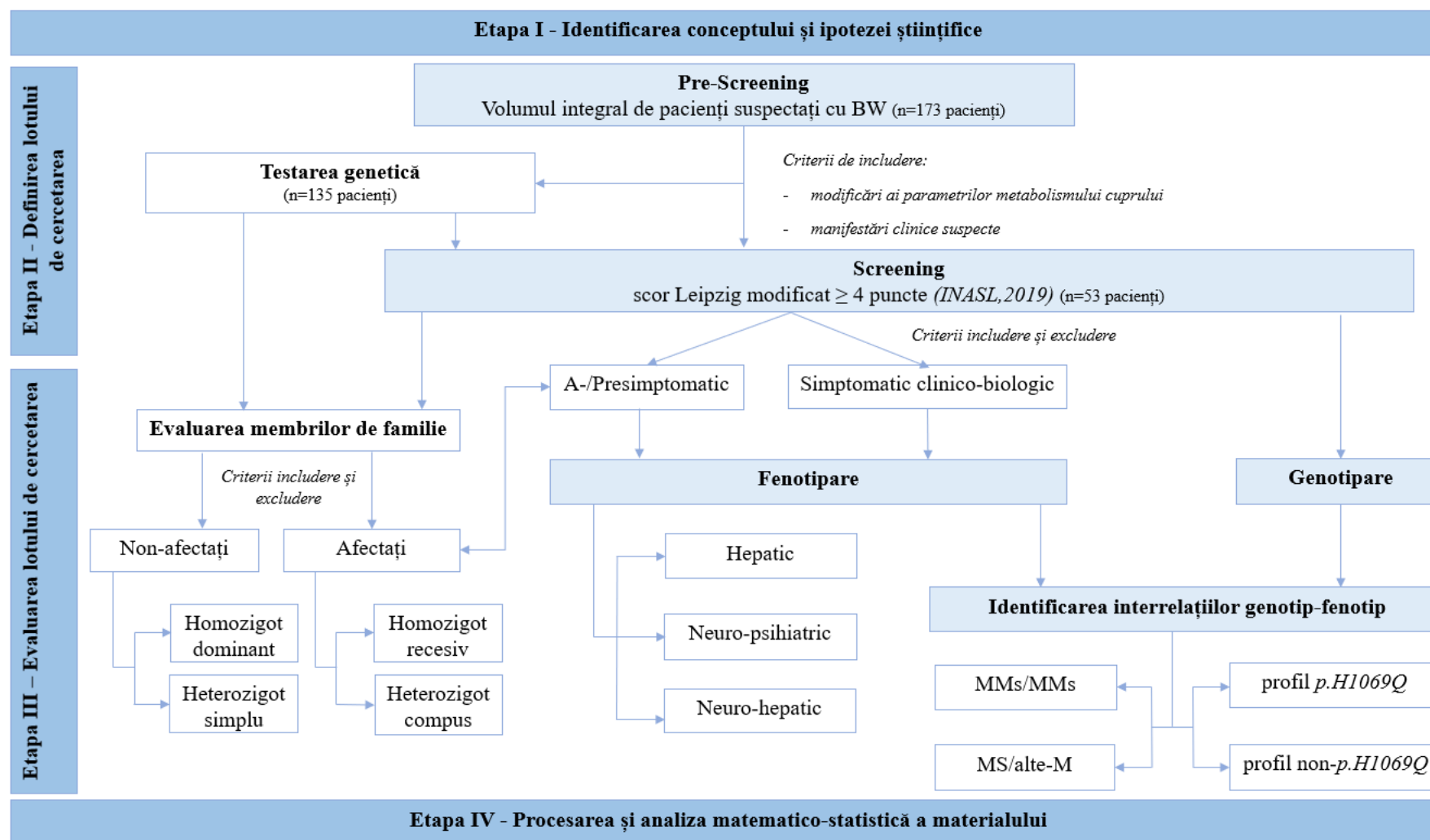


Figura 1. Design-ul studiului

Note: alte-M – alte mutații; BW – boala Wilson; INASL – Asociația Națională Indiană de Studiu a Ficatului (Indian National Association for Study of the Liver); MS – mutație severă; MMs – mutație missense; n – număr.

De asemenea, au fost evaluați clinic, biochimic, genetic și instrumental membrii de familie (părinți, frați/surori, copii) a unor pacienți cu BW, cu scopul de a diagnostica precoce membrii asimptomatici și a-i diferenția de purtătorii sănătoși. Astfel, pacienții noi identificați au inițiat terapia specifică până la dezvoltarea simptomelor.

2.2.1. Testarea genetică și metodele utilizate

Analiza molecular-genetică reprezintă un test complex de diagnostic inclus în standardul de evaluare a pacientului cu BW. Metodele de testare genetică utilizate în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară Umană, parte a Centrului Genetic de Excelență din Republica Moldova, sunt secvențierea Sanger și PCR-SSCP. Analiza molecular-genetică reprezintă un test complex de diagnostic inclus în standardul de evaluare a pacientului cu BW. Metodele de testare genetică utilizate în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară Umană, parte a Centrului Genetic de Excelență din Republica Moldova, sunt secvențierea Sanger și PCR-SSCP. Secvențierea a fost efectuată cu ajutorul kit-urilor de secvențiere cu coloranți fluorescenți Taq DyeDeoxy Terminator Cycle (Applied Biosystems) de către un analizor genetic automat ABI-Genetic 3500dx (Applied Biosystems). Datele de secvențiere au fost analizate cu software-ul SeqScape 3 folosind ca referință NG_008806.1 și adnotarea variantelor genetice identificate s-a bazat pe NM_000053.3. Testarea genetică din cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară Umană, au fost aplicate de către autor în cadrul lucrării, ca membru al echipei în comun cu medicul genetician.

Astfel, testarea genetică include examinarea celor 21 exoni conform unui algoritm prestabilit (figura 2), în funcție de frecvența mutațiilor în populația locală. În absența confirmării diagnosticului, se recomandă alte metode genetice, precum MLPA, NGS sau WES/WGS. Testarea genetică este indicată pentru confirmarea diagnosticului, screening-ul familial și în cazurile incerte când persistă suspecția de BW.

2.3. Procesarea și analiza matematico-statistică a materialului

Pentru evaluarea statistică a materialului, datele colectate de la pacienți au fost introduse într-o bază de date pentru procesare statistică și analiză digitală ulterioară în conformitate cu principiile unanim acceptate. Materialele primare ale cercetării au fost analizate cu ajutorul funcțiilor și modulelor Microsoft Office Excel 2023 și calculatoarelor statistice online din bateria testelor oferite de MedCalc <https://www.medcalc.org/calc/index.php>.

Pentru prelucrarea statistică s-a utilizat un set de operații matematice efectuate prin procedee și tehnici de lucru specifice. Tipuri de variabile utilizate: variabile nominale, variabile cantitative și variabile interval. Indicatorii statistici aplicați sunt: media aritmetică, devierea standard (DS), mediana, proporția exprimată în procente din totalul de observații aferente și intervalul de încredere 95 % (ÎÎ) pentru proporții folosite pentru variabile nominale. Testele statistice aplicate sunt: Testul t (t-test), ANOVA (Analysis of Variance), diagrama Box-plot și Chi-pătrat (Chi-square test). Pragul de semnificație statistică aplicat la valoarea p aferentă statisticilor calculate este $<0,05$. Prezentarea datelor statistice a fost efectuată prin tabele și grafice.

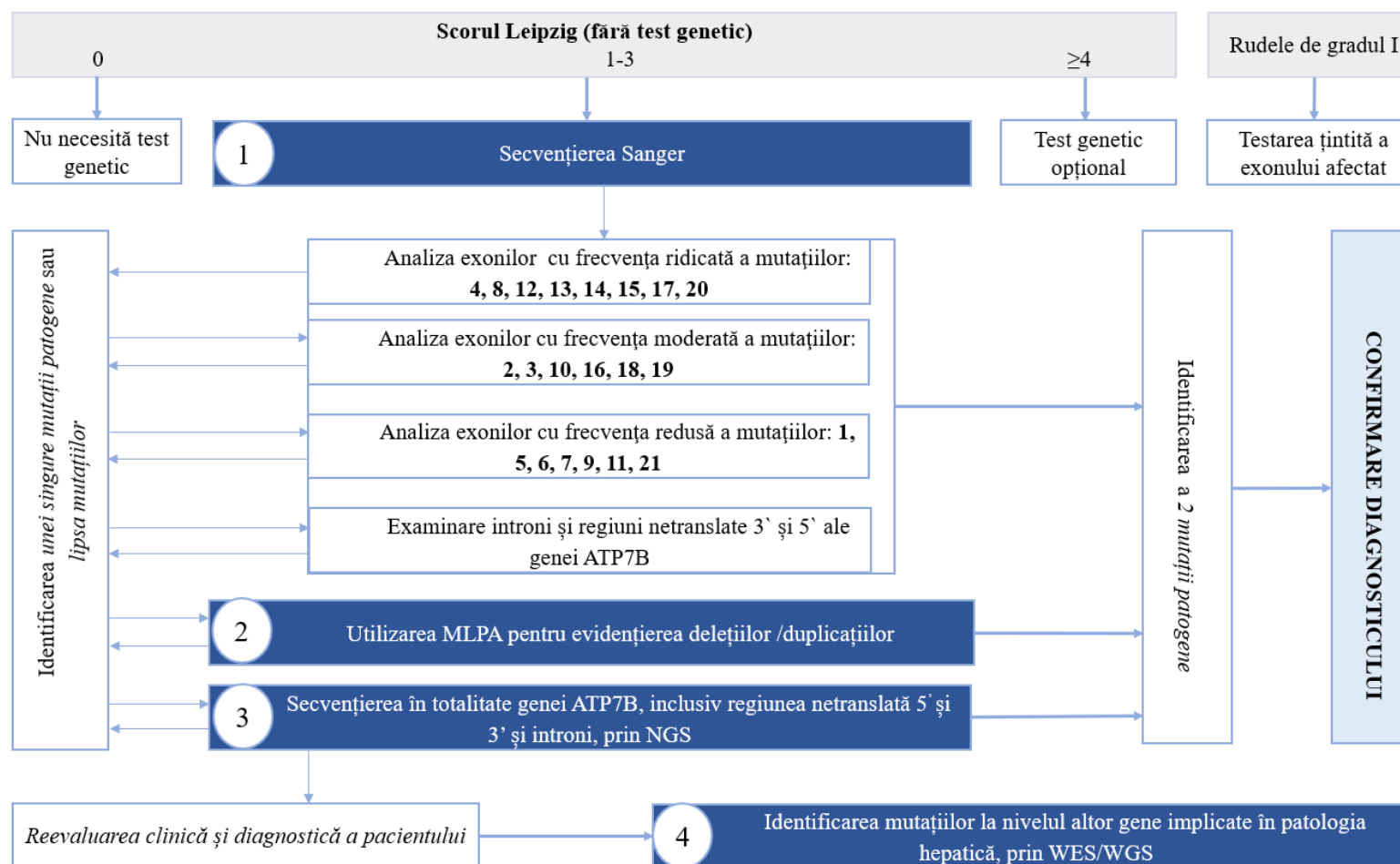


Figura 2. Algoritmul de evaluare prin testul molecular-genetic

Note: MLPA - multiplex ligation-dependent probe amplification; NGS - Next Generation Sequencing; WES/WGS - whole-exome sequencing/ whole-genome sequencing - WES/WGS. *Adaptat după:* Espinos C., Ferenci P. *Journal of Hepatology*. 2020 [14].

3. REZULTATELE CERCETĂRII

3.1. Identificarea aspectelor demografice la pacienții cu boala Wilson

3.1.1. Identificarea cohortei de studiu prin evaluarea etapei de pre-screening și screening

Etapa de pre-screening a fost implementată în acest studiu, cu scop de a identifica potențialii participanți la studiu. Pre-screening-ul este definit ca activitate de screening care are loc înainte de obținerea consimțământului pacientului. Activitatea de pre-screening a inclus revizuirea listelor de pacienți internați sau ambulatori suspectați pentru BW, revizuirea dosarelor medicale ale pacienților și discuții preliminare cu potențialii participanți la studiul nostru. Ca urmare a acestei activități, am reușit să identificăm nu doar cei 53 de pacienți cu BW, dar și am creat o cohortă a pacienților cu dereglări ale metabolismului Cu, care nu au întrunit criteriile pentru BW.

Grupul non-BW a cuprins pacienți cu dereglări ale metabolismului Cu și/ sau tablou clinic sugestiv pentru BW. Tulburarea metabolismului Cu a inclus Cu seric redus cu/fără Cu urinar sporit, cu/fără ceruloplasmina (Cp) redusă, precum și modificarea Cu liber (calculat după formula: $fCu (\mu g/dL) = Cu (\mu g/dL) - 3 \times Cp (mg/dL)$ sau $fCu (\mu mol/L) = Cu (\mu mol/L) - 53 \times Cp (g/L)$). Tabloul clinic sugestiv a inclus hepatopatiile non-virale cu/fără sindrom de citoliză sau/și coleastăzie asociată cu/fără modificări neuro-psihiatrice neîncadrate în anumite patologii neurologice.

Astfel, din cei 173 de pacienți suspecti, 120 au acumulat punctaj pentru un scor Leipzig modificat < 4 puncte, iar 53 au obținut un scor ≥ 4 puncte. Marea majoritate a pacienților sunt tineri (vârsta medie $25,68 \pm 16,10$ ani), iar 73,9% de cazuri provin din sudul și centrul țării. Doar 1/3 dintre ei prezintă manifestări sugestive clinice și biochimice pentru BW, dar practic 2/3 nu întrunesc la această etapă toate criteriile pentru a stabili BW definitivă. Astfel, aplicând recomandările ghidurilor internaționale de specialitate privind stabilirea diagnosticului de BW acești pacienți au fost supuși testării genetice. Ca urmare, au fost identificați 53 de pacienți cu BW definitivă. Această cohortă a fost analizată ulterior.

3.1.2. Caracteristica demografică a pacienților cu BW din cohorta de studiu

Lotul studiat a constituit 53 de pacienți cu BW care au întrunit criteriile de eligibilitate. Caracteristica demografică este reprezentată în tabelul 1. Intervalul de vârstă variază între 5 – 46 ani, cu vârsta < 18 ani sunt 17 pacienți (32,1%). Astfel, se observă predominarea sexului masculin comparativ cu cel feminin, raportul bărbați: femei fiind 1.5.

Toți pacienții sunt originari din Republica Moldova (figura 3). În cazul familiei multietnice, unul din părinți este de origine diferită. Nici un pacient nu a descris relații consangvine în familie și nici nu s-a asociat cu vreo comunitate izolată. 4 subiecți nu cunosc cu exactitate istoricul său familial, deoarece au crescut în orfelinat (1 caz) sau unul dintre părinți a fost înfiat (3 cazuri). 16 pacienți raportează anamnestic eredo-colateral agravat, rude de gradul I și II cu BW confirmată sau BCF/boală neurologică neprecizată.

Tabelul 1. Caracteristica demografică a lotului cercetat

Total pacienți, n=53	Valoare obținută
Raport bărbați: femei, n (%)	32 (60,4%) : 21 (39,6 %)
Media $\pm$ DS, ani	22,62 $\pm$ 9,63

Mediana (perc.25 – perc.75), ani

23 (15-30)

Conform distribuției pe vârstă (tabelul 2), se observă diferențe între debutul bolii și vârsta când a fost pacientul diagnosticat, în special în categoria de vârstă 5-9 ani și 15-19 ani. Acest fapt evidențiază lipsa stabilirii precoce a diagnosticului de BW și necesitatea unor strategii noi de a crește gradul de conștientizare a acestei maladii. De asemenea, se atestă că diagnosticarea BW maximală are loc în perioada 25-29 ani. Identificarea BW la pacienți >35 ani, denotă întârzierea diagnosticului din cauza unui debut tardiv cu manifestări.

Tabelul 2. Distribuția pe vârste în funcție de debut și stabilirea diagnosticului

Vârsta, ani	Debutul bolii		Stabilirea diagnosticului	
	n (%)	ÎÎ (95%)	n (%)	ÎÎ (95%)
5-9	9 (16,9%)	7,5 - 26,5	6 (11,3 %)	3,3 - 19,3
10-14	5 (9,4%)	2,0 - 16,8	6 (11,3 %)	3,3 - 19,3
15-19	11 (20,7%)	10,5 - 31,0	7 (13,2 %)	4,6 - 21,8
20-24	8 (15,1%)	6,0 - 24,2	9 (16,9 %)	7,5 - 26,5
25-29	11 (20,7%)	10,5 - 31,0	12 (22,6 %)	12,1 - 33,2
30-34	4 (7,5%)	0,9 - 14,2	8 (15,1 %)	6,0 - 24,2
≥35	5 (9,4%)	2,0 - 16,8	5 (9,4%)	2,0 - 16,8
Total	53 (100%)		53 (100%)	

Durata medie a perioadei de diagnostic a fost de $26,8 \pm 35,77$ luni, intervalul de diagnostic variind între 1 – 96 luni. Întârzierea stabilirii diagnosticului provoacă decompensare hepatică și leziuni neurologice ireversibile, în pofida inițierii terapiei specifice.

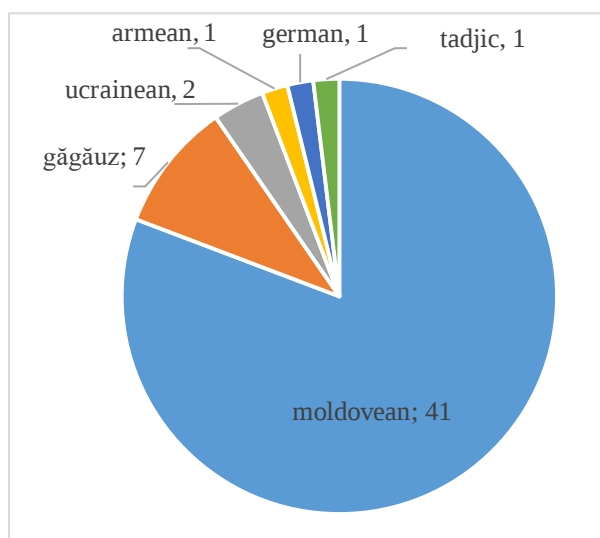


Figura 3. Diversitatea etnică a lotului de cercetare

Analiza pacienților în funcție de regiunea țării a evidențiat că cei mai mulți s-au născut/locuiesc în partea de Centru și de Sud, 41.5% și respectiv 32%; în Nordul și în Stânga Nistrului sunt raportați câte 13.2%.

Evaluând comparativ grupul pacienților cu BW și non-BW (tabelul 3), s-a observat că deși este o diferență vizibilă a valorilor medii la categoria vârstei, fiind mai mică în grupul BW, diferență statistică nu s-a determinat ($t=1,87$; $p=0.063$). În categoria caracteristica clinică se determină o diferență statistic semnificativă ($p<0.05$) pe toate nivelele, în special în grupul BW unde prezența de manifestări clinice și paraclinice sugestive pentru această tulburare este observat în 86,8%, cei cu modificări doar paraclinice sunt membri de familie asimptomatici depistați prin screening familial. În grupul non-WD, din cei 32 pacienți la care au fost depistate mutații, varianta patogenă pe 1 singură alelă se prezintă în mai mult de jumătate de cazuri (56,25%), același număr fiind înregistrat și în cazul variantelor benigne. În timp ce în grupul WD, din cei 46 pacienți la care au fost depistate mutații, variantele patogene sunt prezente în 93 % (monoalelic – 2 cazuri), iar variantele benigne în 13%. Aceste diferențe dintre grupul non-WD și WD, sunt statistic semnificative ($p<0.05$).

Tabelul 3. Caracteristica comparativă a pacienților din grupul non-BW și BW

	Non-BW	BW
Pacienți, n	120	53
Vârsta medie ±DS, ani	27,1±16,2	22,62 ± 9,63
	t=1,87; p=0.063	
Mediana (perc.25 – perc.75), ani	25 (13-35)	23 (15-30)
Caracteristica clinică, n (%)		
Doar manifestări clinice	62 (51,66%)*	0 (0,0%)*
Doar modificări paraclinice	47 (39.17%)*	7 (13,2 %)*
Manifestări clinice și paraclinice	11 (9,17%)*	46 (86,8%)*
	$\chi^2=49,67, gl=2, p<0.001$	
Testare genetică, n (%)	86 (71,60%)*	49 (92,45%)*
Mutații depistate	32 (36,78%)*	46 (86,79%)*
Tipuri de variante identificate, n (%)	32 (100%)	46 (100%)
Variante patogene	18 (56,25%)*	43 (93,48%)*
Variante potențial patogen	0 (0,00%)	2 (4,3%)
Variante cu semnificație incertă	4 (4,6%)	0 (0,00%)
Variante benigne	18 (56,25%)*	6 (13,04%)*
	$\chi^2=22,67, gl=3, p<0.001$	
Evaluări screening familial, n=24 (100%)	16 (66,67%)	8 (33,33%)

* prag semnificație statistică între 2 grupe comparate: $p<0.05$

Concluzia acestui subcapitol este că nu toți pacienții suspecți pentru BW, care prezintă manifestări clinice și modificări paraclinice sugestive sunt stabiliți cu diagnostic final de BW.

Totodată, este necesar de evidențiat faptul că până a stabili BW trebuie de exclus multitudinea de boli care pot mima clinica BW. Astfel, în cercetarea noastră noi ne-am condus după recomandările ghidurilor internaționale pentru a identifica pacienții care întrunesc toate condițiile pentru BW, în special confirmați fiind prin testarea genetică. După cum observăm, majoritatea suspectilor au trecut prin etapa de testare genetică. În studiu nu a fost utilizată ca metodă de confirmare a bolii, examenul histologic al biopsiei hepatice, având în vedere indisponibilitatea acestei investigații dar și nespecificitatea ei. Precum criteriu de confirmare a fost utilizat scorul Leipzig modificat (2019). Este o metodă neinvazivă, cu precizie în stabilirea diagnosticului final.

3.2. Definirea fenotipurilor clinice evidențiate la pacienții cu boala Wilson

În cohorta noastră este evidențiată această patologie atât la bărbați cât și la femei, cu implicarea pacienților de vârstă tânără, din copilărie (cel mai mic fiind de 5 ani, cel mai vârstnic de 46 ani). Astfel, se observă că la bărbați, predomină fenotipul neuro-psihiatric, iar la femei nu este o diferență între cel hepatic și neuro-psihiatric. De asemenea, prezentarea hepatică predomină la pacienți <20 ani, în timp ce cea neuro-psihiatrică - la pacienți ≥20 ani. Fenotipul mixt, reprezintă cel mai frecvent tip de prezentare clinică în toate categoriile (figura 4).

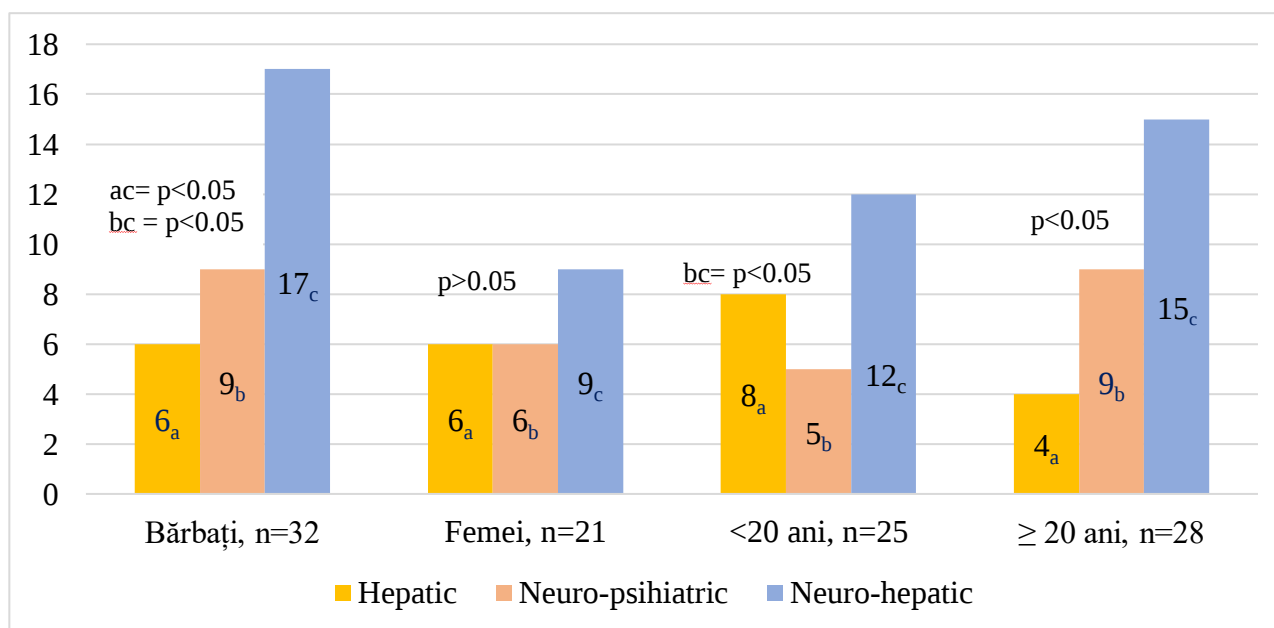


Figura 4. Distribuția fenotipului în funcție de sex și vârsta de debut a bolii (n=53)

Manifestările clinice sunt diverse, deși se observă o stratificare în manifestări predominant hepatice; sau neuro-psihiatrice sau cu prezentare mixtă. În acest subcapitol vom discuta despre aceste fenotipuri mai detaliat, iar caracteristica clinică și genetică a lotului cercetat în funcție de fenotipul de prezentare este descris în tabelul 4.

3.2.1. Descrierea fenotipului hepatic

Din datele obținute remarcăm, că pacienții din lotul de cercetare care au prezentat la debut un fenotip hepatic (n=17), pe durata bolii au asociat și manifestări neuro-psihiatrice în circa 41,1%.

Fenotipul hepatic a fost prezent la 10 pacienți. Raportul bărbați: femei este 1:1. Vârsta medie a acestora a fost $16,8 \pm 9,81$ ani, intervalul variind între 5 – 34 ani. Caracteristica clinică a acestui grup este descrisă în tabelul 4. Evident este că doar la 10% a fost stabilit IKF, și nu au fost identificate imagistic manifestări cerebrale. Radiografia biologică evidențiază predominarea citolizei moderate și colestazei minore. Parametrii anormali ai sindromului hepatopriv se identifică la 60% dintre pacienți. Practic la o jumătate dintre pacienți se identifică hepatomegalia solitară, iar la 1/3 dintre pacienți – splenomegalie. Ciroza hepatică a fost identificată la stabilirea diagnosticului la 1/3 dintre pacienți (dintre care 2 pacienți se prezentau cu ciroză decompensată). Evaluarea parametrilor metabolismului Cu stabilește următoarele particularități la pacienții cu BW fenotip hepatic: majoritatea pacienților prezintă Cp scăzută, și majorarea excreției urinare în 24 h a Cu. Pe când Cu seric, practic nu este modificat. Ceea ce ne face să concluzionăm că parametrii necesari pentru suspectarea BW, pe lângă hepato- sau splenomegalie, este necesar de evaluat Cp serică și excreția de Cu urinar. Toți pacienții au prezentat mutații genetice. Variantele patogenice *p.Phe764=* și *p.Ala1135GlnfsX13*, au fost raportate doar în cazul persoanelor cu leziuni hepatice.

3.2.2. Analiza fenotipului neuro-psihiatric

Fenotipul neuro-psihiatric a fost prezent la 12 pacienți. Raportul bărbați: femei este 1.4:1. Vârsta medie a acestora a fost $26,5 \pm 9,92$ ani, intervalul variind între 7 – 45 ani. Caracteristica clinică a acestui grup este descrisă în tabelul 4. Cele mai frecvente sindroame clinice întâlnite sunt tulburarea de mișcare hiperkinetică și sindromul pseudo-bulbar, 66,7% și respectiv 58,3%. Se observă că la 25% pacienți a fost evidențiat IKF și 66,7% au fost identificate imagistic manifestări cerebrale. La nici un pacient nu s-a observat modificări biologice. În 58,3%, pacienții au descris afectarea concentrației, iar 50% dintre cazuri prezentau modificări de dispoziție. Evaluarea parametrilor metabolismului Cu stabilește: majoritatea pacienților prezintă Cp scăzută, și majorarea excreției urinare în 24h a Cu. În 25% la pacienți nu au fost identificate mutații. Variantele patogenice *p.T991T*, *p.E541K* și *p.Q544X*, au fost raportate doar în cazul persoanelor cu leziuni neurologice.

Pacientul cu fenotip neurologic se prezintă cu varietate clinică extraordinară, fapt care face dificil stabilirea diagnosticului precoce și evidențierea unui prototip clinic clasic (figura 5). Cele mai frecvente acuze declarate sunt afectarea mișcărilor fine, tremorul, dizartria și coreoatetoza.

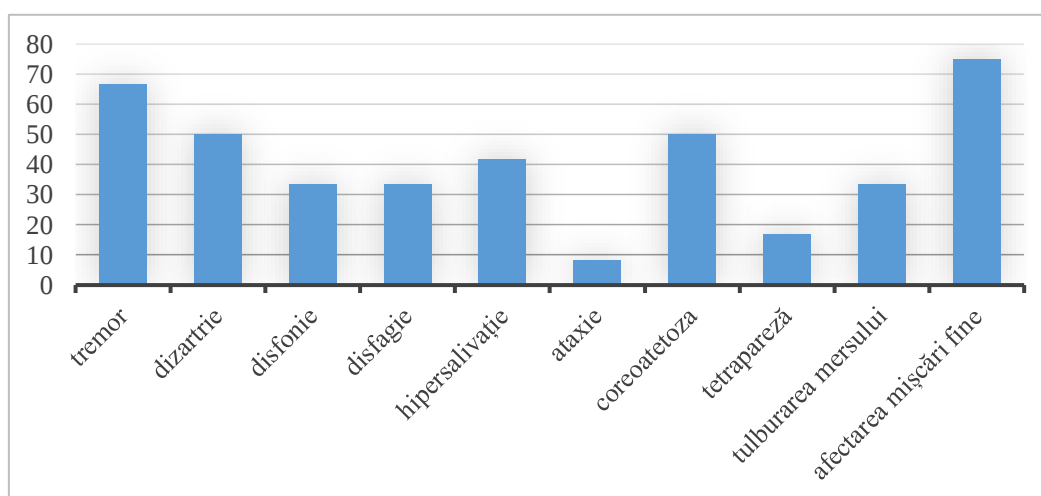


Figura 5. Diversitatea simptomatică a fenotipului neurologic (%)

3.2.3. Evaluarea fenotipului neuro-hepatic

Fenotipul mixt (neuro-hepatic) a fost descris la 24 pacienți. Raportul bărbați: femei este 2:1. Vârsta medie a acestora a fost $24,13 \pm 8,12$ ani, intervalul variind între 3 – 35 ani. Caracteristica clinică a acestui grup este descrisă în tabelul 4. Hepatomegalie și splenomegalie se identifică la peste 50% cazuri. Ciroza hepatică a fost confirmată la stabilirea diagnosticului la 1/3 dintre pacienți (dintre care 5 pacienți se prezentau cu ciroză decompensată). La 2/3 pacienți s-a observat tulburare de mișcare hiperkinetică. La 62,5% pacienți a fost evidențiat IKF și 66,7% au fost identificate imagistic leziuni cerebrale. Cele mai comune manifestări psihiatrice au fost afectarea concentrației (50%) și tulburarea somnului (45,8%). Din modificările biologice, se observă trombocitopenia la $\frac{1}{4}$ pacienți și sindrom citolitic la peste $\frac{1}{2}$ cazuri. Evaluarea parametrilor metabolismului cuprului stabilește majoritatea pacienților prezintă Cp scăzută, și majorarea excreției urinare în 24h a Cu. În cazul unui pacient nu a fost identificat nici o mutație. Variantele patogenice *c.2532delA*, *p.G1341V*, *p.Asn728Ile* și *p.A1227T* au fost raportate doar în cazul persoanelor fenotip neuro-hepatic.

Tabelul 4. Caracteristica clinică a fenotipurilor

Parametri clinici	Hepatic	Neuro- psihiatric	Neuro-hepatic
Bărbați/femei	1/1	1.4/1	2/1
Vârsta medie la debut $\pm$ DS, ani	$15,2 \pm 10,01^*$	$24,25 \pm 10,89^*$	$20,64 \pm 7,98$
	$F=2,63; p=0.08$		
Vârsta medie la stabilirea diagnosticului $\pm$ DS, ani	$16,8 \pm 9,81^{*a,b}$	$26,5 \pm 9,92^*_a$	$24,13 \pm 8,12^*_b$
mediana (perc.25 – perc.75), ani	15,5 (9,75 - 20)	29,5 (18,75 - 31,25)	25,5 (19,5 - 27,25)
	$F=3,48; p=0.04$		
Durata stabilirii diagnosticului $\pm$ DS, luni	$20,5 \pm 30,72$	$25,17 \pm 30,96$	$30,91 \pm 41,36$
	$F=0,305; p=0.74$		
Modificări ale metabolismului Cu, medie			
Cp serică $\pm$ DS, (20-60 mg/dL)	$10,46 \pm 3,14$	$14,33 \pm 9,96$	$10,61 \pm 7,08$
	$F=1,29 p=0.28$		
Cu urinar în 24h $\pm$ DS, (10-60 μ g/24h)	$258,71 \pm 176,76^*$	$120,52 \pm 69,85^*$	$213,03 \pm 176,43$
	$F=1,68 p=0.11$		

* prag semnificație statistică între 2 grupe comparate: $p < 0.05$

Astfel, s-a observat că fenotipul hepatic se caracterizează printr-un debut precoce al bolii, un diagnostic timpuriu și o cuprurie statistic semnificativ mai mare comparativ cu celelalte grupuri. Fenotipul neurologic se prezintă cu un debut mai tardiv al bolii, o durată de diagnostic aproximativ

Tabelul 5. Definirea variantelor conform parametrilor genetici și fenotip

Exon	Modificare nucleotide	Modificare aminoacizi	Tip variant	Regiune proteică	Patogenitate	Statut/ n pacient	Fenotip
3		p.V456L			benignă	het com / n=2	H
4		p.S406A		MBD4	benignă	het com / n=1	H
	c.1624G>C	p.E541K	missense		patogenă	hom rec/ n=1	N
	c.1630C>T	p.Q544X	nonsense	MBD5	patogenă	het com / n=1	N
8	c.2183A>T	p.Asn728Ile	missense	TM3	probabil patogenă	het com / n=1	N-H
	c.2292C>T	p.Phe764=	silent/ sinonimă		patogenă/ probabil?	het com / n=3	H
	c.2304dupC	p.Met769Hisfs*26	frameshift	TM4	patogenă	het com / n=5	H, N-H
10	c.2532delA	p.Val845SerfsTer28	frameshift	Domeniu A	patogenă	het com / n=1	N-H
		p.K832R			benignă	het com / n=1	H
12	c.2495 A>G	p.R952K			benignă	hom rec / n=1 het com / n=2	H, N-H
13	c.2972C>T	p.T991T	missense	TM6/ fosforilare	patogenă	hom rec / n=1	N
14	c.3207C>A	p.H1069Q	missense	ATP loop SEPHL	patogenă	hom rec / n=16 het com / n=18	N, H, N-H
15	c.3402delC	p.Ala1135GlnfsX13	nonsense	Domeniu N	patogenă	hom rec / n=1	H
16	c.3419 T > C	p.V1140A	missense	ATP loop	benignă	het com / n=1	N-H
17		p.H1207R	missense	ATP loop	benignă	het com / n=1	H
	c.3679G>A	p.A1227T	missense	Domeniu P	probabil patogenă	het com / n=1	H
20	c.4022G>A	p.G1341D	missense	TM7	patogenă	hom rec / n=2 het com / n=9	N, H, N-H
	c.4022G> T	p.G1341V	missense	TM7/ TM8	probabil patogenă	het com / n=2	H
21		p.X1466R			benignă	het com / n=1	H

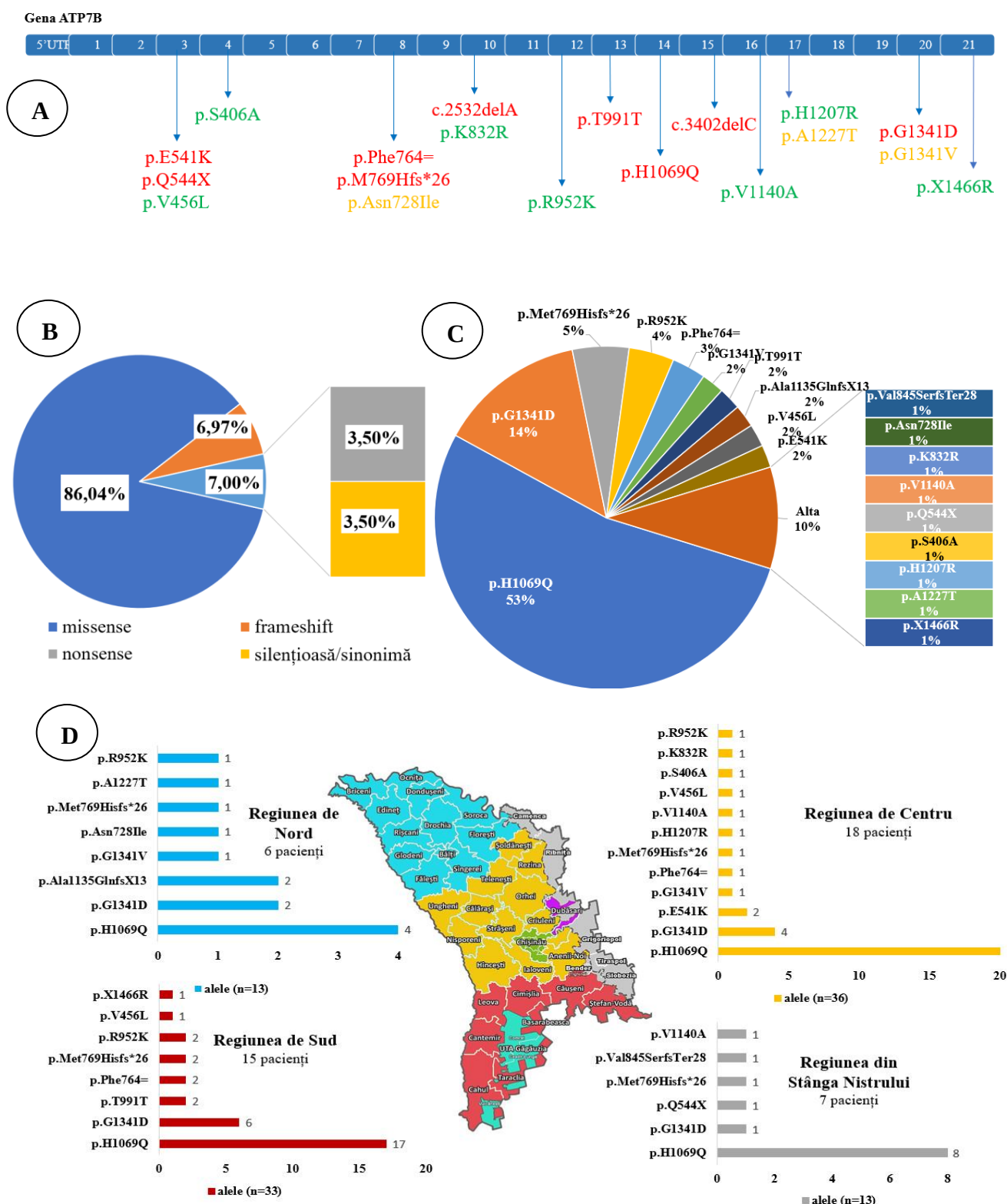


Figura 6. Caracteristicile variantelor genetice ATP7B identificate în lotul studiat

A. Repartizarea variantelor ATP7B în relație cu exonul implicat (*nota*: benigne – culoarea verde; probabil patogene – culoarea oranj; patogene – culoarea roșie); **B.** Tipurile de variante (% din totalul de mutații); **C.** Frecvența alelelor identificate în studiu (% din totalul de mutații); **D.** Distribuția alelelor și a pacienților testați în funcție de regiunea țării (n).

25 luni, și un nivel de Cu urinar statistic semnificativ mai redus comparativ cu fenotipul hepatic. Fenotipul mixt se evidențiază printr-o durată a stabilirii diagnosticului cea mai lungă. Deși, valorile Cp serice sunt diferite, semnificație statistică nu s-a observat în nici un grup.

3.3. Caracteristica mutațiilor genetice determinate la pacienții cu boala Wilson

Într-o perioadă scurtă de timp, în diferite țări dintr-un număr mare de populații la pacienții cu BW, au fost identificate peste 900 de variante patogene diferite ATP7B și s-a găsit o diferențiere fenotipică neobișnuită în combinațiile lor. S-a dovedit că frecvența de detectare și spectrul variantelor patogene ale genei ATP7B diferă semnificativ în diferite țări. În același timp, nivelul de prevalență a variantelor patogene în gena ATP7B depinde nu numai de locația geografică a teritoriului de reședință al pacienților, ci și de etnia pacientului, iar diferențele de indicatori pot fi urmărite și la reprezentanții ai aceleiași populații. Variantele patogene ATP7B pot fi împărțite în următoarele grupe: *missense*, *non-sense*, *frameshift* și *splicing*. Ne-am propus să caracterizăm profilul genetic al pacienților din grupa de cercetare, astfel să obținem o radiografie genetică a BW din regiunea noastră.

3.3.1. Caracteristica variantelor identificate în lotul de cercetare

Din totalul pacienților din lotul de cercetare (53 pacienți cu BW), 49 au fost testați genetic. Metoda PCR-SSCP a fost aplicată la 15 pacienți, secvențierea Sanger – la 33 pacienți, iar metoda NGS – la 1 pacient (România). La 46 pacienți au fost identificate mutații, dintre care 1 singură mutație – 5 pacienți, 2 mutații – 37 pacienți și 3-6 mutații – 4 pacienți. Cele mai multe variante sunt de tip heterozigot compus (n=25 pacienți).

Lotul cercetat se caracterizează printr-o heterogenitate mutațională înaltă, fiind identificate 19 variante diferite care au fost definite genetic și fenotipic în tabelul 5 [15-19]. Clasificarea variantelor s-a efectuat în conformitate cu recomandările ACMG [20]. Varianta *p.Phe764=* este considerată probabil patogenă însă în caz de homozigocitate sau asociere cu o altă variantă patogenă, aceasta determină apariția BW.

Caracteristicile variantelor genetice ATP7B identificate în lotul studiat sunt redată în figura 6. Astfel, se observă că cele mai multe mutații sunt identificate la nivelul exonului 8. Varianta de tip substituție (*missense*) este întâlnită în 86.04%, iar cea mai frecventă alelă (53%) se află la nivelul exonului 14 – varianta *p.H1069Q*, prezentă la 34 cazuri (64.1%) din pacienții testați. În 16 cazuri (47.05 %), *p.H1069Q* se regăsește sub formă de homozigot recesiv, iar la ceilalți 18 pacienți (52.94%) este de tip heterozigot compus, dintre care în 12 cazuri se cunoaște a doua variantă (*p.G1341D*, *p.Q544X*, *p.V1140A*, *p.Asn728Ile*). *p.G1341D* este a doua ca frecvență tip de mutație (15%) și se regăsește atât la homozigoți recesivi (2/11 pacienți), cât și în asociere cu alte variante (9/11 pacienți) – *p.H1069Q* (n=7), *c.2532delA* (n=1), *p.V456L* și *p.X1466R* (n=1, același pacient).

3.3.2. Identificarea relației genotip-fenotip la pacienții cu boala Wilson

BW se caracterizează prin diversitate mutațională, cu peste 900 de mutații identificate până în prezent și multe dintre ele sunt specifice anumitei populații. Stabilirea corelațiilor genotip-fenotip este importantă pentru gestionarea adecvată a pacientului, pentru inițierea timpurie a tratamentului la indivizii asimptomatici pentru a preveni anumite complicații și pentru prezicerea eficacității tratamentului. În plus, îmbunătățește înțelegerea patogenezei moleculare a bolii. Asociațiile raportate între o anumită mutație și un fenotip specific în BW rămân neconcludente din cauza mai multor factori: numărul mic de pacienți, numărul mare de mutații și faptul că majoritatea pacienților sunt heterozigoți compuși, ceea ce face dificilă atribuirea unui fenotip clinic.

În studiul nostru majoritatea pacienților cu BW sunt heterozigoți compuși (25 pacienți), ceea ce complică stabilirea corelațiilor genotip-fenotip. Alții 21 pacienți sunt homozigoți recesivi.

Astfel, ne-am propus să evaluăm efectul mutației *p.H1069Q* și al altor mutații *non-p.H1069Q* de la nivelul genei ATP7B asupra expresiei fenotipice în BW (tabelul 6). Profilul *p.H1069Q* au inclus 34 de pacienți, dintre care 18 homozigoți și 16 heterozigoți. Fenotipul neurologic a fost asociat cu profilul *p.H1069Q*, fenotipul hepatic cu profilul *non-p.H1069Q*, în timp ce fenotipul mixt este caracteristic ambelor grupuri.

Tabelul 6. Diferențierea clinico-biologică raportată la profilul *p.H1069Q* și *non-p.H1069Q*

	<i>p.H1069Q</i>	<i>Non-p.H1069Q</i>
Pacienți, n	34	12
Bărbați/femei, n	18/16	8/4
Vârsta medie la debut ± DS, ani	19,15 ± 8,46	20,5 ± 9,85
	<i>t=0,46; p=0.65</i>	
Vârsta medie la stabilirea diagnosticului ± DS, ani	20,03 ± 8,71	24,67 ± 9,31
mediana (perc.25 – perc.75), ani	20,5 (14,25-26,75)	27,5 (16,25-31,75)
	<i>t=1,56; p=0.13</i>	
Durata diagnostic ± DS, luni	16,65 ± 20,52*	39,91 ± 39,71*
Debutul bolii <18 ani, %	38,3%	33,3%
Fenotip, n (%)	hepatic	8 (23,5%)
	neurologic	4 (33,3%)
	mixt	9 (26,5%)
		2 (16,7%)
		17 (50%)
		6 (50%)
	<i>χ²=3,66, gl=2, p=0,16</i>	
IKF, %	38,3%	13,3%
Modificări ale metabolismului cuprului, medie	11,73 ± 7,46	9,85 ± 7,48
Cp serică (20-60 mg/dL)	<i>t=2,60; p=0,46</i>	
Cu urinar în 24h (10-60 µg/24h)	224,64 ± 212,77	216,21 ± 133,78
	<i>t=0,75; p=0,89</i>	

* prag semnificație statistică între 2 grupe comparate: $p<0.05$

O particularitate interesantă s-a înregistrat în profilul *non-pH1069Q*. Acești pacienți au fost stabiliți cu diagnosticul de BW la vârsta de 24,67 ani, iar întârzierea diagnosticului este de circa 39,91 luni, fenotipul predominant este fenotipul mixt urmat de cel hepatic. Acest profil, care a inclus 12

pacienți, înregistrează cea mai lungă perioadă până la stabilirea diagnosticului clinic, fiind și cei mai în vârstă pacienți vs profilul *p.H1069Q*. De asemenea, profilul *p.H1069Q* corelează cu prezența IKF aproximativ la 1/3 din pacienți, cu nivel mai înalt de cuprurie, un sindrom biologic prevalent pentru pancitopenie și colestază. În timp ce, celălalt profil se prezintă cu nivel mai redus de Cp serică, un sindrom biologic prevalent pentru trombocitopenie, citoliză și sindrom hepatopriv.

Profilul *non-p.H1069Q* se caracterizează printr-o diversitate genetică înaltă, fiind înregistrate și mutații unice rare, precum varianta *p.Phe764=* (figura 7). Moștenirea variantei patogeneice în acest grup este atât de tip homozigot recesiv, cât și heterozigot compus (tabelul 7).

Tabelul 7. Caracteristica genetică a profilului *non-p.H1069Q*

Homozigot recesiv (n=5)	Heterozigot compus (n=7)
p.E541K	p.A1227T
p.T991T	p.G1341D
p.Ala1135GlnfsX13	p.G1341V
p.G1341D	p.Phe764=
	p.Met769Hisfs*26
	p.Val845SerfsTer28
	p.V456L
	p.H1207R

Analizând, profilul *p.H1069Q* în funcție de statutul moștenirii (tabelul 8), s-a observat că subgrupul homozigot recesiv se asociază cu un debut mai tardiv, o perioadă de diagnostic mai scurtă și prezentare clinică predominant mixtă și neuro-psihiatrică comparativ cu subgrupul heterozigot care se prezintă cu un debut mai precoce, stabilirea diagnosticului întârziată și un fenotip predominat mixt și hepatic. În ambele grupuri prevalează bărbații.

Tabelul 8. Tabloul clinico-biologic a profilului *p.H1069Q* în funcție de statutul moștenirii

	Homozigot recesiv	Heterozigot compus
Pacienți, n	16	18
Bărbați/femei, n	8/8	8/4
Vârsta medie la debut ± DS, ani	22,75 ± 8,52*	15,77 ± 7,05*
Vârsta medie la stabilirea diagnosticului ± DS, ani	24,0 ± 8,21*	16,5 ± 7,73*
mediana (perc.25 – perc.75), ani	26,0 (18,5 - 30,5)	18,0 (9,75 – 21,0)
Durata diagnostic ± DS, luni	19,38 ± 23,95	14,43 ± 17,77

		Homozigot recesiv	Heterozigot compus
		$t=0,68, p=0.5$	
Debutul bolii <18 ani, %		31,25%	44,5%
Fenotip, n (%)	hepatic	2 (12,5%)	6 (33,3%)
	neurologic	4 (25%)	4 (22,2%)
	mixt	10 (62,5%)	8 (44,5%)
		$\chi^2=2.11, gl=2, p=0.35$	
IKF, %		50%	27,8%
		$p=0.19$	
Modificări ale metabolismului cuprului, medie			
Cp serică (20-60 mg/dL)		11,91 ± 6,86	15,59 ± 8,14
		$t=1,42; p=0.17$	
Cu urinar în 24h (10-60 µg/24h)		190,95 ± 190,97	247,96 ± 231,25
		$t=0,778; p=0.44$	

* prag semnificație statistică între 2 grupe comparate: $p<0.05$

De asemenea, primul subgrupul corelează cu prezența IKF la 1/2 din pacienți, cu un nivel mai redus de Cp serică și un sindrom biologic prevalent pentru trombocitopenie. În timp ce, subgrupul al doilea se prezintă cu un nivel mai înalt de cuprurie, sindrom biologic prevalent pentru trombocitopenie, citoliză și colestază. Din punct de vedere genetic, heterozigoții compuși se asociază cu diferite variante: *p.G1341D*, *p.Met769Hisfs*26*, *p.Phe764=*, *p.V1140A*, *p.Asn728Ile*, *p.Q544X* și *p.G1341V*. Aceste diferențe clinico-biologice accentuează implicarea factorilor epigenetici și de mediu înconjurător, precum și modul cum interacționează sau se influențează mutațiile în mod reciproc.

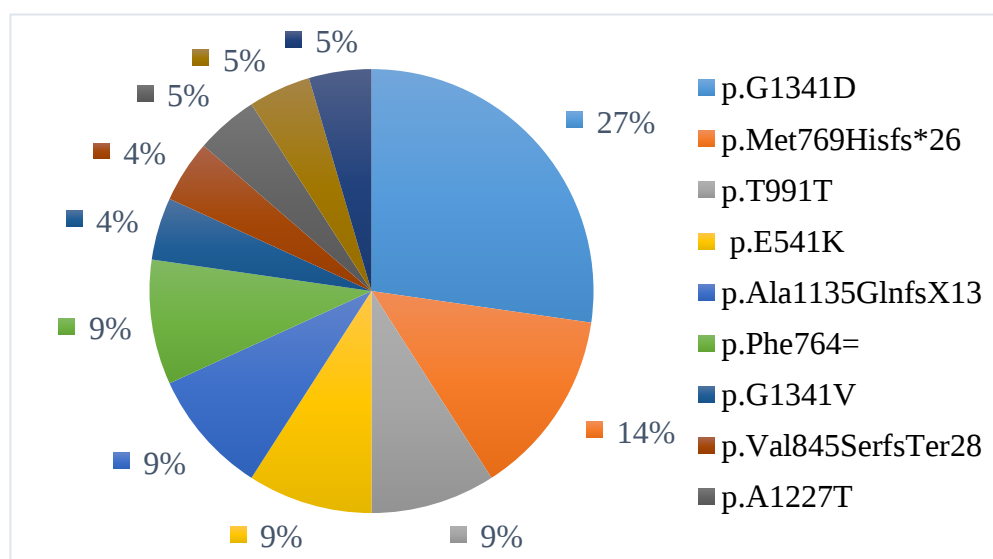


Figura 7. Diversitatea genetică a profilului non-*p.H1069Q*

O altă caracteristică este predominarea variantei mutaționale *missense*, urmată de *frameshift*, *nonsense* și *silent/sinonimă*. Astfel, am repartizat pacienții în 2 grupuri, în funcție de tipul variantei identificate și asocierile acestora, fiind excluși pacienții, la care nu a fost depistată mutația a 2-a (tabelul 9). Primul grup (MMs/MMs) include doar mutații de tip *missense*. Mutații severe (MS) include variantele *nonsense* și *frameshift*, asociate în literatură cu un fenotip clinic sever, ca rezultat al sintezei unei proteine afuncționale. Grupul 2 (MS/alte-M) cuprinde MS în asociere cu alte tipuri de mutații (alte-M) – *missense*, *silent/sinonime*, *nonsense* și *frameshift*.

Tabelul 9. Caracteristica clinico-biologică raportată la tipul variantei genetice

		MMs/MMs	MS/alte-M
Pacienți, n		32	7
Bărbați/femei, n		17/15	5/2
Vârsta medie la debut ± DS, ani		19,74 ± 8,81	20,29 ± 10,55
		$t=0,15; p=0.89$	
Vârsta medie la stabilirea diagnosticului ± DS, ani		21,03 ± 9.02*	23,43 ± 10,61*
		21,0 (13,5-28)	26,0 (16,0-32,5)
	mediana (perc.25 – perc.75), ani		
Durata diagnostic ± DS, luni		22,85 ± 24,72	16,28 ± 30,07
		$t=0,61; p=0.54$	
Debutul bolii <18 ani, n (%)		11 (43,75%)	3 (42,86%)
		$p=0.96$	
Fenotip, n (%)	hepatic	5 (15,63%)	3 (42,86%)
	neurologic	8 (25,0%)	1 (14,29%)
	mixt	19 (59,37%)	3 (42,86%)
		$\chi^2=2,64, gl=2, p=0.27$	
IKF, n (%)		13 (40,63%)	2 (28,57%)
		$p=0.96$	
Modificări ale metabolismului cuprului, medie			
	Cp serică (20-60 mg/dL)	10,27 ± 5,92	9,78 ± 6,69
		$t=0,19; p=0,84$	
	Cu urinar în 24h (10-60 µg/24h)	233,02 ± 203,6	170,19 ± 234,72
		$t=0,72; p=0,48$	

* prag semnificație statistică între 2 grupe comparate: $p<0.05$

Diferențe importante au fost stabilite în funcție de tipul mutației stabilit în grupul de cercetare. Astfel, evaluând comparativ grupul MMs/MMs și MS/alte-M, s-a observat diferență statistică între vârsta medie la stabilirea diagnosticului ($p < 0.05$), în timp ce durata de diagnostic înregistrează o diferență vizibilă a valorilor medii diferență statistică în acest caz nu s-a determinat ($t = 0,61$; $p = 0,54$).

Grupul MMs/MMs se caracterizează printr-un debut mai precoce a simptomelor ($19,74 \pm 8,81$), predominarea fenotipului mixt și neurologic, prezența IKF în 40% din pacienți, valori medii mai înalte ai Cp serice ($10,27 \pm 5,92$) și a Cu urinar în 24 h ($233,02 \pm 203,6$). Grupul MS/alte-M se caracterizează printr-un debut mai târziu a simptomelor ($20,29 \pm 10,55$), predominarea fenotipului mixt și hepatic, prezența IKF în 1/3 din pacienți, valori medii mai reduse ai Cp serice ($9,78 \pm 6,69$) și a Cu urinar în 24 h ($170,19 \pm 234,72$). În ambele grupuri prevalează bărbații și un debut până la 18 ani în peste 40 % din pacienți.

3.4. Rolul screening-ului familial la pacienții cu boala Wilson

3.4.1. Descrierea rezultatelor obținute la screening-ul familial al pacienților cu boala Wilson

Membrii de familie a unui pacient nou diagnosticat cu BW trebuie să fie evaluați clinic și paraclinic, deoarece fiind o maladie ereditară aceasta poate evolua asimptomatic sau cu un tablou clinic nespecific la celelalte rude (frați, descendenți, părinți). Astfel, 13 familii au fost examinate în vederea identificării membrilor a-/presimptomatic. Majoritatea probanzilor sunt originari din sudul țării (7/12 pacienți), restul provin din nordul (3) și centrul țării (3). În 10/12 familii au fost testate rudele de gradul I - părinții și frații, în celelalte 3 cazuri au fost evaluați doar descendenții acestora. În 8 cazuri, ambii părinți sunt purtători sănătoși; în celelalte 3 familii, un părinte este purtător sănătos, dar celălalt părinte nu a fost testat. 4 frați au fost identificați ca purtători sănătoși, alții 2 raportați sănătoși (nu a fost detectată nici o mutație). Cele mai frecvente variante au fost *p.H1069Q* și *p.G1341D*, atât ca homozigot recesiv, cât și ca heterozigot (simplu și compus), de asemenea a fost detectată o mutație rară - *c.2292C>T*. Această variantă determină un splice-ing alternativ, care se prevede că va duce la o ștergere în cadru a 78 de reziduuri ale proteinei ATP7B. Concluzia cercetătorilor din Marea Britanie este că această mutație este patogenă și poate dezvolta boala [21]. Pacientul care prezintă această mutație, este cu varianta missense, și prezintă fenotipul hepatic evident, este dintr-o familie cu sora stabilită cu BW în perioada de adult. Pacientul are 2 copii, ambii se prezintă cu varianta mutațională *missense p.H1069Q*, în stare heterozigotă compusă, fenotip hepatic.

Ca rezultat al evaluării în 6 din 13 familii implicate în studiu, au fost identificați 8 membri noi cu BW (6 bărbați și 2 femeie). Vârsta medie a fost de $16,25 \pm 9,7$ ani (interval 5-34 ani). În 5 cazuri au fost rude de gradul I (frați), iar în 3 cazuri - rude de gradul II (veri, nepoți). 7 pacienți au fost asimptomatici, iar 1 a avut simptome neurologice, dar nu au fost inclus în nici o nosologie până la momentul dat. În cazul unei singure familii s-a identificat o transmitere paradoxală a bolii - moștenirea pseudo-dominantă. În 4 cazuri în care ambii părinți sunt purtători sănătoși, ambii copii au fost diagnosticați cu BW, un membru fiind diagnosticat ca rezultat al screening-ului familial. În 6 cazuri, BW a fost asociată cu afectarea ficatului, iar în 2 cazuri s-a raportat un fenotip mixt. La 2 pacienți asimptomatici nu s-au observat modificări ale metabolismului Cu, fiind evidențiată doar citoliza cu hepatosplenomegalie sau doar hepatomegalie, însă după testul de stimulare cu D-penicilamina, Cu urinar în 24 de ore a crescut de peste 5 ori a limitei superioare ale normei. În ambele cazuri, testul genetic a confirmat prezența a 2 mutații patogene. IKF a fost observat la 2 pacienți, ce

prezentau și manifestări neurologice. Toți pacienții noi diagnosticați cu BW au inițiat terapia specifică.

3.4.2. Crearea algoritmului de diagnostic în Boala Wilson

Deficitul de studii clinice randomizate și de înaltă calitate este o provocare comună pentru bolile rare, inclusiv și pentru BW. Prin urmare, recomandările în BW s-au bazat mai puțin pe datele din studiile randomizate, mai mult pe serii de cazuri și pe consensul experților pentru a completa datele limitate ale studiilor disponibile. În plus, variabilitatea fenotipică ale BW, implicarea multisistemică, face mai complicată elaborarea unui ghid cuprinzător pentru diagnostic și tratament. Actualmente sunt cunoscute 5 ghiduri internaționale, axate în mare parte pe prezentarea hepatică în BW. Deși acestea sunt cuprinzătoare în ceea ce privește problemele hepatice, ele sunt limitate în ceea ce privește îngrijirea consensuală pentru manifestările neurologice și psihiatrice ale BW și în ceea ce privește anumite circumstanțe speciale. În țara noastră a fost elaborat în 2016 Protocolul Clinic Național: Boala Wilson la copil (<https://msmps.gov.md>). Este unicul document cu recomandări de conduită în cazul unui copil suspect pentru BW. Revizuirea acestui protocol este necesară, având în vedere recomandările depășite și necesitatea reactualizării algoritmului de diagnostic și tratament.

Considerând rezultatele obținute în cohorta de pacienți cu BW ne-am propus să creăm algoritmul de diagnostic având la bază atât recomandările actuale ale Societăților de specialitate internaționale, cât și cele regionale. Elaborarea algoritmului de diagnostic a întrunit elementele cheie ale cercetării noastre, și anume evaluarea suspecților pentru BW prin prisma scorului Leipzig modificat în 2019 (din punctul nostru de vedere, este cea mai reușită variantă, pentru a fi implementat în țările unde nu sunt metode de cuantificare a Cu în țesutul hepatic); stratificând pacienții în funcție de punctajul obținut; astfel cei care au avut un 1 punct sau mai puțin vor fi redirecționați pentru evaluarea altui diagnostic, cei cu punctajul 2- 3 necesită primesc o calificare de probabil și vor urma testarea genetică (după metoda Sanger), cei cu punctaj ≤ 4 vor obține un diagnostic definitiv de BW, și vor fi supuși terapiei individualizate, iar opțional li se va recomanda testarea genetică.

Algoritmul propus de noi selectează conduita individualizată pacientului bazată pe fenotipare clinică, dar și genotipică (figura 8). O altă perspectivă prezintă și algoritmul de screening familial în BW (figura 9), ce reprezintă o componentă obligatorie conform recomandărilor actuale.

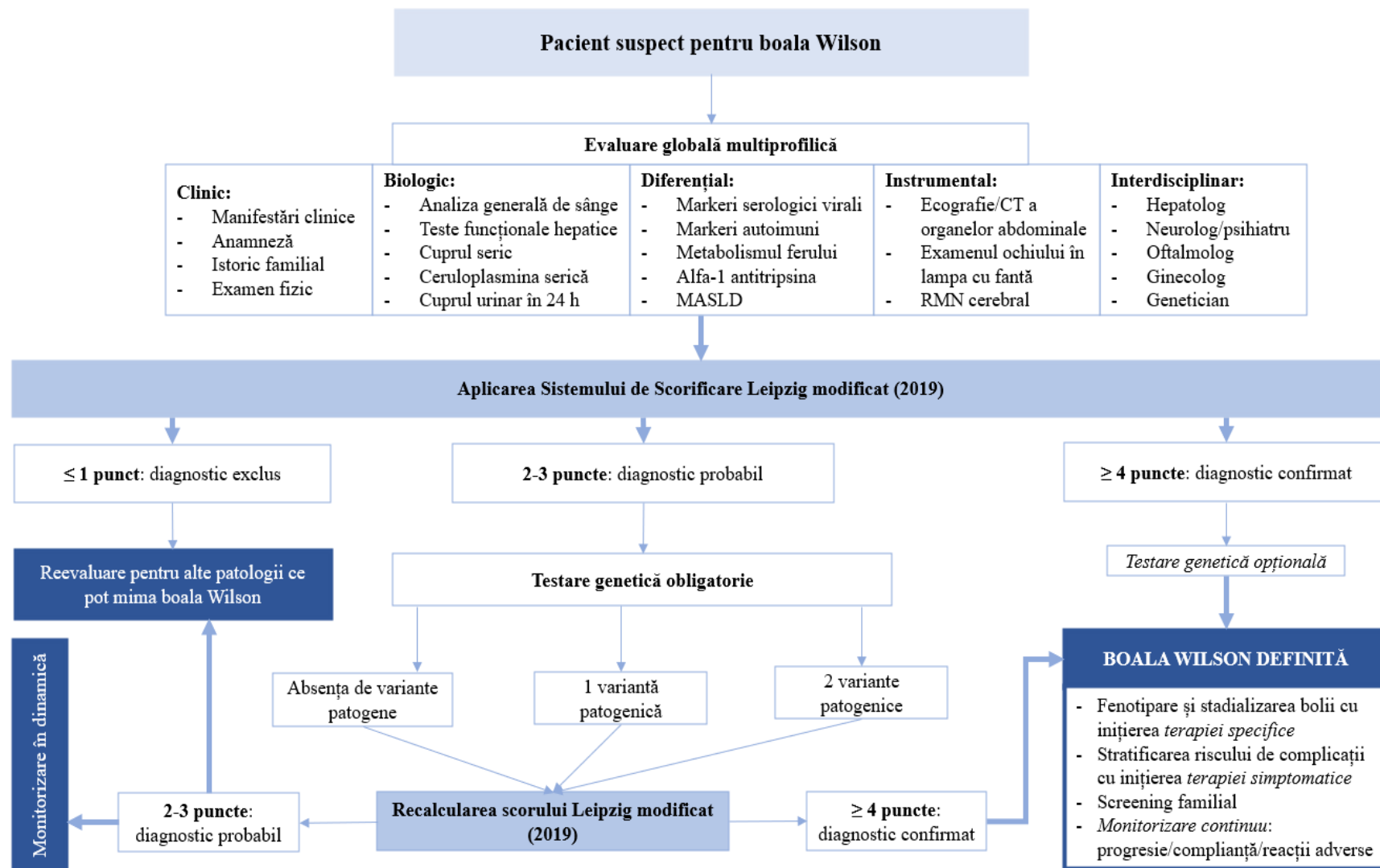


Figura 8. Algoritm de stabilire a diagnosticului de boala Wilson

Note: CT – tomografie computerizată; MASLD – boala ficatului steatozic asociat cu disfuncții metabolice; RMN – rezonanță magnetică nucleară.

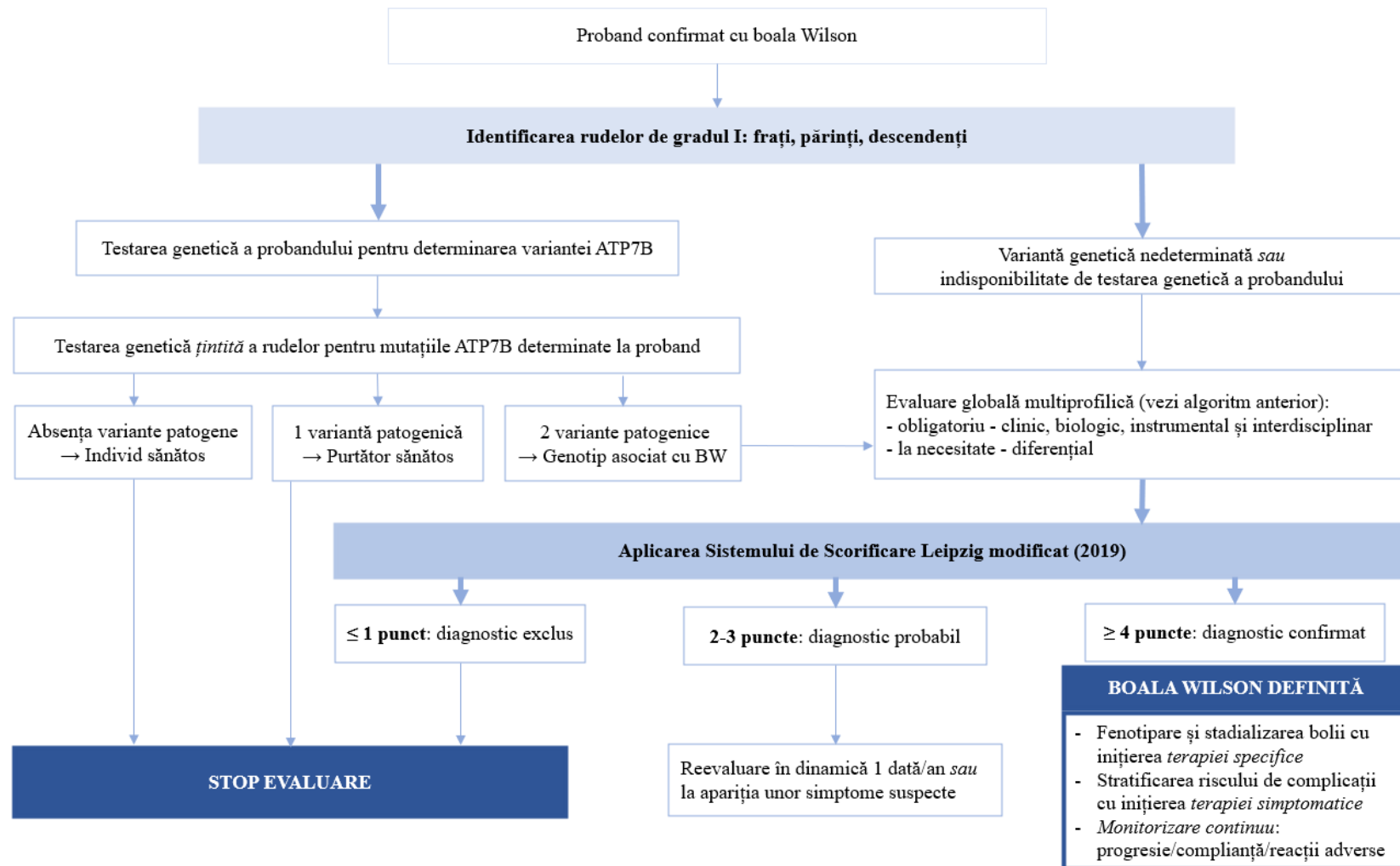


Figura 9. Algoritmul de screening familial în boala Wilson

4. CONCLUZII GENERALE

1. Aspectele demografice ale pacienților cu BW din studiul nostru relevă predominarea bărbaților (60,4%), vârsta medie $22,62 \pm 9,63$ ani și prezentare neurologică la debutul bolii, întârzierea stabilirii diagnosticului clinic fiind $26,8 \pm 35,77$ luni.
2. Fenotipul mixt reprezintă cel mai frecvent tip de prezentare clinică. La bărbați, predomină fenotipul neuro-psihiatric, iar la femei nu este o diferență între cel hepatic și neuro-psihiatric.
3. În cohorta de cercetare se identifică o variabilitate înaltă de mutații genetice, predominând statul de heterozigot compus. Mutația *p.H1069Q* prezintă la circa 64% pacienți. La 1/3 dintre pacienții cercetați au fost identificate și alte mutații *non-p.H1069Q* (36%) care ar putea influența diversitatea clinică în BW.
4. Fenotipul neurologic a fost asociat cu profilul *p.H1069Q*, iar cel hepatic cu profilul *non-p.H1069Q*. Variantele mutaționale severe (*frameshift/nonsense*) au fost asociate cu fenotipul hepatic și mixt, o evoluție severă a bolii hepatice, un nivel mai redus al ceruloplasminei serice și a cuprului urinar.
5. Screening-ul familial al pacienților a identificat membri noi cu BW, cu vârsta medie de $16,25 \pm 9,7$ ani, cu predominarea fenotipului hepatic și mutației *p.H1069Q*. La 2 din pacienți a fost detectată o mutație foarte rară *p.Phe764=*.
6. Algoritmul de stabilire a diagnosticului de BW este important pentru conduita individualizată a pacientului bazată pe fenotipul clinic și genotip, în timp ce algoritmul de screening familial permite identificarea de pacienți în faza a-/presimptomatică a bolii.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. La toți pacienții cu o hepatopatie de etiologie non-virală cu sau fără simptome neuro-psihiatrice, indiferent de vârstă, trebuie de efectuat parametrii metabolismului cuprului (ceruloplasmina serică și cuprul urinar în 24h).
2. Pacienții identificați cu modificări ai indicatorilor metabolismului cuprului (ceruloplasmina serică și cuprul urinar în 24h) se recomandă de a fi evaluați prin sistemul de scorificare Leipzig modificat.
3. Pacienții suspecți pentru BW cu un scor Leipzig 2-3 puncte sunt eligibili pentru testare genetică, în timp ce pacienții care au întrunit ≥ 4 puncte pot fi stabiliți cu diagnosticul de BW definită, testarea genetică nefiind obligatorie în acest caz.
4. Cu scopul de optimizare a managementului de evaluare a pacientului suspect pentru BW este recomandat spre implementare "Algoritmul de stabilire a diagnosticului de boală Wilson", propus medicilor clinicieni (medic de familie, pediatru, gastroenterolog/hepatolog, neurolog, genetician) din Republica Moldova, elaborat în conformitate cu condițiile de activitate autohtone.
5. Pentru examinarea membrilor de familie a pacienților noi diagnosticați cu BW se propune utilizarea în practica clinică "Algoritmul de screening familial în boală Wilson". Astfel, vor fi identificați persoane cu BW în faza presimptomatică a bolii, ceea ce va permite inițierea terapiei cu chelatori și prevenirea dezvoltării complicațiilor asociate BW.

BIBLIOGRAFIE

1. Wu F. and al. Wilson's Disease: A Comprehensive Review of the Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. March, 2015; 16: 6419-6431.
2. European Association for Study of Liver (EASL). Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology*. 2012; vol. 56: 671–685.
3. Kumar M. and al. WilsonGen a comprehensive clinically annotated genomic variant resource for Wilson's Disease. *Scientific Reports*. 2020; 10:9037.
4. Chabik G, Litwin T, Czlonkowska A. Concordance rates of Wilson's disease phenotype among siblings. *J Inher Metab Dis* 2014; 37: 131–135.
5. Cheng TF, Choudhuri S, Muldoon-Jacobs K. Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals: a literature review. *J Appl Toxicol* 2012; 32:643–653.
6. Ferenci P. Phenotype-genotype correlations in patients with Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1315: 1–5.
7. Cicoș R, Șendroiu A, Schipor S, Bohîlțea LC, Șendroiu I, et al. Genotype-Phenotype Correlations in a Mountain Population Community with High Prevalence of Wilson's Disease: Genetic and Clinical Homogeneity. *PLoS ONE* 2014; 9(6):e98520.
8. Barbour B, Salameh P. Consanguinity in Lebanon: prevalence, distribution and determinants. *J Biosoc Sci* 2009; 41: 505–517.
9. Czlonkowska A, Gromadzka G, Chabik G. Monozygotic female twins discordant for phenotype of Wilson's disease. *Mov Disord*. 2009; 24(7):1066–9.
10. Yahata S, Yung S, Mandai M, et al. Phenotypes and chronic organ damage may be different among siblings with Wilson's disease. *J Clin Transl Hepatol*. 2017; 5(1):27–30.
11. Cheng N, Wang H, Wu W, et al. Spectrum of ATP7B mutations and genotype–phenotype correlation in large-scale Chinese patients with Wilson disease. *Clin Genet*. 2017; 92(1):69–79.
12. Gialluisi A, Incollu S, Pippucci T, et al. The homozygosity index (HI) approach reveals high allele frequency for Wilson disease in the Sardinian population. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(11):1308–11.
13. Barresi V, Trovato-Salinaro A, Spampinato G, et al. Transcriptome analysis of copper homeostasis genes reveals coordinated upregulation of SLC31A1, SCO1, and COX11 in colorectal cancer. *FEBS Open Bio*. 2016;6(8):794–806.
14. Espinos C., Ferenci P. Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice? *Journal of Hepatology*. 2020; 2. doi: 10.1016/j.jhepr.2020.100114.
15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> [accesat la 26.04.2024].
16. <https://omim.org/> [accesat la 26.04.2024].
17. <https://gnomad.broadinstitute.org/> [accesat la 26.04.2024].
18. <https://clinvarminer.genetics.utah.edu/> [accesat la 26.04.2024].
19. <https://clingen.igib.res.in/WilsonGen/> [accesat la 26.04.2024].
20. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. 2015; 17(5):405.

21. Panzer M, Viveiros A, Schaefer B, Baumgartner N, Seppi K, Djamshidian A, et al. Synonymous mutation in adenosine triphosphatase copper-transporting beta causes enhanced exon skipping in Wilson disease. *Hepatol Commun.* 2022; 6(7):1611-1619. DOI: 10.1002/hep4.1922

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRILOR LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE

a d-nei Cumpătă Veronica, realizate la teza de doctor în științe medicale, cu tema : ”Interrelația dintre fenotipul clinic și genotip la pacienții cu boala Wilson”, Specialitatea Boli Interne (Gastroenterologie Și Hepatologie), Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie ”Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE

- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**

- **articole în reviste de categoria B**

1. **Cumpătă V.** Rolul proteinei ATP7B în homeostazia cuprului și în dezvoltarea bolii Wilson: revista literaturii [The role of ATP7B protein in copper homeostasis and in the development of Wilson's disease: a literature review]. In: *Arta Medica.* 2022; 82(1): 16-22. e-ISSN 1810-1879.
2. **Cumpata V.** Phenotypic polymorphism in Wilson's disease – between genetics and epigenetics. In: *Mold Med J.* 2022; 65(1): 61-67. ISSN 2537-6381.
3. **Cumpata V.,** Turcanu A., Tcaciuc E. Phenotypic and genotypic diagnosis of Wilson's disease: a clinical case. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină.* 21 Nov 2022; 246-252. e-ISSN 2587-3873.
4. Turcanu, A. and **Cumpata, V.** The spectrum of liver presentation in Wilson's disease: a literature review. In: *One Health & Risk Management.* 2023; 4(1): 27-34. e-ISSN 2587-3466.
5. **Cumpata V,** Turcanu A, Sacara V. The impact of family screening in patients with Wilson's disease from the Republic of Moldova. *Mold J Health Sci.* 2024;11(1): 19-26. ISSN 2345-1467

- **Materiale/teze în lucrările conferințelor științifice naționale și internaționale**

- **internaționale desfășurate peste hotare:**

6. Lisnic V., **Cumpata V.** and Turcanu A. Wilson Disease – Constellation of Phenotypes. În: *The 2nd Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders: abstract book.* Brașov, România; 08-09 Oct 2021, p.15.
7. **Cumpata V.,** Sacara V. and Turcanu A. The genotypic profile of patients with Wilson's Disease in the Republic of Moldova. În: *The 10th Update on Hepatology Course.* Bucharest, Romania; March 23 – 25, 2023, *Surgery, Gastroenterology and Oncology*, 28 (1), S37. e-ISSN: 2601-1700.
8. **Cumpata V.,** Sacara V. and Turcanu A. Genotypic aspects in Wilson's disease patients with liver damage from the Republic of Moldova. În: *The 42nd National Congress of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy: abstract book.* Iași, Romania; June 2023; *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 32 (2), p.32. ISSN 2457-3876.
9. **Cumpata V.,** Turcanu A., Mazur-Nicorici Lucia. Genetic features of patients with Wilson's disease in Republic of Moldova: a pilot study. În: *The 33rd Annual Meeting the Asian Pacific*

Association for the Study of the Liver: abstract book. Kyoto, Japonia; 27-31 March 2024. *Hepatol Int.* 8 (1), p.52. DOI:10.1007/s12072-024-10670-w. ISSN: 1936-0541.

10. **Cumpata V.**, Turcanu A., Sacara V. Pseudo-dominant inheritance in Wilson's disease: a case report. In: *The 33rd Annual Meeting the Asian Pacific Association for the Study of the Liver: abstract book*. Kyoto, Japonia; 27-31 March 2024. *Hepatol Int.* 8 (1), p.666. DOI:10.1007/s12072-024-10670-w. ISSN: 1936-0541.
11. **Cumpata V.**, Turcanu A. and Sacara V. The p.H1069Q and Non- p.H1069Q profile in patients with Wilson's disease from the Republic of Moldova. În: *The 43rd National Congress of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy: abstract book*. Cluj-Napoca, Romania; June 2024; *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 33 (2), p.20. e-ISSN: 1842-1121
12. **Cumpata V.**, Turcanu A. and Sacara V. Missense mutation predominates in moldavian patients with Wilson's disease. În: *EASL Congress 2025: abstract book*. Amsterdam, Țările de Jos; 07-10 May 2025; *Journal of Hepatology*, 82 (S1), p.S721. e-ISSN: 1600-0641
13. **Cumpata V.**, Sacara V. and Turcanu A. Detection of rare mutations of Wilson's disease during family screening. În: *EASL Congress 2025: abstract book*. Amsterdam, Țările de Jos; 07-10 May 2025; *Journal of Hepatology*, 82 (S1), p.S750. e-ISSN: 1600-0641

- **internaționale desfășurate în Republica Moldova**

14. **Cumpata V.** The diagnostic challenges of Wilson's disease related to copper findings. În: *The 9th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera: abstract book*. Chișinău; 2022, p.221. ISBN 978-9975-3544-2-4.
15. **Cumpata V.**, Sacara V. Tintari F., and Turcanu A. Clinical and genotypic aspects in patients with Wilson's disease from the Republic of Moldova. În: *The 37th Balkan Medical Week THE PERSPECTIVES OF BALKAN MEDICINE IN THE POST COVID-19 ERA: abstract book*. Chișinău; June 2023; *Archives of the Balkan Medical Union*, p. 153. e-ISSN: 2558-815X.
16. **Cumpata V.** Clinical "odyssey" in Wilson's disease patients from the Republic of Moldova. In: *The 10th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera: abstract book*. Chișinău; 2024, p.124. ISBN 978-9975-3544-2-4.

- **naționale**

17. Turcanu A., Sacara V., **Cumpata V.**, Tcaciuc E. And Lisnic V. Correlation between neurological impairment and liver status in Wilson's disease. În: *The 7th Congress of the Society of Neurologists from the Republic of Moldova: abstract book*. Chișinău; Sep 2021, 64, p. 55. ISSN 2537-6381.
18. **Cumpata V.**, Sacara V., Turcanu A. Wilson's Disease: clinical evolution of Moldovan patients. În: *Annual Scientific Conference Dedicated to the 76th Anniversary of the Foundation of USMF "Nicolae Testemițanu": abstract book*. Chișinău; Oct 2021, p.121. ISBN 978-9975-82-223-7.
19. **Cumpata V.**, Turcanu A. and Sacara V. Exchangeable Copper - A new diagnostic indicator for Wilson's Disease. În: *Annual Scientific Conference - Biomedical and Healthcare Research: Quality, Excellence, and Performance. USMF "Nicolae Testemițanu": abstract book*. Chișinău; 19-21 Oct 2022, 29 (3), p.177. ISSN 2345-1467.
20. **Cumpata V.**, Sacara V. and Turcanu A. Results of family screening in patients with Wilson's disease in Moldova. În: *Annual Scientific Conference - Biomedical and Healthcare Research: Quality, Excellence, and Performance. USMF "Nicolae Testemițanu": abstract book*. Chișinău; 18-20 Oct 2023, 10 (3), p. 247. ISSN 2345-1467.

- **Certificat de inovator:**

21. Țurcanu A., **Cumpătă V.**, Tcaciuc E., Sacară V. Algoritmul de stabilire a diagnosticului de boala Wilson. Certificat de inovație Nr.6243. 19.06.2024.
22. **Cumpătă V.**, Țurcanu A., Sacară V. Algoritmul de screening familial în boala Wilson. Certificat de inovație Nr.6244. 19.06.2024.

- **Participări cu comunicări la forumuri științifice:**

- **internaționale:**

23. **Cumpata V.** Genetic features of patients with Wilson's disease in Republic of Moldova: a pilot study. *The 33rd Annual Meeting the Asian Pacific Association for the Study of the Liver: abstract book*. Kyoto, Japonia; 27-31 March 2024.
24. **Cumpata V.** The p.H1069Q and non-p.H1069Q profile in patients with Wilson's disease from the Republic of Moldova. *The 43rd National Congress of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy*. Cluj-Napoca, România, 27-29 iunie 2024.

- **naționale**

25. **Cumpătă V.** Boala Wilson – prin prisma genotipului homozigot, heterozigotului compus și a heterozigotului simplu. *The 2nd UpDate on Hepatology Course: Hepatologia de precizie*. Chișinău, 17-18 decembrie 2021.
26. **Cumpata V.** The diagnostic challenges of Wilson's disease related to copper findings. *The 9th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera*. Chișinău, 12-14 May 2022.
27. **Cumpătă V.** Profilul hepatic al pacientului cu boala Wilson. Serie de cazuri clinice *The 3rd UpDate on Hepatology Course: New frontiers in Hepatology*. Chișinău, 09-10 decembrie 2022.
28. **Cumpata V.**, Sacara V. and Turcanu A. Clinical and genotypic aspects in patients with Wilson's disease from the Republic of Moldova. *The 37th Balkan Medical Week THE PERSPECTIVES OF BALKAN MEDICINE IN THE POST COVID-19 ERA*. Chișinău; 07-09 June 2023.
29. **Cumpata V.** Results of family screening in patients with Wilson's disease in Moldova. *Conferința Științifică Anuală - Cercetare în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău, 18-20 octombrie 2023.
30. **Cumpătă V.** Boala Wilson – boala întregii familii? *The 4th UpDate on Hepatology Course: Boli hepatice rare – tranziția îngrijirii medicale de la copil la adult*. Chișinău, 09 decembrie 2023.
31. **Cumpătă V.** Clinical "odyssey" in Wilson's disease patients from the Republic of Moldova. *The 10th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera*. Chișinău, 24 aprilie 2024.
32. **Cumpătă V.** Tratament personalizat în boala Wilson. *The 5th UpDate on Hepatology Course: Refocusare și Resetare în Boli Hepatice*. Chișinău, 14 decembrie 2024.
33. **Cumpătă V.** Impactul screening-ului familial la pacienții cu boala Wilson din Republica Moldova. *Conferința Națională "Ziua Bolilor Rare 2025"*. Chișinău, 27 februarie–01 martie 2025.

- **Participări cu postere moderate la foruri științifice:**

- **internaționale**

34. **Cumpata V.**, Sacara V. and Turcanu A. The genotypic profile of patients with Wilson's Disease in the Republic of Moldova. *The 10th Update on Hepatology Course*. Bucharest, Romania, 23 – 25 March 2023.
35. **Cumpata V.**, Sacara V. and Turcanu A. Genotypic aspects in Wilson's disease patients with liver damage from the Republic of Moldova. *The 42nd National Congress of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy*. Iași, Romania, 07-10 June 2023.
36. **Cumpata V.**, Turcanu A., Sacara V. Pseudo-dominant inheritance in Wilson's disease: a case report. *The 33rd Annual Meeting the Asian Pacific Association for the Study of the Liver*. Kyoto, Japonia, 27-31 March 2024.
37. **Cumpata V.**, Turcanu A. and Sacara V. Missense mutation predominates in moldavian patients with Wilson's disease. *EASL Congress 2025*. Amsterdam, Țările de Jos; 07-10 May 2025.
38. **Cumpata V.**, Sacara V. and Turcanu A. Detection of rare mutations of Wilson's disease during family screening. *EASL Congress 2025*. Amsterdam, Țările de Jos; 07-10 May 2025.

- **naționale**

39. **Cumpata V.**, Sacara V., Turcanu A. Wilson's Disease: clinical evolution of Moldovan patients. *Annual Scientific Conference Dedicated to the 76th Anniversary of the Foundation of USMF "Nicolae Testemițanu"*. Chișinău, 21 Octombrie 2021.
40. **Cumpata V.**, Turcanu A. and Sacara V. Exchangeable Copper - A new diagnostic indicator for Wilson's Disease. *Annual Scientific Conference - Biomedical and Healthcare Research: Quality, Excellence, and Performance USMF "Nicolae Testemițanu"*. Chișinău, 20 Octombrie 2022.

CUMPĂTĂ Veronica

**INTERRELAȚIA DINTRE FENOTIPUL CLINIC ȘI GENOTIP LA PACIENȚII CU
BOALA WILSON**

321.01 – BOLI INTERNE (GASTROENTEROLOGIE ȘI HEPATOLOGIE)

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 02.05.2025
Hârtie 80gr/m². Tipar offset.
Coli de tipar: 1.92

Formatul hârtiei: 60x80 1/16
Tiraj: 50 ex.
Comanda nr. 12

Tipografia: **ÎI „Covalciuc Maria”**
Chișinău, Str. Vl. Korolenko 61/3
Tel.: (+373 68) 04 45 10