

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris

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

CUMPĂTĂ Veronica

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

321.01 – BOLI INTERNE (GASTROENTEROLOGIE ȘI HEPATOLOGIE)

Teză 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.

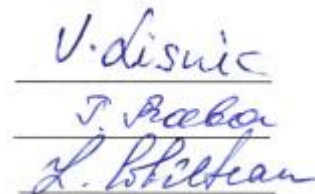


Membrii comisiei de îndrumare:

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).

Componenta 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

LISTA ABREVIERILOR	5
LISTA TABELELOR	7
LISTA FIGURILOR	8
INTRODUCERE	9
1. BOALA WILSON – EVALUAREA INTERELAȚIEI GENOTIP – FENOTIP PRIN PRISMA PROFILULUI CLINICO – EVOLUTIV	15
1.1. Boala Wilson – implicare patogenetică complexă	15
1.1.1. Date epidemiologice	15
1.1.2. Gena și proteina ATP7B: arhitectura moleculară și rolul	16
1.1.3. Rolul proteinei ATP7B în ficat și consecințe ale disfuncției ei	18
1.2. Variabilitatea genetică în boala Wilson	20
1.3. Polimorfismul fenotipic în boala Wilson	22
1.3.1. Fenotipul hepatic	23
1.3.2. Fenotipul neuro-psihiatric	27
1.3.3. Leziunile oculare	30
1.3.4. Clasificarea fenotipică în boala Wilson	30
1.4. Identificarea corelației fenotip –genotip ale bolii Wilson	31
1.4.1. Mecanisme epigenetice	33
1.5. Provocări de diagnostic în boala Wilson	35
1.5.1. Biopsia hepatică și caracteristica histologică a bolii Wilson	37
1.5.2. Algoritmul diagnosticului genetic	39
1.5.3. Rolul scorului Leipzig în diagnosticul bolii Wilson	40
1.6. Impactul screening-ului familial în boala Wilson	40
1.7. Concluzii capitolul 1	43
2. MATERIALE ȘI METODE	44
2.1. Caracteristica generală a cercetării	44
2.2. Metodele de cercetare aplicate în studiu	45
2.2.1. Testarea genetică și metodele utilizate	47
2.3. Procesarea și analiza matematico-statistică a materialului	49

2.4. Concluzii capitolul 2	50
3. REZULTATELE CERCETĂRII	51
3.1. Identificarea aspectelor demografice la pacienții cu boala Wilson	51
3.1.1. Identificarea cohorței de studiu prin evaluarea etapei de pre-screening și screening	51
3.1.2. Caracteristica demografică a pacienților cu boala Wilson din cohorta de studiu	51
3.2. Definirea fenotipurilor clinice evidențiate la pacienții cu boala Wilson	56
3.2.1. Descrierea fenotipului hepatic	57
3.2.2. Analiza fenotipului neuro-psihiatric	57
3.2.3. Evaluarea fenotipului mixt	58
3.3. Caracteristica mutațiilor genetice determinate la pacienții cu boala Wilson	60
3.3.1. Caracteristica mutațiilor identificate în lotul de cercetare	60
3.3.2. Identificarea relației genotip-fenotip la pacienții cu boala Wilson	62
3.4. Rolul screening-ului familial la pacienții cu boala Wilson	65
3.4.1. Descrierea rezultatelor obținute la screening-ul familial al pacienților cu boala Wilson	65
3.4.2. Crearea algoritmului de diagnostic în boala Wilson	67
3.5. Concluzii capitolul 3	69
4. DISCUȚII	70
5. CONCLUZII GENERALE	81
RECOMANDĂRI PRACTICE	82
BIBLIOGRAFIE	83
ANEXE	95
INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICARE REZULTATELOR CERCETĂRII	132
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	137
CURRICULUM VITAE	138

LISTA ABREVIERILOR

Abreviere	Semnificație
ACMG	Colegiul American de Genetică Medicală și Genom
ADN	acid dezoxiribonucleic
ALT	alaninaminotransaminază
alte-M	altă mutație
AMP	Asociația Patologiei Moleculare
APRI	raport aspartat transaminază la trombocite
ARN	acid ribonucleic
AST	aspartataminotransaminază
ATP7A	ATP- ază, alfa-polipectid ce transportă cupru
ATP7B	ATP- ază, beta-polipectid ce transportă cupru
BCH	boală cronică hepatică
BW	boala Wilson
Cp	ceruloplasmină
CT	tomografie computerizată
Cu	cupru
dNTPs	nucleotide obișnuite
ddNTPs	dideoxinucleotidele
ECG	electrocardiograma
Eco-Abd	ecografie abdominală
Eco-CG	ecografia cordului
EDS	endoscopie digestivă superioară
FIB-4	scor de calculare a fibroze bazat pe 4 parametri
h	oră
IHA	insuficiență hepatică acută
IHAC	insuficiență hepatică acută pe cronică
IKF	inelul Kayser - Fleischer
IMSP	Instituție medico-sanitară publică
INR	International normalised ratio

MASLD	boala ficatului steatozic asociat cu disfuncții metabolice
MBDs	domeniile de legare a metalului (<i>metal-binding domains</i>)
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MMs	mutație missense
MS	mutație severă
n	număr
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	reacție de polimerizare în lanț
RMN	rezonanță magnetică nucleară
SSCP	Single-strand conformational polymorphism
TH	transplant hepatic
TM	canale transmembranare
V	venă
vv	vene
WES/WGS	whole-exome sequencing/ whole-genome sequencing

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.	Diagnosticul diferențial între tipurile de insuficiență hepatică acută asociată cu boala Wilson	25
Tabelul 2.	Clasificarea fenotipică în boala Wilson	30
Tabelul 3.	Caracteristica demografică a lotului cercetat	52
Tabelul 4.	Distribuția pe vârste în funcție de debut și stabilirea diagnosticului	52
Tabelul 5.	Caracteristica comparativă a pacienților din grupul non-BW și BW	53
Tabelul 6.	Caracteristica genetică a profilului non- <i>p.H1069Q</i> în funcție de statutul moștenirii	63
Tabelul 7.	Recomandările ghidurilor pe subiectul managementului bolii Wilson	68

LISTA FIGURILOR

Figura 1.	Gena ATP7B și proteina ATP7B	17
Figura 2.	Caracteristicile histologice în boala Wilson	38
Figura 3.	Moștenirea mutațiilor în cadrul familiei	41
Figura 4.	Algoritmul de examinare în cadrul screening-ului de familie	42
Figura 5.	Diversitatea etnică a lotului de cercetare	52
Figura 6.	Distribuția fenotipului în funcție de sex și vârsta de debut a bolii	56
Figura 7.	Varietatea simptomatică a fenotipului neurologic	58
Figura 8.	Durata stabilirii diagnosticului în funcție de profilul genetic	63
Figura 9.	Diversitatea genetică a profilului non- <i>p.H1069Q</i>	64
Figura 10.	Nivelul cuprului urinar în 24 h în funcție de statutul moștenirii la pacienții cu <i>p.H1069Q</i>	64
Figura 11.	Nivelul ceruloplasminei serice în funcție de tipul mutației	65
Figura 12.	Moștenire pseudo-dominantă	66
Figura 13.	Familii depistate cu ambii copii afectați de maladia Wilson	67

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 dificultăți 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 modificatori 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 suspecți 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 "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 acestea 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 acestora 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 (Chişinău, 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 (Chişinău, 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” (Chişinău, Republica Moldova, 2023);
- The 37th Balkan Medical Week THE PERSPECTIVES OF BALKAN MEDICINE IN THE POST COVID-19 ERA (Chişinău, 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 (Chişinău, Republica Moldova, 2022);
- Conferința Științifică Anuală - Cercetare în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță. USMF „Nicolae Testemițanu” (Chişinău, Republica Moldova, 2022);
- The 2nd UpDate on Hepatology Course: Hepatologia de precizie; 17 - 18 Decembrie 2021, (Chişinău, Republica Moldova);
- Conferința Științifică Anuală Consacrat Aniversării a 76-a de la Fondarea USMF „Nicolae Testemițanu” (Chişinău, 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

internațională – 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, tabelelor 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, parametrul cuprului, screening familial, testare genetică.

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

1.1. Boala Wilson – implicare patogenetică complexă

BW reprezintă o tulburare monogenică determinată de dereglarea metabolismului Cu, ca rezultat al mutației la nivelul genei ATP7B. Excreția redusă a Cu duce la acumularea acestuia în țesuturi, iar depozitele toxice induc stresul oxidativ, modifică expresia genelor, inhibă direct activitatea proteinelor și afectează funcția mitocondrială, cauzând leziuni multiple structurale și funcționale în mai multe organe, însă cu predilecție în ficat și creier. [1]

BW este o tulburare potențial letală, dacă nu este diagnosticată timpuriu. De aceea, detectarea precoce și inițierea tratamentului în timp util sunt esențiale în prevenirea progresiei bolii și a sechelelor ireversibile. [1] Actualmente, BW este una dintre acele tulburări genetice rare ce beneficiază de tratament eficient pe tot parcursul vieții, care au modificat dramatic prognosticul bolii și calitatea vieții la acești bolnavi. Tratamentul nu este lipsit de provocări, dar monitorizarea optimă pe tot parcursul vieții este esențială pentru un rezultat bun. [14]

A fost descrisă pentru prima dată în 1912 de dr. Samuel Kinnier Wilson ca „degenerescență lenticulară progresivă”, o boală neurologică letală cu transmitere familială, asociată cu o boală cronică de ficat care duce la ciroză. În 1921, Hall a sugerat că este o boală autozomal recesivă, acest lucru fiind confirmat de datele publicate în 1953 și 1960 de către Beans. Cummings a demonstrat că boala este cauzată de acumularea de Cu atât în ficat, cât și în creier. În perioada 1950-1960 a fost inițiat terapia cu D-penicilamina la bolnavii cu BW, iar în 1968 Sternlieb și Scheinberg au demonstrat rolul benefic al D-penicilaminei la pacienții asimptomatici. În 1969, se utilizează pentru prima dată trientina ca alternativă la pacienții cu intoleranță la D-penicilamină. În 1985, Frydman și alții, au identificat locul genei responsabile de BW și anume pe cromozomul 13. În 1993, 3 grupuri de cercetători independenți au raportat despre localizarea, identificarea și rolul genei ATP7B în apariția BW. Ulterior, a fost creat *The Wilson Disease Mutation Database*, ce include peste 500 de mutații ale genei ATP7B asociate cu BW. [15]

1.1.1. Date epidemiologice

BW este o tulburare genetică răspândită în întreaga lume [14]. Vârsta de debut variază de la 2 ani la 80 de ani, însă majoritatea sunt diagnosticați între 5-35 ani [2, 16]. Estimările epidemiologice au stabilit diferențe notabile între prevalența clinică și cea genetică a bolii, iar acest lucru se datorează mai multor factori, inclusiv modificatorilor genetici, epigenetici și obiceiurilor (dieta, tradiții, expunerea la mediu toxic) [17]. Cercetarea lui Sandahl T. D. și colegii [18] a evidențiat că

estimările inițiale a prevalenței din 1984 de 1:30000-50000 sunt valabile și în prezent, cel puțin pentru Statele Unite, Europa și Asia, deși studiile genetice relevă că prevalența este de 3-4 ori mai mare decât estimările clinice [18], în special în comunitățile izolate geografic, economic, religios, social și cultural, precum și în populațiile unde se practică căsătoriile între rude (consangvinizarea) [16]. Incidența variază între 1:5000 și 1:30000, însă se consideră a fi mai frecventă decât se credea anterior [2, 16]. Frecvența purtătorilor în populația generală variază de la 1:90-150, ceea ce o face să fie una dintre cele mai răspândite tulburări mendeliene [2].

BW este observată în toate rasele și grupurile etnice [7]. În Europa, prevalența clinică este estimată la 12 – 20:10000, în timp ce prevalența genei afectate este mai mare 1:7000 [14]. Studiile din Asia, evidențiază o prevalență ce variază de la 1:3000-30000, ceea ce ne sugerează că predispoziția la BW este mai frecventă în Asia decât în Europa [19]. În Japonia prevalența este 1:30000 de locuitori, comparativ cu Australia, unde se raportează o prevalență de 1: 100000 persoane [20]. Date epidemiologice exacte în India lipsesc, însă un studiu din nordul Indiei a raportat că BW se regăsește în 7,6% cazuri din bolile hepatice, iar altă cercetare din India de Sud a raportat 15-20 de cazuri noi de BW, fenotip neurologic, în fiecare an [21]. În Statele Unite ale Americii, frecvența purtătorului este de 1:90 de persoane, iar prevalența BW este de 1:30000 de persoane [20]. Cercetări de prevalență în America de Sud nu au fost înregistrate, doar studii mici [22] și un prim-studiu retrospectiv ce descrie pacienți cu BW care trăiesc în sudul Braziliei, însă în 74.5 % pacienții aveau un strămoș european [23]. În Africa, nu există date epidemiologice exacte, deoarece este rar diagnosticată și raportată, cu excepția țărilor din Africa de Nord [24], unde consangvinitatea este comună și această tulburare este frecvent întâlnită [25]. Însă, sunt declarate cazuri unice în câteva țări africane Sub-Sahariene: Etiopia [25, 26], Senegal [27], Nigeria [28], Kenia [29]. În lumea arabă, Liban, Egipt, Arabia Saudită și Oman, puține studii despre BW au fost publicate [30] (anexa 1).

În țările vecine, România [31-33] și Ucraina [34, 35], nu au fost înregistrate date statistice exacte, fiind publicate doar studii mici. De asemenea, a fost descrisă o zonă montană izolată din România cu cea mai mare prevalență a bolii raportată vreodată - 1:1130 persoane [7]. Frecvența și distribuția mutației ATP7B la pacienții din Republica Moldova nu este cunoscută cu certitudine.

1.1.2. Gena și proteina ATP7B: arhitectura moleculară și rolul

Gena ATP7B este situată pe brațul lung al cromozomului 13 (13q14.3). Este formată din 20 de introni (secvențe nucleotidice necodificatoare) și 21 de exoni (secvențe nucleotidice codificatoare); având o lungime genomică de aproximativ 80 kb. Este exprimată cel mai mult în ficat, dar poate fi găsită în rinichi, placentă, glande mamare, creier, retină și plămâni [52]. Gena codifică structura unei proteine transportatoare de Cu P_1 - tip ATP-ază, numită oficial ATP7B, ce

transportă Cu intracelular (figura 1), iar mutațiile din cadrul genei provoacă sinteza unei proteine defecte sau afuncționale. În prezent, ATP7B este singura genă cunoscută că poate provoca BW [54].

Proteina ATP7B (cunoscută și ca Wilson ATP-aza) aparține clasei 1B a superfamiliei de ATP-aze (proteine ce catalizează descompunerea adenozin trifosfatului) de tip P foarte selective și are un rol primordial în transportul intracelular al ionilor de Cu [55]. În pofida importanței sale fiziologice, activitatea biochimică și reglarea funcțională a proteinei ATP7B sunt limitate, iar acest lucru se datorează organizării sale sofisticate de tip multidomeniu [1].

Proteina este compusă dintr-un singur lanț polipeptidic pliat în mai multe domenii funcționale, ce conține 1465 aminoacizi, fiind localizată ntracelular, preponderent în partea *trans* a complexului Golgi, transmembranar [1, 56]. Porțiunea membranară a ATP-azei conține domeniul M, care este compus din opt canale ionice transmembranare hidrofobe (TM1-TM8) și reprezintă mai puțin de 20% din masa moleculară a acesteia. Cea mai mare parte (aproximativ 80%) a masei proteice este expusă în citoplasmă și include nouă domenii: 6 MBDs, domeniu N, A, P și capătul C-terminal (-COOH). Capetele C-terminal și N-terminal se întâlnesc la toate proteinele; domeniu N, A și P sunt comune pentru toate ATP-azele de tip P; iar MBDs este componentă specifică proteinei ATP7B [55].

MBDs cuprinde șase domenii care leagă Cu, numerotate de la 1 la 6 începând cu capătul N-terminal (NH₂) a lanțului polipeptidic, unite prin secvențe de linker. Linker-ul conține locusuri pentru fosforilare și participă în mișcarea intracelulară a proteinei ATP7B. Domeniul A („actuador”) – prima buclă citoplasmatică, coordonează schimbările conformaționale în timpul

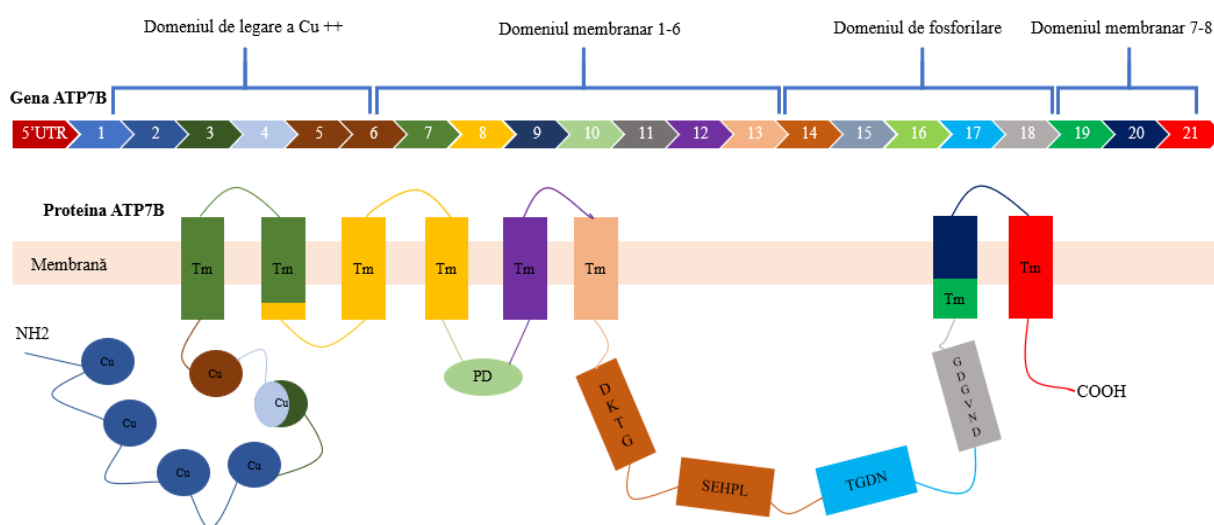


Figura 1. Gena ATP7B și proteina ATP7B

Adaptat după: Fanni D. et al. Expression of ATP7B in normal human liver. Eur J Histochem; 2005 [53].
Nota: PD – domeniul fosfatazei, Cu – cupru, Tm – transmembranar

catalizei; domeniul P – a doua buclă citoplasmatică, responsabilă de fosforilare catalitică și conține un aspartat rezidual neschimbat la poziția 1027 (Asp1027) fosforilat tranzitoriu în timpul hidrolizei adenozin trifosfatului (ATP); domeniul N – a treia buclă citoplasmatică, include domeniul de legare a nucleotidelor - ATP (a nu se confunda cu capătul N-terminal). Capătul C-terminal se consideră implicat în interacțiuni de reglementare cu alte regiuni ale proteinei și conține semnalul trileucină (1454LLL1456), acesta fiind recunoscut de complexe proteice adaptoare de clatrină (AP) în procesul de transportare intracelulară a Wilson ATP-azei [57].

Fiecare domeniu funcțional conține secvențe unice de aminoacizi („motif”), cum ar fi în domeniul N – SEHPL, în domeniul P – DKTGT (Asp1027), în domeniul A – TGEA, în domeniul M, TM6 – CPC, capătul C-terminal – LLL, iar în domeniul MBD cele șase locusuri de legare a Cu, conține fiecare secvența repetitivă GMXCXXC. Toate acestea secvențe amino unice au un rol important în procesul de transportare a Cu, iar mutațiile lor sunt asociate cu apariția BW. [54]

1.1.3. Rolul proteinei ATP7B în ficat și consecințe ale disfuncției ei

ATP7B este exprimat cel mai mult în hepatocite. Rolul ATP7B în fiziologia ficatului este bine stabilit: de biosinteză și homeostazie. Cu absorbit din alimente este direcționat mai întâi către ficat, unde este procesat de hepatocite. În condiții de echilibru, ATP7B hepatic își exercită în primul rând „funcția biosintetică”, adică asigură transportul Cu în lumenul complexului Golgi și îl încorporează în apo-Cp, o feroxidază sintetizată de novo în nucleu. În hepatocite, apo-Cp este principalul substrat care primește Cu de la ATP7B, iar capacitatea Cp de a lega șase atomi de Cu, proces dirijat prin oxidarea Fe^{2+} spre Fe^{3+} , o face să fie depozit major de Cu în sânge. După achiziționarea Cu, Cp este eliberată în fluxul sistemic (anexa 2). [58] Chiar dacă 85% - 95% din Cu plasmatic este fixat în Cp, Cu se consideră a fi doar un cofactor pentru Cp, la fel ca și pentru diverse altele metaloenzime [59]. Sunt unele studii ce sugerează că, în afară de Cp, Wilson ATP-aza transferă Cu la omologul Cp, hephaestin, în enterocite. Această proteină este implicată în captarea Fe în intestin, iar, aparent, pierderea funcțională a ATP7B în BW nu suprimă în mod substanțial funcția ei, deoarece Menkes ATP-aza (ATP7A) exprimată în enterocite poate livra Cu la hephaestin [60]. Ficatul este responsabil de menținerea echilibrului sistemic de Cu. Wilson ATP-aza joacă un rol cheie în excreția excesului de Cu din hepatocite în bilă, datorită abilității de a se deplasa între diferite compartimente intracelulare, ca răspuns la modificarea nivelului de Cu în interiorul celulei. Când cresc nivelurile sistemice de Cu și mai mulți ioni intră în hepatocite, această cauzează relocarea rapidă a proteinei ATP7B sub formă de vezicule către membrana canaliculară, unde se acumulează și facilitează sechestrarea surplusului de Cu. Ulterior, veziculele care conțin ATP7B și ioni de Cu, fuzionează cu membrana pentru a elibera conținutul lor în bilă. Astfel, Cu este eliminat prin bilă, iar enzima este recaptată prin endocitoză [58]. Când nivelurile intracelulare de Cu se reduc, ATP7B se reîntoarce în complexul Golgi, unde revine la sarcinile

sale de biosinteză. Coordonarea acestui proces nu este cunoscut pe deplin. Recuperarea ATP7B din regiunea apicală a hepatocitului (canaliculă) și transferul acesteia de la endozomi la Golgi și invers, se bazează pe complexe proteice adaptoare de clatrină (AP), AP1 și AP2. Unele mutații, fie în ATP7B, fie în componentele „mașinăriei” endocitare, blochează întoarcerea ATP7B la complexul Golgi și compromit homeostazia Cu. Cu eliberat în bilă nu este biodisponibil pentru recaptare în tractul gastrointestinal și este eliminat prin masele fecale. Astfel, ficatul joacă un rol major în excreția biliară a Cu, în timp ce rinichii prezintă un rol secundar în excreția lui. [60] Odată cu creșterea concentrației de Cu în interiorul hepatocitului, proteina ATP7B devine inactivă fiind direcționată din complexul Golgi spre endozom/lizozom pentru a fi hidrolizată/distrusă [1].

Expresia ATP7B în alte organe este mai mică în comparație cu cea din ficat; cu toate acestea, se cunosc anumite structuri și/sau celule specializate, în care ATP7B este foarte abundentă, precum locus coeruleus din trunchiul cerebral, neuronii Purkinje din cerebel și celulele din criptele intestinului subțire [61, 62]. Date despre rolul în țesuturile extrahepatice sunt limitate. Unele studii recente sugerând că funcțiile extrahepatice pot fi diferite de cele hepatice, de exemplu, depozitarea Cu în vezicule [61].

Astfel, reieșind din cele expuse anterior, inactivarea proteinei ATP7B în BW duce la excreția biliară deficitară a Cu, ceea ce cauzează supraîncărcarea ficatului și a altor țesuturi, precum și încărcarea inefficientă a Cp cu Cu. Un defect în încorporarea normală a Cu în Cp duce la secreția peptidei fără Cu, ce are un timp de înjumătățire mai scurt, astfel rezultând o concentrație plasmatică redusă (anexa 3). [62] Cauza principală a apariției semnelor clinice sunt modificările patologice declanșate de efectele toxice ale excesului de Cu acumulat în țesuturi, și anume provocarea stresului oxidativ intracelular cu deteriorarea lipidelor, proteinelor, moleculelor de ADN și ARN, deteriorarea mitocondriilor, iar la final, inducerea apoptozei celulare [63].

Din cauză că ficatul este locul principal de depozitare a metalului și fiind implicat în efluxul biliar al excesului de Cu, leziunea hepatică este cea mai frecventă manifestare a BW. De fapt, chiar și bolnavii cu manifestare neurologică a bolii acumulează în exces Cu în ficat și mai mult de jumătate dintre ei se prezintă cu ciroză hepatică. La pacienții cu BW, de obicei, concentrația hepatică a Cu este crescută de aproximativ 5 ori (peste 250 mg/g), mai mare comparativ cu 15-55 mg/g la persoanele sănătoase; Cu fiind distribuit intracelular neomogen și cu o localizare variată în dependență de stadiul bolii. Steatoza hepatică, rezultată în urma distrugerii mitocondriale și dereglării metabolismului lipidic, induce modificări inflamatorii (hepatită), iar persistența factorului toxic provoacă leziune cronică hepatică și necroză celulară, în consecință cu inițierea procesului de fibrozare a ficatului. [62, 63] Ca rezultat al progresiei fibrozei hepatice, se dezvoltă ciroza macronodulară. În cazul când BW nu este tratată, capacitatea de stocare a hepatocitelor se reduce semnificativ, astfel, se mărește concentrația serică de Cu liber, ceea ce duce la acumularea

progresivă în alte organe, în special în creier, ochi, rinichi, oase și inimă, exercitând toxicitate extrahepatică [63].

Concentrația Cu în creierul pacienților Wilson poate atinge valori de 10-15 ori mai mare (până la 450 mg/g) decât 7-60 mg/g la grupul de control; acest lucru fiind confirmat într-un studiu post-mortem al creierului la pacienții cu BW, astfel, relevând o asociere clară între conținutul cerebral de Cu și severitatea bolii neurologice [63]. Expunerea pe termen lung la concentrații mari de Cu are ca rezultat modificări morfologice și afectare funcțională a astrocitelor. Astrocitele formează o parte importantă a barierei hemato-encefalice și sunt esențiale pentru homeostazia neuronală. Nivelurile crescute de Cu din țesut și alterarea micromediului cerebral, cauzate de deteriorarea astrocitelor, conduc la implicarea altor celule și țesuturi ale creierului, inclusiv neuroni și oligodendrocite. Modificările patologice, precum astroglioza, demielinizarea și dezintegrarea țesuturilor (de la rarefacție ușoară la necroză) sunt cel mai frecvent raportate în ganglionii bazali, cerebel și partea superioară a trunchiului cerebral [64]. Pe lângă leziunile cauzate de toxicitatea Cu, encefalopatia hepatică poate contribui la simptomele neuro-psihiatrice în BW, unde disfuncția creierului este cauzată de insuficiență hepatică și/sau șuntul portosistemic [62]. Anomaliile morfologice și funcționale ale retinei din BW sunt asociate cu severitatea patologiei cerebrale detectate prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) și cu deteriorarea neurologică [64].

Procesul fiziopatologic de afectare a altor organe a fost mai puțin investigat, dar se consideră că eliberarea rapidă a Cu în rezultatul necrozei în masă a hepatocitelor poate duce la o creștere considerabilă a nivelului de Cu în sânge în doar câteva zile, prin urmare, poate mima o intoxicație acută cu ioni de Cu. Aceasta se manifestă prin anemie hemolitică Coombs-negativă (non-autoimună) asociată câteodată cu rabdomioliză, mecanismul lor fiind neînțeles în totalitate. [63] Cu seric liber sau Cu nelegat de Cp este filtrat de epiteliul tubilor renali și excretat prin urină, iar în cazul BW, excesul de Cu în parenchimul renal cauzează disfuncția tubilor renali, aminoacidurie și nefrocalcinoză [65]. Acumularea Cu în membrana sinovială și cartilaj a fost sugerată ca fiind cauza majoră a osteoartritei la pacienții cu BW și poate contribui la modificări degenerative accelerate cu deformări, care afectează în special articulațiile mai mari, de asemenea fiind observate și modificări patologice în oase, precum osteomalacia și osteoporoză [66]. Depozitarea Cu în miocard este asociată cu cardiomiopatie și aritmie, iar la examenul histopatologic al țesutului cardiac se evidențiază fibroză interstițială, scleroza vaselor mici și infiltrație focală a celulelor inflamatorii [67].

1.2. Variabilitatea genetică în boala Wilson

Mutațiile la nivelul genei ATP7B pot apărea în orice loc a genei - exoni, splicing site (zonele de limită intron/exon), introni, promotor, regiuni netranslate 5' (UTR5) și 3' (UTR3). Cele mai

frecvente mutații sunt localizate la nivelul exonului 8 (p.R778L) și exonului 14 (p.H1069Q). Cu toate acestea, au existat rapoarte ale persoanelor cu diagnostic de BW în baza testelor clinice și biochimice, însă fără mutații depistate. Astfel, a fost sugerată implicarea unei altei gene care ar putea cauza BW, dar până la momentul actual nu a fost identificată o altă genă. Cea mai frecventă mutație este de tip *substituție missense*, alte variante întâlnite sunt: *frameshift*, *substituție nonsense* și *de tip splicing* [68] (anexa 4 [69-71]). În general, mutația *frameshift* și *missense* sunt asociate cu un fenotip mai sever. Sunt raportate și mutații mai rare, precum de tip reglatoriu, deleția unui exon întreg, prezența a 3 variante patologice concomitente și disomii monogenice. [72]

Utilizând ghidurile Colegiului American de Genetică Medicală și Genom (ACMG) și Asociației Patologiei Moleculare (AMP), a fost creată o sursă electronică relevantă clinic pentru BW, ce cuprinde variante genetice ale genei ATP7B raportate până în februarie 2019, selectate manual din literatură și din 6 baze de date oficiale internaționale asociate cu BW. Sursa este valabilă la adresa <http://clingen.igib.res.in/WilsonGen/>. Așadar, baza de date formată include 3662 de variante genetice ale ATP7B, care pot fi găsite în diferite locuri ale genei; dintre care 1458 s-au dovedit a fi unice. Variantele unice au fost clasificate după mai multe principii: tipul mutației (substituție, inserție, deleție, deleție/inserție), conform consecințelor funcționale (*frameshift*, *Stoploss*, *Stopgain*, *Startloss*, la nivel de introni și de tip *splicing*) și conform ghidului ACMG (variantă patogenă, probabil patogenă, benignă, probabil benignă, cu semnificație necunoscută). [73]

Mutațiile la nivelul secvențelor amino unice, localizate în diferite domenii ale proteinei ATP7B, determină apariția BW. His1069Q – reprezintă cea mai cunoscută mutație, cu o frecvență a alelei în populația generală ce variază între 10-40%, iar în populația europeană fiind de 30-70%. [74] Ea apare la nivelul secvenței SEHPL din domeniul N prin substituția histidinei → acid glutamic din poziția 1069 al lanțului polipeptidic ATP7B, rezultând o pliere greșită a proteinei în acest domeniu, cu fosforilarea anormală în domeniul P și o afinitate redusă față de ATP, o proteină termic instabilă și localizată aberant, nu în complexul Golgi, dar în reticulul endoplasmatic [52, 54]. Alte variante patologice la nivelul acestei secvențe sunt - E1064A (afectând proteina prin imposibilitate de a lega molecula de ATP), G1099, G1101 și I1102 [75].

Mutația la nivelul DKTGT – nu permite relocarea proteinei spre locul de excreție biliară a Cu, respectiv cu acumularea lui intrahepatică; mutația în TGEA – inhibă recuperarea proteinei din citosol în complexul Golgi, când nivelul de Cu se reduce; mutația în CPC – C985T - duce la pierderea completă a activității de transport al Cu. Segmentul proteic 37SFAFDNVGYEG45 (situat chiar înainte de MBD1) interacționează cu domeniul N și direcționează proteina ATP7B către regiunea apicală a hepatocitelor pentru a asigura excreția biliară a Cu la creșterea

concentrației lui, iar mutația N41S din acest segment modifică comportamentul intracelular al proteinei, provocând traficul de vezicule chiar și atunci când Cu nu este ridicat, în plus afectează și țintirea suprafeței canaliculare. [76] Mutații de tip *missense* la nivelul MBD5 și MBD6, sunt asociate cu apariția BW, iar modificarea serinei→alanină, aminoacid localizat între MBD3 și MBD4 induce redistribuirea proteinei ATP7B către endo/lizozomii periferici, în mod normal acest site favorizând localizarea ATP7B în complexul Golgi [63]. Prezența mutațiilor la nivelul linker-ilor din MBDs cauzează BW; de exemplu, în MBD1-MBD2 linker - substituția R136W; în MBD3-MBD4 linker - mutația G333>R; în MBD4-MBD5 linker - mutația A486S; în segmentul ce conectează MBD6-TM1 - un grup de mutații H639Y, L641S, D642H și pMet645Arg (cea mai frecventă variantă patogenă de tip *missense* în Spania 27%) [16]. Mutații care apar aproape de capătul N-terminal pot duce la blocarea completă a sintezei de proteină, acest lucru fiind asociat cu o evoluție severă a BW [76]. Mutații la nivelul LLL asociate cu BW nu au fost depistate, totuși, mai multe mutații care cauzează BW duc la fragmentarea regiunii C-terminale care conține LLL, iar acest lucru probabil să afecteze recunoașterea ATP7B de către proteinele adaptoare. În consecință, proteina ATP7B mutantă rămâne blocată periferic, fiind suprimată recuperarea ei în rețeaua trans-Golgi. [63] Mutații de tip *missense* T1434M sau Q1399Rfs în secvența 1450DKWSL1454 din capătul C-terminal, la fel sunt asociate cu BW [77]. Pacienții cu BW se prezintă cu o heterogenitate genetică în diferite rase și regiuni geografice. De exemplu, mutația H1069Q a ATP7B este mai răspândită la pacienții de origine europeană, cum ar fi cei din Italia, România și Suedia, în timp ce mutația R778L este mai frecventă în Asia de Est, însă nici una dintre aceste două mutații nu au fost găsite în India, unde au fost identificate alte 17 mutații noi. Teoretic, un spectru complet al mutațiilor ar fi util în stabilirea diagnosticului pre-simptomatic pentru pacienții cu BW; totuși, datorită variabilității mutaționale și heterozigocității genei ATP7B, este dificil să utilizez mutația ca un instrument de diagnostic [78].

Conform datelor publicate de Hlistun V. și colegii [79], a unei evaluări clinico-moleculare la 120 pacienți cu BW din Republica Moldova (40 pacienți examinați genetic în Germania, iar 80 – în cadrul Centrului Genetic din Republica Moldova), au fost identificate 18 mutații diferite dintre care 4 variante noi, cele mai frecvente variante patogene fiind p.H1069Q (exon 14) și p.G1314D (exon 20), iar la 13 pacienți reevaluați în Germania nu s-a determinat nici o mutație.

1.3. Polimorfismul fenotipic în boala Wilson

Vârsta de debut depinde de tipul de mutație și de gradul de afectare a funcției proteinei ATP7B, mutațiile din regiunile importante din punct de vedere funcțional sunt asociate cu evoluție severă, debut precoce și o prezentare hepatică predominantă, în timp ce mutațiile din regiunile mai puțin

importante ale genei sunt asociat cu debut tardiv și o prezentare predominantă neurologică sau psihiatrică [1].

Expresia bolii este foarte variabilă, variind de la subiecți asimptomatici la pacienți cu boală hepatică severă [80]. Varianta simptomatică se prezintă cu fenotip hepatic, neurologic-psihiatric sau mixt, având în vedere că predomină leziunea hepatică și cerebrală, dar pot fi implicate și alte organe, precum inima, rinichii, sistemul osteoarticular, glandele endocrine, organele genitale și pielea [63, 81]. Varianta silențioasă (fără simptome: aparent bine) include acei pacienți descriși convențional ca asimptomatici sau presimptomatici (presupune că boala devine manifest clinic mai târziu), fiind identificați prin screening familial sau ocazional, în urma unei evaluări de rutină sau a bolilor intercurrente. [16]

1.3.1. Fenotipul hepatic

BW poate apărea la orice vârstă, dar leziunile hepatice primare sunt cel mai frecvent diagnosticate între 5-35 de ani, deși pot apărea mai devreme sau mai târziu [7]. Se întâlnește cel mai frecvent în adolescență, dar au fost raportate afectare hepatică și la copii foarte mici (<5 ani) [82]. Diversitatea bolilor hepatice la copii cu vârsta mai mică de 5 ani cu BW este mai specială, deoarece se pot prezenta cu orice tipar clinic, de la formă asimptomatică la boală severă. Unii copii sunt diagnosticați cu BW atunci când au avut o problemă de sănătate intercurrente [12], alții sunt depistați prin screening familial [83]. Analizând datele din registrul francez al bolii Wilson, care cuprindea 604 pacienți, s-a observat că 51,6% dintre pacienți la momentul diagnosticului aveau până la 16 ani; 47% au avut leziuni hepatice, 32.2% au avut un fenotip neurologic și 20.8% au fost identificați în screening-ul familial [15].

Manifestările hepatice reprezintă prima manifestare clinică în 40-60% de cazuri și preced apariția simptomelor neurologice până la 10 ani. Leziunea hepatică timpurie, presimptomatică se manifestă cu un tablou nespecific pentru o perioadă lungă de timp, fiind dificil de diferențiat de alte patologii hepatice. [14] Astfel, fenotipul hepatic al BW se caracterizează printr-o varietate clinică largă: formă asimptomatică (creșterea transaminazelor, hepatomegalie și/sau splenomegalie izolată), boală cronică hepatică (BCH, steatoză hepatică/ steatohepatită, hepatită acută non-virală, hepatită cronică cu elemente similare hepatitei autoimune, ciroză hepatică compensată sau decompensată) și insuficiență hepatică acută (IHA) - insuficiență hepatică acută clasică Wilsoniană, IHA fără profil clasic, insuficiență hepatică acută pe cronică (IHAC). [63]

Cercetările pe un grup de 55 de pacienți din România, au evidențiat că 25,4% dintre pacienți prezentau boala asimptomatică, 52,8% prezentau BCH și 21,8% prezentau insuficiență hepatică acută [33]. Cercetările din țara noastră au relevat că vârsta medie la diagnostic a fost de $20,0 \pm$

1,25 ani (intervalul fiind între 9-38 ani); durata de stabilire a diagnosticului variază de la 6 la 36 de luni; 52,5% dintre pacienți au prezentat leziuni hepatice ca simptom clinic inițial, iar la 72,5% dintre pacienți au fost determinate manifestări hepatice precum ciroză hepatică, steatoză, hepatomegalie, insuficiență hepatică [79, 84].

Majoritatea pacienților cu simptome neurologice pot avea un anumit grad de afectare a ficatului la debutul clinic. Durata de timp de la apariția simptomelor până la stabilirea diagnosticului este de 2-3 ori mai mare la pacienții cu un fenotip neurologic decât la cei cu leziuni hepatice (44,4 luni față de 14,4 luni) [85], ceea ce denotă că simptomele neurologice pot fi subtile și ușor omise de către pacient și specialist, în timp ce evoluția rapid progresivă a bolii la pacienții cu manifestări hepatice conduce la inițierea evaluării paraclinice cu identificarea modificărilor specifice BW.

Confirmarea diagnosticului nu trebuie să excludă coexistența altor boli hepatice, iar abordarea complexă și sistematică a pacientului previne întârzierea diagnosticului, apariția de leziuni ireversibile cu insuficiență de organ și administrarea de terapii ineficiente. [2] Vigilența redusă în cazuri clinice speciale poate duce la mai multe situații. În primul rând, prezența simultană a unei alte boli poate întârzia diagnosticul de BW, cu afectare progresivă a ficatului. În al doilea rând, boala hepatică concomitentă netratată ținând seama poate duce la agravarea leziunilor în ciuda tratamentului adecvat cu chelatori pentru BW. În al treilea rând, pacientul cu BW poate fi supradozat cu agenți chelatori care poate dezvolta deficit secundar de cupru și diferite efecte secundare, în timp ce boala concomitentă rămâne nerecunoscută [17, 86].

În Republica Moldova, nu există o statistică oficială a manifestărilor hepatice în BW. Însă sunt studii mici care evidențiază prezența leziunilor hepatice în $72,5 \pm 7,06\%$ (29/40 pacienți), reprezentată de ciroză hepatică, steatoză hepatică, hepatomegalie, splenomegalie și insuficiență hepatică. Ca manifestare primară, fenotipul hepatic a fost întâlnit la $52,5 \pm 7,89\%$ (21/40 pacienți). [87, 88]

Forma acută a BW afectează în mod predominant copiii sau adulții tineri și se poate dezvolta ca hepatită acută non-virală, IHAC sau IHA. Simptomele comune la copii sunt adesea nespecifice, variind de la oboseală, anorexie, greață, vărsături și scădere în greutate până la dureri abdominale și icter. Icterul este tipic mai mult pentru decompensarea BCH sau din cauza hemolizei intravasculare asociate cu insuficiența hepatică acută clasică Wilsoniană. [77, 89] Hepatita acută Wilsoniană este mai frecventă la femeile cu un raport femeie-bărbați 2:1 în unele serii și chiar mai mare în altele, posibil datorită factorilor hormonal. [90]

Tabelul 1. Diagnosticul diferențial între tipurile de IHA asociate cu boala Wilson [91, 92]

IHA clasică Wilsoniană	IHA fără profil clasic	IHA pe cronică
Icter	Icter	În prezența unei BCH avansate
Anemie hemolitică Coombs negativă moderat – severă	Coagulopatie	Indusă de infecții recurente, hipotensiune, stoparea terapiei specifice, agravarea BW
Fosfataza alcalină scăzută	Encefalopatie hepatică	
Citoliză minimal – moderată		
Coagulopatie		
Encefalopatie hepatică		
Leziune tubulară acută cu insuficiență renală acută		

Leziunea hepatică acută este o afecțiune în care pacienții dezvoltă coagulopatie, fără alterarea conștiinței, în timp ce în IHA se dezvoltă atât coagulopatie, cât și alterarea conștiinței. Dhawan și colegii [93] au raportat că 2 din 15 pacienți care au decedat au avut leziune hepatică acută, ceea ce subliniază necesitatea de a identifica în stadiu incipient fără encefalopatie și de a iniția procedurile pentru transplant hepatic (TH). Orice tip de IHA este o urgență medicală și este esențială să fie diferențiate (tabelul 1), deoarece algoritmul de îngrijire și de tratament diferă. Stabilirea diagnosticului de IHA asociată cu BW este o adevărată provocare medicală din cauza rezultatelor paraclinice incerte, timp limitat, precum și absența de criterii sensibile și specifice pentru diagnosticarea rapidă. [94] IHA asociată cu BW reprezintă aproximativ 6-12% din toate cazurile trimise la TH urgent, care reprezintă adesea singura opțiune de terapie [2].

Hepatita cronică poate evolua sub masca de ficat steatozic non-alcoolic sau hepatită autoimună [95]. Fiind caracterizată printr-un proces inflamator activ, poate evolua în timp spre fibroză avansată cu impact negativ asupra prognosticului pacientului. Evoluția clinică este dificil de diferențiat de cea observată în hepatitele cronice de alte cauze, iar rezultatele biochimice nespecifice asociate cu modificări la limită ale metabolismului Cu pot duce la un diagnostic întârziat. [2, 4]

Steatoza hepatică și BW. Studiile comparative, între steatoza metabolică și cea secundară BW, au arătat că severitatea steatozei hepatice crește odată cu cantitatea de Cu din țesutul hepatic, respectiv steatoza hepatică în BW nu este indusă de condițiile metabolice asociate, ci direct de acumularea de Cu, deși nu au fost excluse și implicarea dereglărilor metabolice [96]. Un studiu

recent pe 98 de pacienți caucazieni cu BW, a evidențiat implicarea alelei G a polimorfismului genetic din rs738409 în domeniul fosfolipazei de tip patatină care conține 3 gene (PNPLA3) în dezvoltarea steatozei hepatice asociate cu BW, ca predictor independent al steatozei de grad moderat – înalt [97].

Hepatită autoimună și BW. Unii pacienți cu BW pot prezenta criterii de diagnostic pozitive pentru hepatită autoimună de tip 1, cum ar fi citoliză, anticorpi anti-nucleari (ANA) pozitivi și/sau anticorpi antimușchi netezi (ASMA), precum și modificări histologice asemănătoare, însă, în comparație cu pacienții cu hepatită autoimună, răspunsul la tratamentul cu corticosteroizi este slab. Apariția autoanticorpilor nu este cunoscută, posibil ca o consecință a necrozei hepatocitelor sau ca o boală concomitentă, dar o astfel de asociere întârzie de obicei diagnosticul de BW. Coexistența BW și hepatită autoimună este rară, dar la necesitate se recomandă terapia combinată cu prednisolon și D-penicilamină. [98]

Diagnosticul diferențial între bolile hepatice colestatice și BW reprezintă o adevărată provocare datorită asemănărilor clinice și de laborator. Se știe că sindromul colestatic, în special colangita sclerozantă primară, se poate manifesta cu acumulare sistemică secundară de Cu, asociată cu modificări ale parametrilor metabolismului lui. Este important de menționat că în BW, nivelul de Cp este semnificativ redus în comparație cu bolile colestatice (6 vs. 16 mg/dL), Cu urinar în 24 h este mult mai crescut (322,3 vs. 74,5 μg/zi) și după inițierea terapiei cu chelatori, se observă o scădere a conținutului de Cu hepatic și nivelul Cp poate scădea mai mult. [99]

Ciroza hepatică în BW. Meta-analiza lui Roberts E.A. și coautorii, care au investigat datele din 12 studii a estimat că prevalența cirozei a fost de 34% la pacienții cu BW [100]. Simptomele clinice ale BW, în special manifestările hepatice, sunt adesea prezente în prima decadă de viață, iar cele mai multe apar între 5-35 de ani. Ca rezultat, BW cauzează frecvent ciroză la copii și adulți tineri. Iar în unele regiuni, în special Iran și India, BW s-a dovedit a fi cauza principală a cirozei la copii [101]. În general, ciroza este caracterizată prin hipertensiune portală și disfuncție hepatică, ducând la varice esofagiene, splenomegalie, ascită și leziuni hepatice [11]. Pacienții cu BCH avansată trebuie să fie evaluați frecvent pentru identificarea precoce a decompensării [63], dar și pentru procese neoplazice hepatice [102]. Într-o cohortă mare austriacă, ce a inclus 229 de pacienți, s-a observat că odată cu întârzierea diagnosticului s-a redus și rata de supraviețuire, iar prezența cirozei la momentul diagnosticului a fost cel mai bun predictor al mortalității. De asemenea, ciroza a fost prezentă în 47% din cazuri (66/140 pacienți) cu fenotip hepatic, în 34% din cazuri (21/61 pacienți) cu fenotip neurologic, și 9% din cazuri (2/23 pacienți) la cei asimptomatici. [103]

Tumori maligne hepatobiliare în BW sunt identificate mai rar, iar riscul de dezvoltare nu este clar definit, chiar și la pacienții cirofici. [102] Un studiu de cohortă retrospectiv olandez a

constatat că incidența anuală a carcinomului hepatocelular în BW este de 0,09% la toți pacienții și 0,14% la cei cu ciroză, prin urmare supravegherea în dinamică a cancerului la pacienții cu BW nu este recomandată, cu excepția cazului în care există factori de risc suplimentari (de exemplu, anamnezic agravat, hepatita virală, consum de alcool) [104].

Majoritatea pacienților asimptomatici sunt identificați prin screening-ul familial, ce permite inițierea precoce a tratamentului. Datorită conștientizării acestei boli în practica medicală și a efectuării de rutină a testelor funcționale hepatice a crescut rata de diagnosticare a BW, la etapa asimptomatică [33]. Semne clinice de boală hepatică manifestă la acești pacienți nu sunt observate, uneori hepatomegalie ușoară și/sau splenomegalie izolată pot fi unicele constatări la examenul fizic, însă la testarea paraclinică pot fi prezente unele anomalii ale testelor hepatice. Până la 11% dintre pacienții asimptomatici aveau BCH avansată nediagnosticat anterior [105].

Pacienții asimptomatici reprezintă o adevărată provocare în diagnosticarea BW, deoarece pot prezenta modificări asimptomatice ale testelor hepatice, dar cu valori normale ale unor teste ale metabolismului Cu, ceea ce reduce acuratețea scorului Leipzig. Diagnosticul de BW la pacienții asimptomatici cu modificări minime ale metabolismului Cu sau la pacienții supraponderali/obezi cu steatoză hepatică trebuie reevaluat prin examen histologic și teste genetice, pentru a exclude un fenotip ușor sau o intervenție a genei modificatoare care reglează metabolismul Cu în prezența unei proteine defectuoase ATP7B. [96]

1.3.2. Fenotipul neuro-psihiatric

După manifestările hepatice, cele neurologice sunt cel mai frecvente simptome clinice în BW. Fenotipul neurologic ca prezentare inițială apare în 18-68% de pacienți (în dependență de centrul de referință) cu media vârstei de debut 20-30 ani. La adulți cu debut neurologic, afectarea ficatului, este de obicei prezentă simptomatic sau asimptomatic. [63] Simptomele neurologice incipiente sunt de obicei subtile și nespecifice. Frecvent fiind raportat dificultăți de concentrare, lipsa de coordonare, modificări ale scrisului, vorbire neclară cu salivare; deseori semnele clinice sunt catalogate drept stări de somatizare sau psihogene. La pacienții netratați evoluția este progresivă cu agravarea statutului neurologic. [106]

Date statistice exacte ale leziunilor neurologice în BW nu au fost înregistrate în țara noastră, însă unele cercetări raportează prezența afectării neurologice în 95% (38/40 pacienți). Astfel, la debutul bolii au fost înregistrate următoarele simptome: tremorul ($72,5 \pm 7,06\%$, 29/40 pacienți), dizartrie ($67,5 \pm 7,41\%$, 27/40 pacienți), distonie ($57,5 \pm 7,82\%$, 23/40 pacienți) și parkinsonismul ($25,0 \pm 6,85\%$, 10/40 pacienți), însă o dată cu progresia maladiei au fost relevante și alte semne clinice, precum coreea, atetozis, mioclonus, convulsii, ataxia, semne piramidale, hipersalivația și leziuni oculare. [87, 88]

Parkinsonismul este raportat la 19-62% dintre pacienții cu BW. Acest sindrom include rigiditate, tremor de repaus, bradikinezie și dezechilibru postural, simptomele fiind deseori asimetrice. [107]. Din punct de vedere patologic, dezvoltarea parkinsonismului la pacienții cu BW este legată de acumularea de Cu și apariția de leziuni la nivelul ganglionilor bazali și a substanței negri. Din 364 de participanți diagnosticați cu BW, 127 au raportat simptome de parkinsonism. La RMN, din cei 364 de participanți, 81.9% prezentau defecte la putamen, 32.3% la nucleul caudat și 26.4% la nivelul punții [108].

Tremorul este cel mai notabil simptom ce apare până la 55% dintre pacienți la debut și este prezent aproximativ în 90% dintre pacienți pe durata bolii. El este definit ca o mișcare involuntară, ritmică și oscilativă a unei părți a corpului, de obicei persistent și vizibil, cu o frecvență de 4-8 Hz cu amplitudine variabilă [109]. În BW, se distinge mai multe tipuri de tremor: postural, de tip ”bătăi de aripi” și de repaus. De obicei, începe într-un singur membru și se poate răspândi în cele din urmă la întregul corp. Un alt tip comun de tremor observat în BW este tremorul esențial [110]. Un studiu a găsit asocieri între tremor și atrofia cerebeloasă, precum și între ataxie cu leziuni la nivelul trunchiului cerebral, cerebel și cortexul cerebral. Studiul a mai constatat că pacienții cu vârste cuprinse între 11 și 20 de ani la începutul bolii au avut un risc mai mare de a forma leziuni talamice. În schimb, pacienții între 21 și 31 de ani se așteaptă mai mult să aibă leziuni cerebeloase [111].

Ataxia descrie semnele și simptomele rezultate din afectarea cerebelului, prezent în 30% cazuri de BW. Ea implică anomalii ale posturii, mersului, disdiadocochinezie, dismetrie, hipotonie, anomalii oculomotorii, tremor și tulburări de vorbire [112]. Ataxia cerebeloasă, în mod obișnuit se asociază cu alte manifestări neurologice [113]. În cazul când este izolată, este necesar de efectuat diagnostic diferențial cu alte tulburări neuro-degenerative [114].

Distonia se caracterizează prin contracții musculare involuntare susținut sau intermitent ce produc mișcări repetitive și posturi anormale. În BW, ea variază de la forme ușoare până la cele severe, manifestându-se cu simptome focale (torticolis, blefarospasm, risus sardonicus, disfonie, disartrie și disfagie), segmentare, multifocale sau generalizate. [115] Distonia se corelează cu anomaliile imagistice văzute pe semnalul RMN în putamen [108].

Coreoatetoza este prezentă la 6 -16% dintre pacienții cu BW. Coreea se caracterizează prin mișcări asemănătoare dansului, cu contracții rapide și imprevizibile, de obicei în membrele distale, însă pot fi implicate și membrele proximale, fața și trunchiul. Atetoza se definește prin mișcări lente, involuntare care afectează extremitățile distale și alte părți ale corpului, cum ar fi fața.

Termenul coreoatetoza este folosită, atunci când mișcările coreice tipice coexistă cu atetoza. [114]
S-a observat că din 364 de pacienți cu BW, doar 8 pacienți prezentau coreoatetoză asociată [107].

Dizartria este aparent cel mai frecvent simptom neurologic al BW. Se manifestă la majoritatea pacienților cu fenotip neurologic și este cauzat de deteriorarea ganglionilor bazali, nucleii cerebeloși, tracturile lor și cele cortico-bulbare. [107] Dizartria poate fi clasificată în tipuri specifice, cum ar fi mixtă neclasificată, ataxică, distonică și hipokinetică. Fiecare tip prezintă simptome unice asociate cu structurile neurologice implicate. Dizartria mixtă de tip neclasificată se prezintă adesea cu manifestări distonice, hipokinetice și ataxie cerebeloasă. Dizartria de tip ataxic prezintă simptome cerebeloase, în timp ce tipurile distonice și hipokinetice se asociază cu dizabilități de mișcare. [116]

Disfagia apare la aproximativ 18% dintre pacienții cu BW și la 50% dintre cei cu simptome neurologice. Poate fi afectat orice fază a actului de deglutiție - orală, mestecarea, tranzitul bucal și înghițirea în sine. Ea poate fi prezentă ca rezultat al deteriorării tonusului muscular, necoordonare și slăbiciune a mușchilor de deglutiție. Deoarece disfagia poate duce la aspirație, pneumonie și malnutriție, este necesar monitorizarea regulată a pacienților cu forma neurologică a BW. [114, 116]

Sialoreea se definește ca un flux involuntar de salivă din gură, ce afectează aproximativ 70% din pacienții cu neuro-BW. De foarte multe ori este consecința disfagiei și/sau incapacitatea de a reține saliva în interiorul gurii din cauza distoniei oro-faciale la pacienții cu „risus sardonicus”.

Alte simptome neurologice sunt cefaleea, ticurile, disfuncții oculomotorii și gustative, neuropatie, epilepsia, hiperreflexia, convulsii, sindromul picioarelor neliniștite, tulburări de somn, mioclonus. Totuși acestea manifestări, cu excepția epilepsiei, care are o frecvență de 10 ori mai mare în BW comparativ cu populația generală, sunt rare și nespecifice pentru această maladie. [114]

Manifestările psihiatrice, de obicei, apar în a doua decadă a vieții și reprezintă o parte semnificativă a prezentării clinice în BW și se pot prezenta în orice moment al bolii; înainte (20%), concomitent cu (30-64%) sau după diagnosticul și inițierea tratamentului. Simptomele care apar izolate, fără implicare hepatică sau neurologică evidentă pot duce la diagnosticare greșită. [116] Totuși, cel mai frecvent se dezvoltă secundar deteriorării neurologice și tind să decurgă neobservate în stadiile incipiente, cauzând întârzierea diagnosticului. În adolescență, se observă des modificări de comportament, instabilitate emoțională, iritabilitate și performanță academică joasă, în timp ce la adulți pot fi întâlnite tulburări de personalitate, de somn și cognitive, tulburări bipolare (depresie, manie), anxietate, hipersexualitate, psihoză și schizofrenie. Alte simptome

descrise includ: hiperactivitate, tulburări delirante, nevroze isterice, comportament suicidal, halucinații, abuz de alcool, catatonie, agitație, agresiune. [118]

1.3.3. Leziunile oculare în BW

Inelul Kayser-Fleischer (IKF) se întâlnește la 95 % de pacienți cu fenotip neurologic, 50 % la cei cu afectare hepatică, 20-30% la cei presimptomatici/asimptomatici [2, 119]. El constă dintr-un depozit de Cu sub formă de inel în membrana lui Descemet, la linia lui Schwalbe. La examenul cu lampa în fantă, IKF apare ca un inel cu o culoare maro-aurie, verde-aurie, verde-galben, galben-auriu, bronz sau maro-roșcat în zona limbică a corneei. În patogenia BW pot fi implicate toate structurile oculare, inclusiv și mișcarea globului ocular, astfel pot fi identificate și alte manifestări, precum: cataracta de tip floarea soarelui, reducerea mobilității ochiului, nictalopie, neurita optică, strabism, apraxia deschiderii pleoapelor, pierderea răspunsului de acomodare. [119]

Manifestările sistemice adiționale sunt determinate de prezența anemiei hemolitice Coombs-negative asociată adeseori cu insuficiență hepatică acută și afectarea altor organe (anexa 5). Însă, de obicei, sunt asociate cu fenotipurile prezentate, rar întâlnite ca manifestare izolată. [63, 106, 120]

1.3.4. Clasificarea fenotipică în BW

Un grup de lucru al celei de-a 8-a întâlniri internaționale din Leipzig/Germania (aprilie, 2001) privind BW și boala Menkes, au propus clasificarea pacienților simptomatici corespunzător organului predominant implicat și a tabloului clinic prezentat (tabelul 2). [89]

Tabelul 2. Clasificarea fenotipică în boala Wilson [89]

Prezentare hepatică (H) – necesită excluderea simptomelor neurologice prin efectuarea examenului clinic neurologic detaliat la momentul diagnosticului.		
H1	Hepatită acută Wilsoniană	Debut acut cu icter la subiecții aparent sănătoși anterior, fie din cauza hepatitei, fie din cauza anemiei hemolitice Coombs-negative sau asocierea ambelor. Poate progresa până la insuficiență hepatică acută ce necesită transplant hepatic de urgență.
H2	Hepatită cronică Wilsoniană	Orice manifestare al bolii hepatice cronice, cu sau fără simptome. Poate progresa până la sau chiar să se prezinte ca ciroză decompensată. Diagnosticul se bazează pe evaluări standarde: biochimice și/sau radiologice sau biopsie hepatică.
Prezentare neurologică (N) – pacienții cu simptome neurologice sau/și psihiatrice prezente la momentul diagnosticului		

N1	Asociată cu boală hepatică simptomatică	De obicei, pacienții au ciroză hepatică la momentul diagnosticării afectării neurologice. Boala hepatică cronică poate preceda apariția simptomelor neurologice de mai mulți ani sau poate fi diagnosticată pe parcursul evaluării clinice al pacientului cu simptome neurologice.
N2	nu este asociată cu boală hepatică simptomatică	Documentarea absenței unei boli hepatice marcate (steatoză/fibroză poate fi prezentă în orice timp) necesită o biopsie hepatică.
Nx	prezența sau absența bolii hepatice nu este investigată	
Alte prezentări clinice (Others - O)		

1.4. Identificarea corelației fenotip –genotip ale bolii Wilson

BW se caracterizează printr-o varietate mutațională înaltă și un tablou clinic imprevizibil, iar în pofida răspunsului la tratament și a transmiterii autozomal-recesive, nu se cunoaște la moment mecanismul diversității fenotipice. Câteva studii au încercat să găsească o corelație între genotip și fenotipul clinic, însă studiile recente pe un număr mare de pacienți nu au identificat nici o asociere. [123] Totuși, unele cercetări sugerează o posibilă interrelație între vârsta de debut sau tipul prezentării clinice și un genotip specific [7].

Una din cele mai puternice corelații genotip-fenotip în BW este că mutațiile ce cauzează pierderea funcției proteinei ATP7B, mai ales mutațiile de tip stop codon prematur (cu sinteza unei proteine anormal de scurtă și instabilă) și cele în regiunile importante din punct de vedere funcțional, se asociază cu o evoluție severă, un debut precoce și un fenotip predominant hepatic, în timp ce mutațiile ce păstrează parțial funcția de transport al Cu se prezintă cu o evoluție mai ușoară. Mutațiile punctiforme în regiunile mai puțin importante ale genei sunt asociate cu un debut tardiv și un fenotip predominant neurologic sau psihiatric [54].

Kalita J. și colegii [124], au observat că majoritatea pacienților cu mutația *p.R778L* se prezintă cu un fenotip hepatic și un debut mai precoce al bolii, în timp ce pacienții cu substituția *p.H1069Q* se prezintă cu un fenotip neurologic și un debut mai tardiv. IKF sunt mai frecvent întâlnite la momentul diagnosticului la pacienții homozigoți *p.H1069Q* decât la cei heterozigoți compuși.

Un studiu realizat de Cocos R. și colegii săi [7], a 2 familii mari din regiunea montană a României, ce numără 50 membri - 7 afectați de BW, a raportat o concordanță intra-familială ridicată a pacienților cu BW, cu o predictibilitate mai mare pentru prezentarea neurologică cu același set de caracteristici clinice la momentul diagnosticului și vârstă identică la debutul bolii; astfel de date fiind observate și de alți cercetători. De asemenea, coexistența mutațiilor de tip

substituție *p.H1069Q* și *frameshift p.M769H-fs* la pacienții heterozigoți compuși, a fost asociată cu o vârstă mai mică la debut, date ce coincid cu rapoartele anterioare privind vârstele de debut pentru pacienții homozigoți/heterozigoți cu *p.H1069Q*. Un studiu familial realizat de Chabik G. și colegii [4], a evidențiat că deși variază tipul de prezentare clinică, frații se prezintă cu același fenotip sau vârstă la debutul bolii, în timp ce cercetarea efectuată de Czlonkowska A. și colegii [9], nu a relevat nici o corelație genotip-fenotip la frații homozigoți/heterozigoți compuși cu aceeași mutație sau gemenii monoziigoți, studiile sugerând implicarea factorilor genetici și de mediu care ar putea influența fenotipul.

Mihaylova V. și colegii [125], în cercetarea lor ce include 123 pacienți cu BW din Bulgaria, au observat lipsa unei corelații la pacienții cu mutația *p.H1069Q* de tip homozigot/ heterozigot compus sau pacienții fără această mutație cu fenotipul neurologic. Mutația *p.H1069Q* homozigotă a fost asociată cu fenotipul hepatic mai frecvent și prezența semnificativ mai rară a IKF decât cu mutația *p.H1069Q* heterozigotă compusă și alte mutații. În schimb, pacienții cu mutația *p.R616Q*, fie homozigot, fie heterozigot compus au avut semnificativ mai frecvent manifestări neurologice și un nivel mai mare de Cp decât la homozigoții cu *p.H1069Q* și pacienții fără *p.H1069Q*; la toți subiecții cu mutația *p.R616Q* fiind depistat IKF.

Usta J. și colegii [74], evaluând o familie libaneză de 76 membri, în care este prezentă consangvinizarea, la 9 membri au diagnosticat BW. Toți 9 pacienți au avut mutația *c.2299insC*, 5 fiind homozigoți, iar 4 - heterozigoți compuși cu *p.Ala1003Thr*. Studiul a raportat o corelație la pacienții homozigoți *c.2299insC* cu boala hepatică, iar la cei heterozigoți compuși *c.2299insC/p.Ala1003Thr* cu boală neurologică.

Rezultatele unei cercetări chineze efectuate de Cheng N și colegii săi [11], ce include 1222 pacienți cu BW a demonstrat că mutația *p.Arg778Leu* se corelează cu un debut la o vârstă mai tânără și cu niveluri mai scăzute de Cp și Cu seric. Alte variante *p.Arg919Gly* și *p.Thr935Met* au fost asociate cu niveluri mai mari de Cp, varianta *p.Arg919Gly* fiind corelată cu simptome neurologice, în timp ce *p.Thr935Met* cu manifestări neurologice și viscerale combinate. Cu cât impactul mutației este mai mare asupra structurii și funcției proteinei ATP7B, cu atât maladia debutează mai precoce și cu un nivel redus de Cp serică.

Un raport realizat de Takeshita Y. și colegii [126], al 2 familii neînrudite din Japonia, în care membrii de familie cu BW aveau mutații similare ale genei ATP7B, a relevat că toți membrii din aceeași familie s-au prezentat cu fenotipuri diferite și debut al bolii la vârste diferite. Astfel, a fost sugerat că ar putea exista o diferență în dominantă alelică (în mutațiile identificate), deoarece toți pacienții din ambele familii s-au dovedit a fi heterozigoți compuși. Acest lucru a fost confirmat și

de Sapuppo A. și colegii [127], în cazul a 2 surori cu BW, heterozigote compuse cu genotip similar (*c.3207C->A (p.H1069Q) / c.3904-2A->G*), care s-au prezentat cu fenotipuri diferite atât la debut, cât și pe parcursul bolii, fiind presupuși mai mulți factori ce ar schimba evoluția bolii (inițierea terapiei la faza asimptomatică, diferențe de stil de viață, intervenția posibilă a genelor modificatoare al metabolismului Cu). Yahata S. și colegii [10], au examinat 11 familii japoneze, ce include 23 de frați diagnosticați cu BW și au raportat că în 5 familii boala a decurs cu același fenotip, în timp ce în celelalte 6 familii cu fenotipuri diferite.

Cercetare efectuată în India de Santosh S. și colegii [128], a investigat impactul a 4 mutații diferite la membrii a 4 familii neînrudite (>1 membru afectat de BW), pacienții fiind evaluați în vederea identificării unor corelații între genotip (tipul mutației, homozigot/heterozigot compus) și fenotip (prezentarea clinică, vârsta debutului bolii/ vârsta diagnosticării, nivelul seric al Cp și Cu urinar în 24h). Rezultatele cercetării au evocat o concordanță puternică genotip-fenotip între membrii aceleași familii, cu excepția a 2 diferențe fenotipice minore între membrii a 2 familii, acest lucru fiind explicat prin evoluția bolii netratate de lungă durată, care ar putea fi un factor de confuzie în stabilirea corelațiilor.

Astfel, polimorfismul genetic, variante patogene unice, mecanisme mutaționale atipice, prezența heterozigoților compuși, raritatea bolii, varietate clinică, factorii epigenetici, precum și caracteristicile socio-demografice (sexul, rasa și vârsta) complică procesul de asociere a unei variante genetice cu un fenotip anume. Eforturile de a identifica careva interrelații genotip-fenotip, au evidențiat rezultate contradictorii, deoarece mecanismele heterogenității BW nu sunt pe deplin elucidate, în special datorită efectelor imprevizibile ale mutațiilor asupra structurii și funcționalității proteinei ATP7B [54].

1.4.1. Mecanisme epigenetice

Este stabilit, că acumularea de Cu la pacienții cu BW, se datorează mutației la nivelul genei ATP7B care codifică proteina ATP7B ce transportă Cu. Totuși, se sugerează că prezența altor factori, precum mecanismele epigenetice - ce acționează la interfața dintre genom și factorii de mediu și genele modificatoare - ar putea fi implicate în modificarea expresiei genei Wilson, respectiv, în varietatea tabloului clinic și evoluția bolii. În plus, factori ai mediului, cum ar fi dieta, stilul de viață și expunerea la toxine, atât în uter, cât și postnatal, pot afecta expresia genelor prin mecanisme epigenetice. [123]

Mecanismele epigenetice includ modificări reversibile ale ADN-ului sau a histonelor, în așa mod afectează expresia genelor fără a modifica secvența ADN. Expresia genelor este reglată la diferite niveluri, inclusiv la etapa de remodelare a cromatinei, care este compusă din ADN,

histone și proteine non-histone. Remodelarea cromatinei se inițiază odată cu metilarea ADN-ului, prin adăugarea de grupări metil (H_3C) la ADN de la donatori de metil - betaină, colină, folați și metionină. Mulți donatori de metil și alte structuri implicate în metabolismul donatorilor de metil sunt nutrienți esențiali, respectiv, trebuie să fie obținuți prin alimente. Metilarea ADN-ului necesită un aport suficient de donatori de metil, cum ar fi metionina, iar modificările care stau la baza metabolismului ei pot afecta metilarea ADN-ului și, în cele din urmă, progresia bolii. [129]

Mecanismele majore ce implică modificări ale histonelor, cum ar fi acetilarea, metilarea, fosforilarea, SUMO-ilarea, ubiquitinarea și ribozilarea, afectează indirect expresia genelor. Acestea sunt niște mecanisme celulare complexe ce induc modificări în funcția proteică, în conformația cromatinei și expresiei genelor, de asemenea pot stimula inactivarea/degradarea proteinelor și iniția apoptoza celulară. Alt treilea mecanism este reprezentat de acțiunea ARN-urilor necodificatoare. MicroARN-urile cresc degradarea ARN-ului mesager necesar în procesul de transcripție a genei și sinteză a proteinei, astfel afectând expresia genei prin inducerea „la tăcere”. ARN-urile lungi influențează expresia genelor prin interacțiuni cu proteinele care modifică cromatina, reglând procesul de translație și stabilitatea lor. Totuși, aceste mecanisme urmează a fi studiate în BW. [130]

Un interes aparte, îl prezintă interacțiunea dintre mitocondrii și epigenom. Mitocondriile sunt mai susceptibile la deteriorare prin exces de Cu comparativ cu alte compartimente celulare, iar la pacienții cu BW morfologia lor este modificată atât în stadiile incipiente cât și în cele tardive. Cupru inhibă enzimele cheie din mitocondrii, astfel perturbând producerea metaboliților derivați din mitocondrii ce sunt implicați în reglarea epigenetică. De asemenea, mitocondriile sunt un loc major de producție al speciilor reactive de oxigen, care în concentrații obișnuite au rol de semnalizare, dar la creșterea concentrației intracelulare pot induce oxidarea ADN-ului, lipidelor și proteinelor mitocondriale, cu degradarea mitocondriilor și provocarea de modificări posttranslaționale (conformație, activitate, localizare) ale proteinelor celulare. [123, 130]

Genele modificatoare sunt gene care afectează expresia unei alte gene localizate în alt locus sau expresia fenotipică a altei gene. Se cunosc astfel de gene ce ar putea influența evoluția BW. Astfel rolul genelor APOE (apolipoproteina E), COOMD1 (copper metabolism domain-containing 1), ATOX1 (human homologue antioxidant 1 copper chaperone) și HFE (hemochromatosis) nu a fost confirmat în studii mari. De asemenea, sunt necesare cercetări adiționale pentru a demonstra implicarea genelor ATP7A (ATPase copper transporting alpha); DMT1 (divalent metal transporter 1), PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene), PRNP (Prion Protein), XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), ESD (esterase D), INO80 (INO80 complex subunit), MTHFR (5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase) în patogeniza BW. [123]

Modificările epigenetice care sunt cauzate de factorii de mediu (de exemplu, dieta, exercițiile fizice, stresul și toxinele) pot agrava schimbările induse de excesul de Cu, astfel modificând tabloul clinic și evoluția bolii, iar ameliorarea acestor factori oferă oportunitatea de a atenua efectul toxic al Cu la pacienții cu BW. Kieffer D. și Medici V. [129] au propus ipoteza multi-„hit” prin care Cu și stilul de viață pot modifica fenotipul în BW. În cazul mamei însărcinate cu un făt homozigot cu mutație ATP7B, prima lovitură este cauzată de expunerea la mediul toxic matern și anume dieta cu conținut înalt de fructoză, sedentarismul, stresul social și contactul cu diverse toxine. După nașterea copilului, urmează lovitura a doua, datorită mutației patogene ce determină acumularea Cu în organe cu apariția disfuncției mitocondriale și alterarea mecanismelor epigenetice de reglare ale expresiei genelor. Loviturile ulterioare sunt provocate de expunerea la factorii de mediu toxici proprii, de exemplu dieta cu conținut înalt de fructoză și lipide, sedentarismul, stresul social și contactul cu diverse toxine. Acești factori agravează leziunile mitocondriale preexistente și înrăutățește mecanismele epigenetice de reglare ale expresiei genelor. Într-un final, boala debutează precoce sau/și se prezintă cu o evoluție severă. Totuși aceste sugestii necesită a fi studiate și confirmate rolul lor în progresia BW. [129]

Interrelația strânsă dintre acumularea de Cu, metabolismul metioninei, funcția mitocondrială și reglarea expresiei genelor, cu dovezi puternice din studiile pe modele de animale, indică faptul că fenomenele epigenetice contribuie cel mai probabil la diversitatea fenotipică în BW, iar analizarea lor sunt esențiale pentru înțelegerea multiplilor factori care interacționează în bolile hepatice metabolice și complexe – inclusiv în BW [130]. Iar acestea lucruri, în asocieră cu o varietate mutațională înaltă fac dificilă evidențierea unor interrelații bine definite dintre genotip-fenotip.

1.5. Provocări de diagnostic în boala Wilson

Conform recomandărilor ghidurilor internaționale [2, 131-134], BW trebuie să fie suspectată la orice persoană cu parametri hepatici modificați de etiologie necunoscută; cu tulburări de mișcare de cauză neidentificată; cu o patologie hepatică inexplicabilă în asocieră cu tulburări neurologice sau neuropsihiatrice sau în prezența unei anemii hemolitice Coombs – negativă cu origine neprecizată.

Diagnosticul definitiv poate fi stabilit doar prin efectuarea testelor specifice pentru BW, precum parametrii metabolismului Cu (Cp serică, Cu total seric și Cu urinar în 24h), evaluare oftalmologică, biopsie hepatică cu cuantificarea Cu în țesutul hepatic uscat și testul genetic pentru detectarea mutațiilor la nivelul genei Wilson. Nu există un test specific pentru diagnostic, dar este

necesar de a combina o serie de examinări, iar orice rezultat obținut trebuie examinat individualizat la pacient pentru a exclude și alte cauze ce pot mima BW (anexa 6). [2, 133, 134]

Ceruloplasmina serică este purtătorul principal de Cu în sânge, ce poate transporta până la 6 atomi de Cu (holo-Cp), însă poate circula în sânge și fără Cu (apo-Cp). De fapt este o proteină de fază acută, cu activitate de feroxidază, iar concentrația sa poate varia în funcție de starea de sănătate la momentul recoltării probelor, precum și în cazul unei altei boli hepatice sau sistemice. [1] Reducerea Cp nu reprezintă un marker 100% specific și sensibil pentru BW, iar modificările la limită deseori sunt considerate greșit un indicator de BW. Deși Cp serică nu este un parametru de diagnostic ideal, intervalele de referință specifice vârstei și limitele de diagnosticare trebuie utilizate întotdeauna. Utilizarea limitei inferioare a intervalului de referință standard pentru diagnosticarea bolii ar trebui descurajată, iar o valoare normală nu exclude această boală. [135] Nivelurile serice de Cp pot fi măsurate enzimatic sau prin imunotestări nefelometrice. Cu toate acestea, testele imunologice pot supraestima concentrațiile de Cp, deoarece nu fac deosebire între apo-Cp și holo-Cp [63]. În studiul efectuat de Dr. Mocanu N. și colegii, s-a observat că manifestările clinice specifice și nivelul scăzut de Cp în sânge nu sunt suficiente pentru a stabili diagnosticul de BW, iar absența variantelor patogenice la nivelul genei ATP7B la pacienții cu tablou clinic specific, prezența IKF și hipo-Cp-emie în sânge nu exclude prezența acestei tulburări [136].

Cu seric total. Deși BW este o tulburare sistemică de supraîncărcare cu Cu, concentrația de Cu seric este scăzută. Cu seric total include Cu încorporat în Cp și Cu liber care circulă în sânge. De obicei, acesta scade direct proporțional cu Cp din circulație. Factorii care nu sunt direct legați de cantitatea Cu în ser, dar adesea asociați de modificările nivelurilor de Cp, fac din Cu plasmatic un marker nesigur. Corelația pozitivă dintre Cu seric total și Cp serică poate să nu fie observată la pacienții cu IHA din cauza BW, unde Cu poate fi eliberat în cantități mari în sânge. De asemenea, corelația poate să nu existe atunci când apar erori analitice. [137]

Cu nelegat de Cp sau „cupru liber” este un parametru calculat conform unor formule (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) și valoarea lui depinde de metodele de măsurare atât a Cu seric total, cât și a Cp. Deși inițial a fost propus ca test de diagnostic, s-a demonstrat că Cu liber este mai util în monitorizarea farmacoterapiei decât în diagnosticul BW. [2, 134]

Excreția bazală a Cu urinar în 24h este crescută la majoritatea pacienților cu BW, reflectând eliberarea Cu liber în compartimentul plasmatic ca urmare a excreției biliare inadecvate. În mod convențional, nivelul de Cu urinar în 24h $> 1,6 \mu mol/zi$ la pacienții simptomatici împreună cu IKF

este considerat diagnostic cert de BW. Cu toate acestea, aproximativ 16% - 23% din pacienți au niveluri urinare de Cu în 24 h $<1,6 \mu\text{mol/zi}$ ($100 \mu\text{g/zi}$) la momentul diagnosticului. Creatinina urinară trebuie măsurată împreună cu Cu urinar pentru a evalua totalitatea urinei colectate. Testul nu este validat în caz de insuficiență renală sau afectare a funcției renale. [138]

Determinarea excreției urinare de Cu după administrare de D-penicilamină a fost considerat a fi un test de diagnostic util. Acesta a fost standardizat la populația pediatrică la care 500 mg de D-penicilamină au fost administrate oral la început și la 12 h mai târziu în timpul colectării de urină de 24h, indiferent de greutatea corporală. În comparație cu spectru de alte boli hepatice, inclusiv hepatita autoimună, colangita sclerozantă primară și IHA, a fost găsită o diferențiere clară când au fost excretate $>25 \mu\text{mol/24 h}$. [139] O reevaluare a acestui test la copii și adolescenți cu boală hepatică activă a reconfirmat valoarea în diagnosticul BW, dar nu este sigur pentru a exclude diagnosticul la rudele asimptomatice. Acest test nu este recomandat pentru diagnosticarea BW la adulți, deoarece nu sunt date exacte despre dozele adecvate și timpul potrivit de administrare. [2]

1.5.1. Biopsia hepatică și caracteristica histologică a bolii Wilson

Examenul histologic în BW este polimorf și nespecific, și doar corelarea datelor clinice și paraclinice garantează un diagnostic corect. Ca urmare a mutației, Cu nu este eliminat de bilă și se acumulează în cantități toxice în ficat. Acest lucru afectează funcția mitocondriilor și provoacă β -oxidarea acizilor grași, ducând la steatoză. Hepatocitul conține picături de grăsime de diferite dimensiuni, de la macro - la microvezicule, iar tabloul histologic se modifică odată cu progresia bolii (figura 2) [140]. În fazele inițiale se observă steatoza macroveziculară, odată cu evoluția bolii se pot determina caracteristici morfologice fie ale steatohepatitei, fie ale hepatitei cronice, ulterior aspectul histologic capătă asemănări cu hepatita autoimună sau virală, iar în final, poate fi detectată ciroza hepatică. [96]

Reieșind din modificările hepatice asemănătoare și altor patologii, cercetătorii Fanni D. și colegii [141], au evaluat 127 biopsii de la 43 pacienți cu BW identificând unele particularități histologice. Astfel, ca rezultat al depozitării toxice al Cu la nivelul hepatocitelor zona 1, în stadiile inițiale ale bolii se observă prezența steatozei preferențial periportal. Odată cu progresia bolii, are loc distribuirea treptată în zonele 2 și 3, iar în faza avansată se determină o steatoză difuză. Totuși, în cazul biopsiei unui copil cu BW, aceasta nu este întotdeauna astfel. De asemenea, balonizarea hepatocitelor a fost mereu localizată în zona periportală și niciodată observată în zona periterminală (zona 3), fapt ce reprezintă un semn morfologic de toxicitate a Cu stocat în aceasta zonă. Anterior, corpusculii Mallory-Denk au fost considerați o trăsătură tipică a BW, însă în

biopsiile examinate, numărul lor era mic (29/127 biopsii), fiind localizați difuz și preponderent în zonele periportale. Până în prezent, patogenia și semnificația clinică nu au fost încă explicată, dar conform unei ipoteze prezența lor la pacienții cu BW, relatează despre nivelul crescut al toxicității Cu intrahepatocitar, ceea ce duce la pliarea greșită a proteinelor și necroza celulară. [141]

Luând în considerație examenul morfologic nespecific a BW, sunt necesare instrumente noi ce ar permite identificarea Cu acumulat în ficat, în special în țările cu o economie medie/joasă. Colorația cu orceină a proteinei asociate cu Cu reprezintă un colorant histochimic util. Aceste proteine citoplasmatiche pe colorația de orceină au un aspect granular de culoare brun închis, asemănător Coca-Colei, localizate perinuclear. Totuși, granulele proteice pozitive pentru orceină pot fi observate și în afecțiunile colestatice cronice și nu sunt specifice pentru BW. [142] Identificarea Cu poate fi efectuată utilizând și coloranți, precum acid rubenic sau rodanina. Acidul rubenic colorează Cu elementar din citoplasmă în verzui-negru, în timp ce rodanina îi oferă o colorație granulară de la roșu până la roșu-portocaliu. [143]

Cuantificarea Cu în țesutul hepatic uscat reprezintă unul din testele specifice pentru confirmarea BW, iar un rezultat $> 4 \mu\text{mol/g}$ sau $\geq 250 \mu\text{g/g}$ în absența colestazei este considerat semnul distinctiv al bolii. Biopsiile pentru determinarea cantitativă a Cu ar trebui să fie amplasate într-un recipient fără conținut de Cu, iar livrare probei nu necesită precauții speciale, precum congelare. Având în vedere, distribuția neuniformă a Cu în ficat, cu diferențe evidente chiar și

Steatoza	Inflamația	Ultrastructura	
• predomină varianta macroveziculară • în tot lobul hepatic • prezentă în stadiile precoce ale bolii	• de obicei, distribuită în tot lobul; uneori predominant în hepatocite periportal • celule sunt predominant de tip limfocitar; uneori limfohistiocitar localizat portal, inclusiv focare de hepatită de interfață	• mitocondrii sunt măriți în volum, membrana interioară și exterioară separată, dilatații ale cristelor • lizozomi cu densitate electronică	
Nucleul	Corpusculi Mallory- Denk	Necroza	Ciroza
• nucleii hepatocitelor sunt glicogenați (în stadiile precoce) • nucleoplasma este dezorganizată	• deseori prezenți	• la începutul bolii, se observă necroză hepatocelulară focalizată	• de obicei, micronodulară sau mixtă

Figura 2. Caracteristicile histologice în boala Wilson

Adaptat după: Schroeder S.M. et al. Ann Transl Med. 2021 [140]

între zone învecinate, se recomandă de obținut din mai multe probe din diferite locații hepatice. Iar în asociere cu alte variabile de diagnosticare (Cu seric, Cp serică, Cu urinar în 24 h), pot fi evitate greșeli de diagnostic. [144] Deși este un test de diagnostic important, realizarea lui se recomandă în cazurile clinice incerte datorită complicațiilor ce pot apărea, costului asociat, precum și necesității de instrumente și aparate speciale. Iată, de ce se efectuează doar în centre specializate mari. [2, 134]

În Republica Moldova, precum și în țările vecine, acest test nu este disponibil.

1.5.2. Algoritmul diagnosticului genetic

La un pacient cu un diagnostic clinic bine definit de BW, analiza molecular-genetică nu este obligatorie și nu este o examinare de rutină. Însă în cazul unor rezultate biochimice incerte și persistența unei suspiciuni clinice, se recomandă efectuarea testului genetic. În plus, poate oferi informații necesare în ghidarea screening-ului rudelor, de asemenea cunoașterea statutului mutațional (heterozigot simplu sau compus, homozigot recesiv) poate fi util în aprecierea corelației genotip-fenotip în raport cu indicii demografici, clinici și paraclinici, precum și în noile tehnologii de tratament, de ex. terapia genică. [17]

Testarea genetică poate cuprinde mai multe faze. Până în prezent, 907 de variante diferite sunt incluse în Baza de Date a Mutațiilor Genetice Umane (*The Human Gene Mutation Database-HGMD*), dintre care doar 878 variante (96,8%) pot fi detectate prin secvențierea exonilor și intronilor. Exonii cu mutațiile cele mai frecvente sunt prioritizați în dependență de frecvența lor în populația locală, populația europeană fiind exonul 8 și 14. În cazul, când la secvențierea exonilor și a zonelor de limită intron/exon nu au fost depistat nici o modificare, se analizează promotorul prin secvențierea Sanger. În absența unui rezultat, se recomandă utilizarea metodei – amplificarea probei multiplex dependente de ligand (multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA) pentru evidențierea delețiilor/duplicațiilor. Dacă și la această etapă nu s-a depistat nici o mutație, se secvențiază gena ATP7B în totalitate, inclusiv regiunea netranslată 5' și 3' și intronii prin Secvențierea de Generație Următoare (Next Generation Sequencing - NGS). După se reevaluează tabloul clinic al bolnavului și dacă persistă suspiciunea de BW, se recomandă identificarea mutațiilor la nivelul altor gene implicate în patologia hepatică prin secvențierea întregului genom sau exom (whole-exome sequencing/ whole-genom sequencing - WES/WGS), astfel se exclud patologii ce pot mima BW. [145]

1.5.3. Rolul scorului Leipzig în diagnosticul bolii Wilson

Manifestările clinice ale BW sunt foarte diverse și nu întotdeauna simptomatice, în unele situații pot mima alte boli. În plus, niciunul dintre markerii de laborator care indică acumularea de Cu nu sunt 100% sensibili și specifici bolii, de unde necesitatea asocierii parametrilor clinici și paraclinici. De aceea, a fost propus un sistem de punctare pentru diagnosticul BW, care este un instrument important în examinarea unui pacient suspectat de BW și include date clinice, hematologice, biochimice, histologice și genetice; un scor ≥ 4 puncte stabilește diagnosticul (anexa 7). [2, 89] Clasificarea fenotipică poate ajuta la repartizarea pacienților în grupul corespunzător, dar scorul îi ghidează pe clinicieni asupra testelor necesare pentru stabilirea diagnosticului final.

În 2019, scorul Leipzig a fost modificat de consensul din India, fiind propus noul „scor Leipzig modificat” (anexa 8), care a fost validat la 70 de pacienți cu BW confirmat anterior. În acest nou scor, s-au acordat puncte suplimentare pentru istoricul familial ce sugerează prezența de BW. În plus, valoarea Cp serice a fost repartizată în mai multe subgrupuri. Datorită creșterii accesibilității testelor genetice, analiza molecular-genetică a fost păstrată, în special în situația când diagnosticul este dificil de stabilit prin teste clinice și biochimice. Testul cu D-penicilamină a fost exclus, ca rezultat al validării inadecvate. De asemenea, a fost eliminat din scor analiza de cuantificare a Cu în țesutul hepatic uscat, din cauza dezavantajelor metodice, precum și imposibilității efectuării acestuia. [132]

1.6. Impactul screening-ului familial în boala Wilson

Transmiterea și moștenirea. BW reprezintă o tulburare monogenică cu transmitere autosomal recesivă conform distribuției mendeliene. Acest lucru semnifică că, pentru a dezvolta boala este necesar de a moșteni 2 gene afectate, de la fiecare părinte câte una (*homozigot recesiv*), iar cel ce moștenește doar o genă cu mutație devine purtător sănătos sau *heterozigot simplu*, respectiv el nu va dezvolta boala, dar va transmite mutația genică copiilor săi. [2] *Heterozigoții compuși* sunt persoanele care dețin câte o mutație diferită pe fiecare cromozom, în timp ce *homozigoții recesivi* posedă același tip de mutație pe ambii cromozomi. Astfel, maladia se întâlnește la *homozigoții recesivi* și *heterozigoții compuși*, cei din urmă fiind și cele mai multe cazuri de BW. [54]

Este important să fie evaluați membrii familiei unui pacient nou diagnosticat cu BW, deoarece riscul de a dezvolta această boală este de 25% pentru frați și de 0,5% pentru descendenți. Este extrem de important de efectuat diagnosticul diferențial între *homozigoții recesivi*/*heterozigoții compuși* și *heterozigoții simpli* (purtătorii sănătoși), în special la etapa asimptomatică, deoarece pentru pacienții din primul grup se recomandă de inițiat terapia cu agenți chelatori cât mai precoce

în scopul prevenirii invalidizării, în timp ce purtătorii sănătoși nu vor dezvolta BW și nu necesită administrarea preparatelor specifice, care ar putea provoca apariția unor reacții adverse potențial grave. [145]

Riscul dezvoltării BW la copii este dependent de tipul parteneriatului între părinții acestora: părinți sănătoși, purtători sănătoși sau afectați de această maladie, moștenirea mutației fiind conform legilor Mendeliene (figura 3). Însă, în pofida caracterului medeleian de transmitere a bolii, au fost observate unele devieri. Este neobișnuit, ca mutațiile autozomal recesive să fie întâlnite în mai multe generații consecutive, însă în BW acest lucru se datorează frecvenței mari a purtătorilor sănătoși [14, 52]. Astfel, Poujois A. și Woimant F. [14], precum Chang I.J. și Hahn S.H. [52] au raportat cazuri de moștenire „pseudo-dominantă”, ce au determinat screening-ul întregii familii. Având în vedere, că BW este o tulburare tratabilă, este insuficient de a informa doar despre riscul posibil de boală genetică în familie, de aceea se recomandă un screening familial complex [14].

Într-un număr semnificativ de cazuri de BW diagnosticată clinic, nu s-a reușit depistarea mutației genei ATP7B, iar acest lucru a evidențiat heterogenitatea genetică a acestei afecțiuni, dar și a sugerat prezența unor mecanisme mutaționale paradoxale. Astfel, Coffey A.J. și coautorii [72], în studiul genetic al pacienților cu BW din Marea Britania au identificat pacienți cu modele de moștenire atipică ce pot cauza BW, precum isodisomia segmentală uniparentală. Modelul rezultă când ambii omologi al cromozomului sunt de la același părinte și reprezintă o eroare rară accidentală al procesului de segregare cromozomială în timpul meiozei. Acest lucru este important pentru practica clinică și consilierea genetică, deoarece se va lua în considerare genotiparea părinților asimptomatici sau obținerea secvențierii complete a genei ATP7B pentru confirmarea variantei patogene [54]. Screening-ul nou-născuților nu a dat rezultatele așteptate, de aceea derularea programelor naționale nu este justificată [12]. Screening-ul trebuie amânat până la vârsta de 2 ani, uneori chiar mai târziu, deoarece BW este rareori simptomatică până la 5 ani [14].

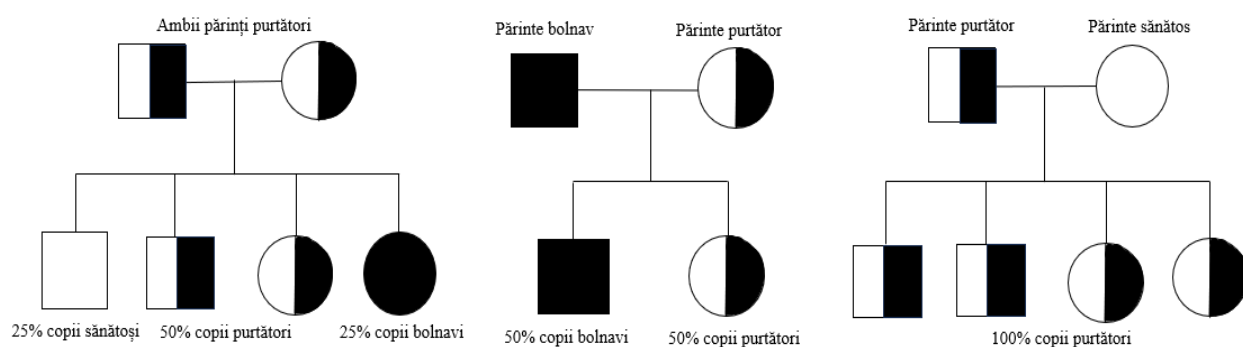


Figura 3. Moștenirea mutațiilor în cadrul familiei (imagine proprie)

Note: Forme pline-indivizi afectați; forme pe jumătate pline-purtător sănătos, forme incolore – indivizi sănătoși.

BW se poate transmite de la părinții asimptomatici la descendenții lor. Rudele de gradul I nu includ doar frații unui proband, ci și descendenții și părinții probandului. Deși riscul de a dezvolta boala este mai mare la frați, riscul pentru părinți (0,5%) și descendenți (0,5%) este subestimat. În ciuda acestui fapt, screening-ul părinților și copiilor unui proband este justificat având în vedere potențialul letal al BW. [12]

Cel mai frecvent, părinții sunt considerați purtători sănătoși. Cu toate acestea, au existat rapoarte de pacienți peste 40 de ani diagnosticați cu BW. Prin urmare, având în vedere posibilitatea unui debut tardiv, este indicată explorarea clinică și paraclinică a părinților unui copil nou diagnosticat cu această tulburare [146]. De asemenea, trebuie menționat că pentru pacienții identificați cu BW în copilărie sau adolescență, se recomandă testarea descendenților, odată ce aceștia decid să aibă copii [12].

Probabilitatea ca nepoții să fie afectați de BW este de 1 la 600, iar pentru veri, probabilitatea este de 1 la 800 [147]. În literatură este descris un caz în care, după evaluarea membrilor de familie, au fost diagnosticați încă 3 persoane cu BW, un unchi și doi veri [148]. Astfel de cazuri evidențiază importanța testării rudelor îndepărtate, mai ales în zonele mai izolate.

Astfel, consilierea genetică este esențială pentru familiile pacienților cu BW, iar screening-ul rudelor de gradul I este recomandat de toate ghidurile internaționale privind diagnosticul și tratamentul BW. Stabilirea diagnosticului în timp util este important pentru rudele persoanei

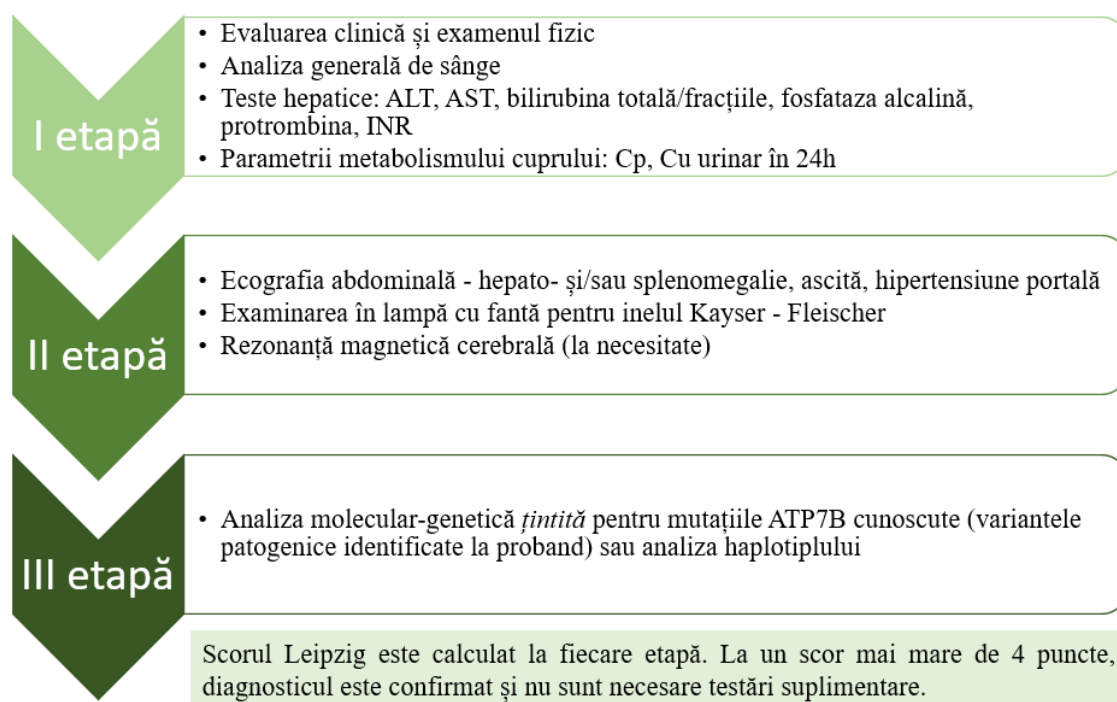


Figura 4. Algoritmul de examinare în cadrul screening-ului de familie

Adaptată după: Socha P. et al. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; 2018 [133]

afectate, deoarece inițierea tratamentului în faza asimptomatică este asociată cu o calitate a vieții bună și cu o evoluție favorabilă a bolii [2, 131-134]. Algoritmul de evaluare include examinarea clinică și biochimică exhaustivă, precum și determinarea genotipului ATP7B (figura 4).

1.7. Concluzii capitolul 1

1. Evoluția naturală a BW poate fi polimorfă, variind de la forma asimptomatică până la boală cronică hepatică avansată cu sau fără leziuni neurologice ireversibile, polimorfismul fenotipic poziționându-se la intersecție între genetică și epigenetică, fapt ce îngreunează identificarea unor corelații genotip – fenotip bine definite.
2. Prezența BW nu exclude alte patologii hepatice sau neurologice, și invers, iar un diagnostic stabilit în stadiile incipiente poate preveni agravarea stării pacientului cu dezvoltarea de complicații și leziuni ireversibile.
3. Abordarea pacientului cu modificări ale testelor funcționale hepatice trebuie să fie algoritmică, exhaustivă și individualizată, folosind scoruri validate, pentru a evita stabilirea unor diagnostice incorecte și excluse alte cauze ce pot mima BW, precum și administrarea de tratamente inutile.
4. BW se caracterizează printr-o heterogenitate mutațională înaltă și fiind o tulburare monogenică care presupune transmiterea mutației genetice conform legilor mendeliene, sunt raportate cazuri atipice și paradoxale de moștenire a BW.
5. Analiza molecular – genetică este esențială în diferențierea persoanelor heterozigoți simpli de pacienții asimptomatici homozigoți recesivi sau heterozigoți compuși.
6. Consilierea familiilor cu membri afectați de BW este crucială în identificarea de membrii noi asimptomatici și inițierea timpurie a terapiei specifice.

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 suspectați 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 Universității de Stat de Medicină și Farmacie “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 anilor 2020 – 2024. Design-ul studiului este reprezentat în anexa 9.

Etapa I. Identificarea conceptului și ipotezei științifice - include studierea resurselor bibliografice cu crearea conceptului de cercetare. Astfel, 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, dar 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 suspectați 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 la Comitetul 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 clinică a pacientului cu boala Wilson, elaborat în cadrul studiului - anexa 10.

Analiza particularităților demografice a presupus colectarea următoarelor informații: date personale; date demografice (rasa, etnia, locul nașterii, locul de trai, dacă este parte al unei comunități social-cultural izolat); date sociale (al câtelea copil în familie, familie completă/incompletă/orfan, prezența de frați și surori, prezența căsătoriilor între rude); statutul social (<18 ani, celibatar/ă, căsătorit/ă, divorțat/ă, văduv/ă, prezența descendenților), educație (fără studii, clase primare, gimnaziu, liceu, studii profesionale calificate, superioare și prezența unei activități (lucrează/ nu lucrează - motivul).

Evaluarea clinică a inclus identificarea acuzelor cu încadrarea într-un fenotip clinic, prezența simptomelor hepatice (semne din cadrul sindroamelor asteno-vegetativ, dispeptic, icteric, hemoragic, de hipertensiune portală, insuficiența hepatică, etc.), precum și a manifestărilor extrahepatice (neurologice, psihiatrice, ginecologice, cardiace, etc); semne de decompensare hepatică (prezența ascitei, hemoragie digestivă superioară primară sau repetată, cu sau fără ligaturarea vv. esofagiene; encefalopatiei hepatice, decesul și cauza lui); istoricul bolii (debutul primelor simptome, durata până la stabilirea diagnosticului, evoluția bolii, episoade inexplicabile de icter sclero-tegumentar, tratamentul efectuat și eficiența acestuia; reacțiile adverse ce s-au dezvoltat pe parcurs); date fiziologice (la bărbați: dezvoltarea conform vârstei; la femei: prima menstruație, prezența unui ciclu menstrual regulat sau amenoree, pubertate întârziată, numărul de sarcini/nașteri/avorturi, menopauza; administrarea de contraceptive); maladii concomitente (debut, durată, evoluție și necesitatea administrării de medicamente, în special cele cu potențial hepatotoxic); anamneza eredo-colaterală (prezența la rude de gradul I și II a BW sau alte maladii hepatice, neurologice sau alte organe, deces la vârsta tânără din cauza ficatului sau din alte motive); identificarea viciilor; contact cu substanțe chimice sau toxice; anamneza alergologică; precum și examenul fizic (aprecierea parametrilor vitali și a datelor antropometrice; identificarea semnelor specifice suferinței hepatice sau neurologice și examenul pe sisteme).

Analiza rezultatelor investigațiilor include testele de laborator (analiza generală de sânge, examenul biochimic - sindromul citolitic, colestatic, imuno-inflamator și hepatopriv; aprecierea parametrilor metabolismului Cu: Cp serică, Cu total în ser, Cu urinar în 24 h și diagnosticul diferențial cu alte patologii hepatice care pot mima sau se pot asocia cu BW: markerii serologici virali; markerii autoimuni hepatici; aprecierea metabolismului fierului; determinarea alfa 1-antitripsina) și investigațiile instrumentale (ecografia organelor abdominale cu efectuarea doppler-ului sistemului portal la necesitate, endoscopia digestivă superioară, RMN cerebral și tomografie computerizată cerebrală, la necesitate pentru diagnostic diferențial). 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, la nivelul Spitalului Clinic Republican "Timofei Moșneaga" și Centrul de Diagnostic Republican.

Pentru aprecierea leziunilor extrahepatice, au fost consultați și alți specialiști: oftalmolog cu examenul în lampă cu fantă (identificarea IKF și alte modificări oculare); neurolog (aprecierea statutului neurologic); psihiatru (aprecierea statutului mental); ginecolog (în cazul pacientelor cu modificări hormonale sau în cazul planificării unei sarcini). Implicarea geneticianului este una primordială în stabilirea diagnosticului și efectuarea testului genetic – prin PCR-SSCP (Single-strand conformational polymorphism) și secvențiere Sanger a genei ATP7B cu determinarea mutației, precum și statutul de homozigot recesiv sau heterozigot simplu/compus.

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. 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 (anexa 11), 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.

Principiul metodei PCR-SSCP constă în faptul că ADN-ul monocatenar are o conformație definită, iar modificarea conformației cauzată de schimbarea unei singure baze în secvență poate determina migrarea diferită a ADN-ului monocatenar la electroforeză fără denaturare. Respectiv, detectarea unui patern modificat în urma migrării fragmentelor de ADN monocatenar, permite

suspectarea unei mutații în regiunile studiate ale genei, după care se necesită secvențierea acestui fragment pentru a caracteriza cu precizie modificarea identificată. Această tehnică este utilizată pentru a identifica mutații de tip substituții, inserții și deleții mici, diverse rearanjamente în fragmente de ADN relativ scurte (200-300 bp).

Testul PCR-SSCP implică următoarele etape:

1. Colectarea sângelui venos periferic în volum de 2 sau 5 ml, în funcție de metoda utilizată la etapa a doua;
2. Procesul de izolarea a ADN-ului din sânge se efectuează atât prin metoda clasică, cât și prin kit – principiul metodei are la baza selectarea leucocitelor prin eliminarea celorlalte elemente figurate ale sângelui, urmată de ruperea membranelor celulare și extragerea ADN-ului cu ajutorul alcoolului;
3. Analiza SSCP propriu-zisă:
 - reacția de polimerizare în lanț a fragmentului de interes;
 - denaturarea termică (95°C) al ADN-ului dublu-catenar din produsul amplificat în prezența denaturantului;
 - răcirea ADN-ului denaturat (monocatenar) pentru a împiedica spiralarea acestuia;
 - detectarea diferențelor în ADN-ul monocatenar prin electroforeză în gel nedaturat de poliacrilamidă.

Pentru fiecare exon în parte se repetă doar etapa 3 și 4. [149]

Principiul secvențierii după Sanger are la bază capacitatea ADN polimerazei de a încorpora 2',3'-dideoxinucleotide în urma reacției de polimerizare. Dideoxinucleotidele (ddNTPs) reprezintă analogi ale deoxinucleotidelor care nu au gruparea 3'-OH esențială în formarea legăturii 3'5'-fosfodiesterice.

Etapile 1-2 de pregătire a fragmentului de interes sunt similare cu PCR-SSCP. Etapa secvențierii propriu-zise include mai mulți pași importanți:

- prepararea probei de ADN: ADN-ul țintă este purificat și amplificat pentru a asigura o cantitate suficientă pentru secvențiere;
- fragmentarea ADN-ului în bucăți mai mici, care sunt mai ușor de gestionat în procesul de secvențiere;
- adăugarea primerilor specifici fragmentului care trebuie secvențiat pentru a iniția procesul de sinteză a ADN;
- sinteza ADN-ului și incorporarea ddNTPs: se adaugă nucleotide normale (dNTPs) și ddNTPs marcate cu fluorocromi diferiți pentru fiecare tip de bază. Fiecare ddNTP termină lanțul de sinteză atunci când este incorporat, deoarece nu are grupa 3'-OH necesară pentru adăugarea următorului nucleotid;

- electroforeza capilară: fragmentele de ADN rezultate sunt separate prin electroforeză capilară. Fiecare fragment se termină cu un ddNTP marcat cu un fluorocrom specific, permițând identificarea secvenței de baze prin detectarea culorilor subsecvente.
- analiza datelor: un detector înregistrează semnalele fluorescente pe măsură ce fragmentele trec prin capilar. Aceste semnale sunt convertite într-o secvență de nucleotide, oferind secvența finală a fragmentului de ADN. [150]

ADN-ul restant după procedură este păstrat în congelator (-20°C) sub un cod unic repartizat inițial la pacient.

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:

1. variabile nominale - categoriile sunt distincte și nu au o ordine specifică. Exemple: gen (masculin, feminin), răspuns binomial (da, nu), variantele genetice, etc.
2. variabile cantitative – indicatori cu o ordine specifică și distanțele dintre valori sunt egale, care se măsoară prin perioade de timp (vârstă, durată), teste de laborator, etc
3. variabile interval - intervale formate din variabile cantitative, pentru prezentare și analiză statistică specifică, de exemplu: intervale de vârstă.

Indicatorii statistici aplicați și criteriile de utilizare:

1. media aritmetică - suma tuturor valorilor împărțită la numărul total de valori; utilizată pentru variabile cantitative.
2. devierea standard (DS) - măsura variabilității sau dispersiei unui set de date față de media acestuia.
3. mediana - valoarea care împarte setul de date în două părți egale; utilizată pentru variabile cantitative.
4. proporția exprimată în procente din totalul de observații aferente și intervalul de încredere 95 % (ÎÎ) pentru proporții folosite pentru variabile nominale.

Testele statistice aplicate:

1. **Testul t (t-test)** – statistica folosită pentru compararea mediilor a două grupuri.
2. **ANOVA (Analysis of Variance)** – procedură pentru compararea mediilor pentru doua sau mai multe grupuri.
3. **Diagrama Box-plot** – utilizată pentru vizualizarea și investigarea formei distribuției valorilor cantitative, având ca elemente cheie indicarea medianei, percentilei 25 și 75, valorilor minime și maxime.
4. **Chi-pătrat (Chi-square test)** – statistica pentru compararea a două sau mai multe proporții și estimarea asocierii între două variabile nominale.

Pragul de semnificație statistică aplicat la valoarea p aferentă statisticilor calculate este $<0,05$.
Prezentarea datelor statistice a fost efectuată prin tabele și grafice.

2.4. Concluzii capitolul 2

1. Conceptul studiului include un complex de ipoteze științifice dependente de obiectivele prestabilite, iar dovezile obținute evidențiază scopul înaintat. Proiectarea protocolului de cercetare a fost realizat conform regulamentului metodologiei științifice aprobate în cercetările din domeniul sănătății publice.
2. Cercetarea s-a desfășurat în câteva etape:
 - **etapa I:** proiectarea conceptului studiului și definirea problemei înaintate spre cercetare, prin prisma datelor științifice internaționale;
 - **etapa II:** studiu descriptiv retrospectiv și prospectiv a pacienților cu BW, pentru identificarea lotului de cercetare final;
 - **etapa III:** evaluarea lotului de cercetare prin prisma prezentării clinice și a variantelor moștenite, precum și identificarea interrelațiilor genotip-fenotip;
 - **etapa IV:** procesarea și analiza matematico-statistică a materialului.
3. Pentru confirmarea diagnosticului, au fost utilizate un spectru larg de metode clinice, molecular-biologice, instrumentale și genetice.
4. Metodologia cercetării a cuprins diferite metode: descriptivă, analitică, matematică și statistică.
5. Analiza statistică detaliată a materialului colectat, aplicând diverse formule matematice, a permis aprecierea veridicității rezultatelor.

3. REZULTATELE CERCETĂRII

3.1. Identificarea aspectelor demografice la pacienții cu boala Wilson

3.1.1. Identificarea cohorței 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 ai metabolismului de 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 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 coleastă 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. Subiecții cu scorul Leipzig modificat ≥ 4 puncte au fost ulterior analizați în cercetarea propusă.

După cum vedem în anexa 12, 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, însă practic 2/3 nu întrunesc la această etapă toate criteriile pentru a stabili BW definită. Astfel, aplicând recomandările ghidurilor internaționale de specialitate privind stabilirea diagnosticului de BW (EASL, INASL, BASL, AASLD, PCN 238) acești pacienți au fost supuși testării genetice. Ca urmare, au fost identificați 53 de pacienți cu BW definită. 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 3. 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.

Tabelul 3. 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)

Toți pacienții sunt originari din Republica Moldova (figura 5). 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 anamnestice eredo-colateral agravat, rude de gradul I și II cu BW confirmată sau BCF/boală neurologică.

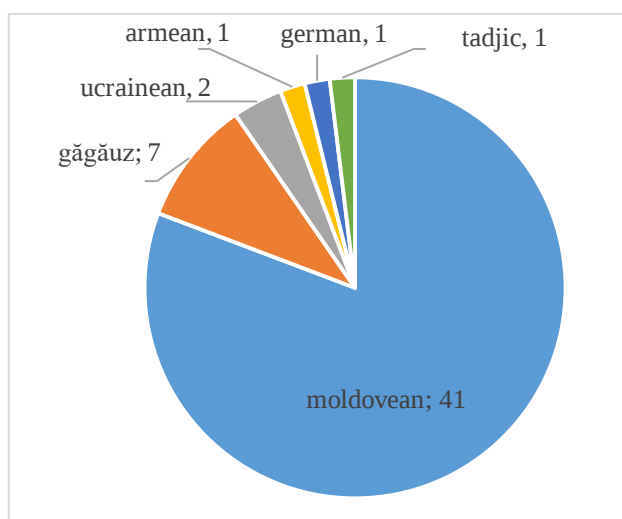


Figura 5. Diversitatea etnică a lotului de cercetare

Conform distribuției pe vârstă (tabelul 4), 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 nespecifice.

Tabelul 4. 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.

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%.

Tabelul 5. **Caracteristica comparativă a pacienților din grupul non-BW și BW**

	Non-BW	BW
Pacienți, n	120	53
Vârsta medie $\pm$ DS, ani	27,1 $\pm$ 16,2	22,62 $\pm$ 9,63
<i>t=1,87; p=0.063</i>		
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%)*
<i>$\chi^2=49,67$, $gl=2$, $p<0.001$</i>		
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%)*

	Non-BW	BW
	$\chi^2=22,67, gl=3, p<0.001$	
Evaluăți screening familial, n=24 (100%)	16 (66,67%)	8 (33,33%)

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

Evaluând comparativ grupul pacienților cu BW și non-BW (tabelul 5), 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 BW, 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-BW și BW, sunt statistic semnificative ($p<0.05$).

Concluzia acestui subcapitol este că nu toți pacienții suspectați 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.

Vom prezenta un caz clinic din practica noastră, care demonstrează necesitatea evaluării prin mai multe etape, pentru stabilirea în final a BW. Scorul Leipzig inițial fiind 5 puncte. Totuși, pacientul este testat genetic și este confirmat cu BW. Scorul Leipzig definitiv este 9 puncte. Acest pacient prezintă o simptomatologie clasică de BW, dar cu regret este un pacient neaderent la tratament, și prezintă forma decompensată de boală.

Acuze momentul evaluării	la sindrom astenic moderat, sindrom dispeptic, disconfort în hipocondrul drept, accentuat la efortul fizic, sindrom hemoragic, sindrom pseudobulbar (dizartrie), sindrom extrapiramidal (tremor al mâinilor cu afectarea scrisului), afectarea funcției cognitive, labilitate emoțională
Istoricul bolii	Se consideră bolnav de la vârsta de 14 ani, când a fost diagnosticat cu ciroză hepatică decompensată. S-a exclus etiologia virală, autoimună și toxică, fiind recomandat spre efectuare parametrii metabolismului Cu, însă părinții au refuzat, negând factorul genetic. De atunci, se afla la evidența medicului de familie, dar nu se prezenta în mod regulat la vizite. La 12 ani distanță (26 de ani) au apărut manifestări neurologice (tremor al mâinilor și instabilitate posturală), astfel s-a insistat pe examinarea specifică pentru BW. Luând în considerare rezultatele obținute: Cp serică – 10,33mg/dL (22-61), Cu seric total- 37.80 μg/dL (70-150), Cu urinar în 24h - 370 μg/24h (14.8-59.2) și prezența IKF a fost stabilit diagnosticul de BW, fiind inițiat tratamentul specific cu ameliorarea în dinamică a datelor clinice și paraclinice.
Anamneza personală	Originar/locuiește – centrul țării. Părinții/bunei - fără patologie evidentă, are 2 frați aparent sănătoși (neexaminați). Neagă relații de consangvinizare.
Statut social	Studii gimnaziale nefinisate. Ocupație - crește flori. Celibatar, fără copii.
Vicii	Fumător – 15 -20 de țigări/ zi. Consumul de alcool ocazional – vin, bere.
Observații fizice relevante	Datele antropometrice și semnele vitale – fără particularități. Tremor ușor al mâinilor. Hepatomegalie. Splenomegalie.
Investigații recente	- Trombocitopenie ($67 \cdot 10^9/L$), sindrom citolitic minimal (ALT - 52 U/L, AST - 49 U/L), sindrom colestatic (fosfataza alcalină – 135.9 U/L; gama-glutamyltransferaza - 124.90 U/L). Sindrom hepatopriv – absent. - EDS - varice esofagiene necomplicate, gr I-II. - Eco Abd – Hepatomegalie moderată (163.8*74.44mm), splenomegalie marcată (185.7*67.0 mm), vena portă (13.5 mm) și vena splenică (8 mm), în timpul inspirului și expirului, dimensiunile venei porte nu se modifică.
Testul genetic	Statut heterozigot compus: variante patogene în exonul 14 – p.H1069Q (c.320C>A) și în exonul 20 – p G1341D (c. 4022G>A)
Tratament	Etiopatogenetic și pentru hipertensiunea portală
Opțional	Pacientul nu este compliant la recomandările medicale, deși au fost explicate toate riscurile acestei maladii: fumător activ, consumă alcool, nu respectă regimul alimentar recomandat și nu administrează regulat tratamentul specific. Membrii familiei nu se implică în îngrijirea și supravegherea pacientului.

3.2. Definirea fenotipurilor clinice evidențiate la pacienții cu boala Wilson

În cei peste 100 de ani de la prima descriere a BW, pleomorfismul clinic al acestei boli continuă să ne surprindă. BW se poate prezenta ca boală hepatică, cu tulburări de mișcare, cu boli psihiatrice sau episoade recurente de anemie hemolitică. Boala hepatică clinică este diversă, variind de la hepatomegalie asimptomatică sau creșterea transferazelor serice la steatoză hepatică până la ciroză; totuși, uneori, boala hepatică este neglijabilă, în ciuda dizabilității neurologice proeminente. Din nou, pacienții cu boală hepatică cronică pot să nu prezinte simptome neurologice sau anomalii cerebrale la imagistica prin rezonanță magnetică.

În cohorta noastră este evidențiată această patologie atât la bărbați cât și la femei, cu implicarea pacienților de vârstă tânără, de la copil (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, neuro-hepatic, reprezintă cel mai frecvent tip de prezentare clinică în toate categoriile (figura 6).

Manifestările clinice sunt diverse, deși se observă o stratificare în manifestări predominant hepatice; sau neuro-psihiatrice sau cu prezentare mixtă neuro-hepatică. 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 anexa 13.

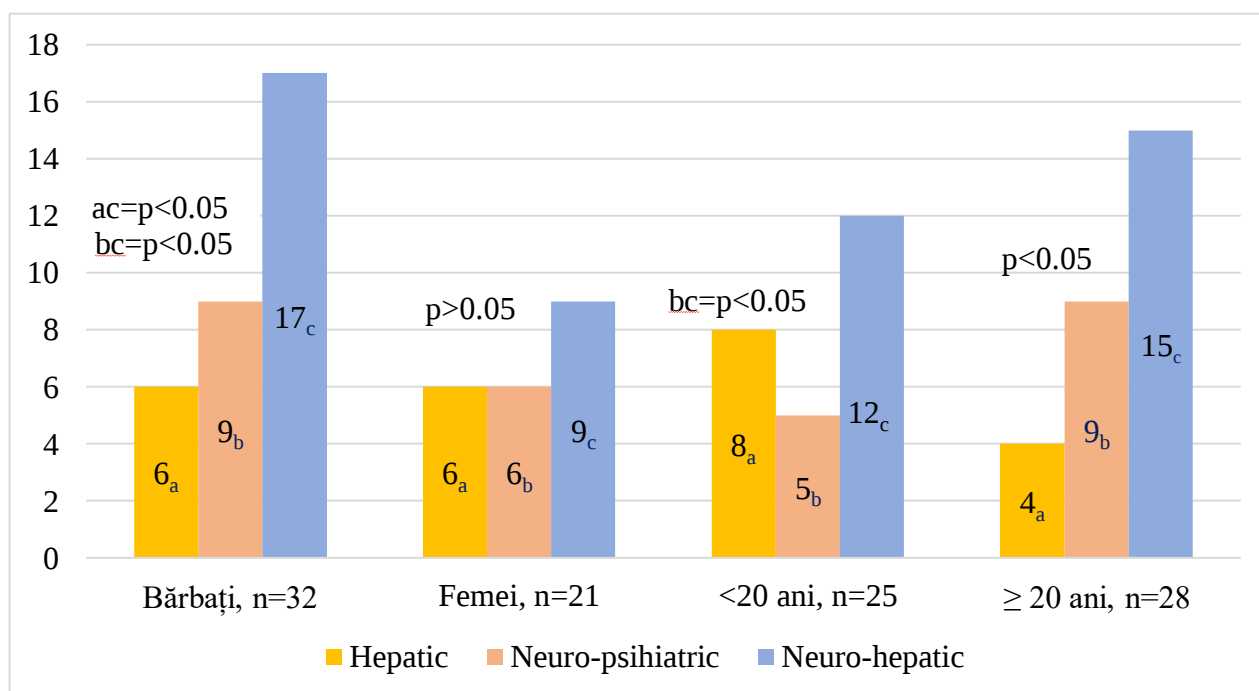


Figura 6. Distribuția fenotipului în funcție de sex și vârsta de debut a bolii (n=53)

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% ($n=7$). 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 și genetică a acestui grup este descrisă în anexa 13. Evident este 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 și fenotipul hepatic: majoritatea pacienților prezintă Cp scăzută, și majorarea excreției urinare în 24 ore 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 și genetică a acestui grup este descrisă în anexa 13. 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 stabilit 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 7). Cele mai frecvente acuze declarate sunt afectarea mișcărilor fine, tremorul, dizartria și coreoatetoza.

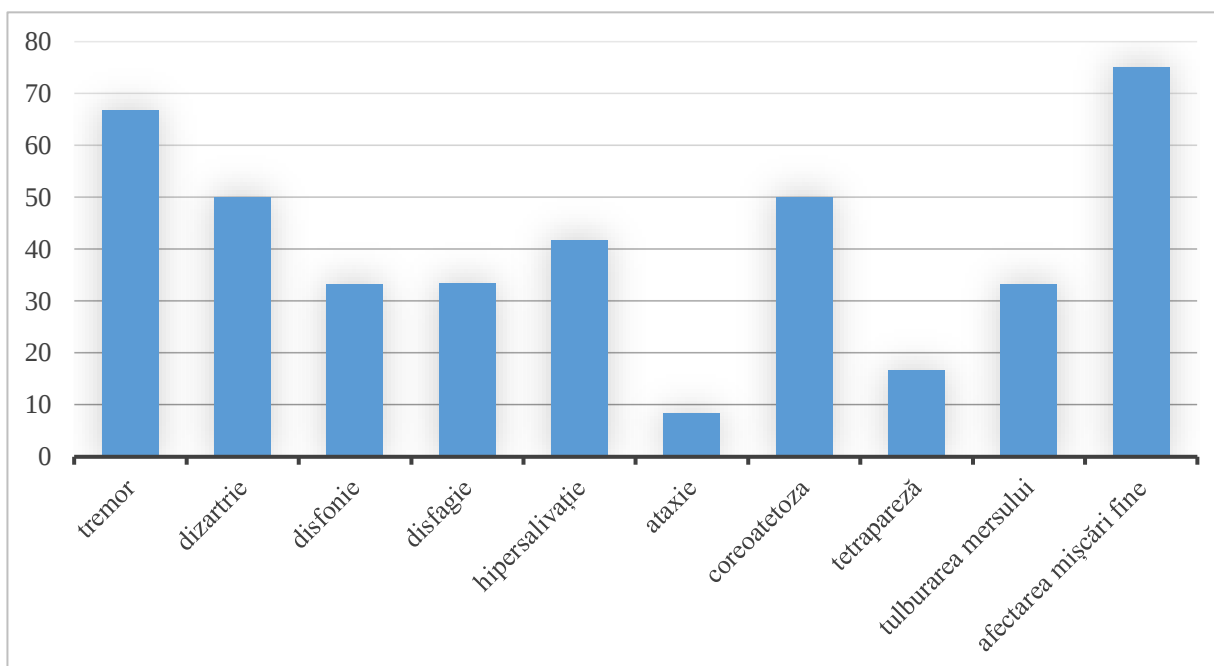


Figura 7. **Varietatea simptomatică a fenotipului neurologic (%)**

3.2.3. Evaluarea fenotipului mixt

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 și genetică a acestui grup este descrisă în anexa 13. 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 ¼ pacienți și sindrom citolitic la peste ½ cazuri. Evaluarea parametrilor metabolismului Cu stabilește majoritatea pacienților prezintă Cp scăzută, și majorarea excreției urinare în 24h a Cu. În cazul unui pacient, nici o mutație nu a fost identificată. Variantele patogenice *c. 2532delA*, *p.G1341V*, *p.Asn728Ile* și *p.A1227T* au fost raportate doar în cazul persoanelor fenotip neuro-hepatic.

Astfel, analizând comparativ fenotipurile 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 ceilalți, fenotipul neurologic se prezintă cu un debut mai tardiv al bolii și un nivel

de Cu urinar statistic semnificativ mai redus comparativ cu celelalte grupuri, în timp ce fenotipul mixt se evidențiază prin debutul bolii în jur de 20 ani și durata stabilirii diagnosticului fiind cea mai lungă. Deși, valorile Cp serice sunt diferite, semnificație statistică nu s-a observat în nici un grup.

Vom prezenta un pacient cu BW, care prezintă un profil genetic homozigot recesiv și fenotip neuro-hepatic. În acest caz, evoluția bolii este una pozitivă, luând în considerație durata stabilirii diagnosticului și evoluția clinică pe fundal de tratament specific.

CAZ CLINIC NR.2 - D. N., femeie, anul nașterii 1977

<i>Acuze la momentul evaluării</i>	<i>Tremor ușor al mâinilor cu afectarea mișcărilor fine, insomnie, scăderea memoriei și concentrației, slăbiciuni generale periodice</i>
<i>Istoricul bolii</i>	<i>Se consideră bolnavă de la 34 ani, când boala a debut brusc cu tremor generalizat pronunțat, instabilitate posturală și tulburare cognitivă. Peste 1 lună a fost diagnosticată BW, fenotip neuro-hepatic. Investigațiile efectuate la acel moment:</i> <i>- trombocitopenie – $77 \cdot 10^9/l$ (150 – 450), fără modificări în analizele biochimice; metabolismul cuprului – Cp seric – 14 (20-60 mg/dL); Cu urinar în 24h – 35 (10-60) ug/24h; după stimulare - 219 umol/l (2-80);</i> <i>- Eco Abd – Splenomegalie moderată cu semne de hipertensiune portală.</i> <i>- RMN cerebral - arii patologice simetrice la nivelul talamusului, bilateral cu extindere inferioară, cu implicarea pedunculilor cerebrale, trunchiului cerebral și incipient a emisferei cerebelare (dreapta > stânga).</i> <i>- Examen oftalmolog - IKF – inel prezent bilateral.</i> <i>S-a inițiat tratamentul specific, cu ameliorare semnificativă a tuturor simptomelor. Pacienta este compliantă.</i>
<i>Anamneza personală</i>	<i>Originar/locuiește – centrul țării. Familia tatei: 4 copii - tata (57 ani), unchiul și o mătușă – decedați de BCF necunoscută. Sora pacientei (24 ani) - decedată de BCF neprecizată. Neagă căsătorii între rude.</i>
<i>Statut social</i>	<i>Studii gimnaziale nefinisate. Efectuează diferite munci la plată cu ora. Divorțată, 1 copil – aparent sănătos, evaluat biochimic.</i>
<i>Vicii</i>	<i>Nu prezintă.</i>
<i>Observații fizice relevante</i>	<i>Datele antropometrice și semnele vitale – fără particularități. Tremor ușor al mâinilor.</i>
<i>Testul genetic</i>	<i>Homozigot recesiv: variantă patogenă în exonul 14 – p.H1069Q (c.320C>A)</i>
<i>Tratament</i>	<i>Etiopatogenetic și reabilitare neurologică</i>

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. Astfel, ne-am propus să caracterizăm profilul genetic al pacienților din grupa de cercetare, astfel să obținem o radiografie genetică în 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/55%).

Lotul cercetat se caracterizează printr-o heterogenitate mutațională înaltă, fiind identificate 19 variante diferite care au fost definite genetic și fenotipic în anexa 14 [152-156]. Clasificarea variantelor s-a efectuat în conformitate cu recomandările ACMG [69]. Varianta *p.Phe764=* este considerată probabil patogenă sau cu semnificație incertă (unele surse), 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 anexa 15. 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 în 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).

Vom prezenta un pacient cu BW, care prezintă un profil genetic homozigot recesiv și fenotip hepatic (stadiu de ciroză hepatică), iar în acest caz este evidentă întârzierea stabilirii diagnosticului final (după 7 ani de la apariția primelor simptome).

CAZ CLINIC NR.3 - G.G., bărbat, anul nașterii 1999

Acuze la moment	Disconfort în hipocondrul drept la efort fizic și sindrom astenic moderat
Istoricul bolii	Se consideră bolnav de la vârsta de 7 ani, când periodic acuza icter sclero-tegumentar, anemie și sindrom citolitic moderat. Administrea periodic tratament, cu ameliorarea temporară a simptomelor. Diagnosticul de BW a fost stabilit în 2013, 7 ani distanță de la apariția primelor simptome. Investigațiile efectuate la acel moment: - anemie (hemoglobina – 112 g/l (137-175)), leucopenie – $1.74 \cdot 10^9/l$ (4.23 – 9.07); trombocitopenie - $102 \cdot 10^9/l$ (163 – 337); sindrom citolitic minimal-moderat; markeri serologici la viruși hepatici A, B, C și D – negativi; - metabolismul cuprului – Cp seric – 9.20 mg/dL (22-61); Cu seric – 27.70 $\mu g/dL$ (64-114); Cu urinar în 24h (pe fon de tratament cu săruri de Zn – 319.2 $\mu g/24$ h (15-70); - Doppler al sistemului portal – tablou sugestiv pentru ciroză hepatică (structură neomogenă, micro-macronodular, ecogenitate sporită). Splenomegalie pronunțată (226*82 mm). Hipertensiune portală exprimată (v.porta -14.2 mm, flux hepatopetal; v. lienală – 10.4 mm, inspir profund – 12.0, complianța respiratorie redusă, flux hepatopetal; semne de dilatări porto-sistemic: recanalizarea venei ombilicale cu flux hepatofugal); - Fibroscan – elasticitatea hepatică-14.5 kPa (stadiul F4); - Examen oftalmolog - IKF – inel complet prezent. De atunci, administrează D-penicilamina și săruri de zinc. Perioada 05 – 10.2023, stopează tratamentul de sine stătător.
Anamneza personală	Originar/locuiește – nordul țării Părinții/bunicii - fără patologie, are 2 surori purtătoare de genă mutantă. Neagă relații de consangvinizare în ultimele 3 generații
Statut social	Studii superioare finisate. La moment nu activează din motiv de sănătate. Căsătorit, fără copii la moment.
Vicii	Neagă
Observații fizice relevante	Datele antropometrice și semnele vitale – fără particularități. Eritem palmar și plantar. Steluțe vasculare unice pe torace. Hepatomegalie. Splenomegalie.
Investigații recente	2017: RMN cerebral - fără modificări patologice 2018: IKF - reabsorbție totală 2023: EDS - varice esofagiene gradul II-III, fără risc de hemoragie la moment. Gastropatie portal-hipertensivă eritematoasă. Eco Abd – Ciroză hepatică. Hipertensiune portală (v.portă-14 mm, v.lienală – 13 mm). Splenomegalie severă (225*85 mm). Lichid ascitic laminar în cavitatea intraperitoneală. ECG + Eco CG – fără modificări clinic semnificative

<i>Testul genetic</i>	<i>Homozigot recesiv: variantă patogenă la nivelul exonului 15 - c.3402delC</i>
<i>Tratament</i>	<i>Terapia cu chelatori</i>
<i>Opțional</i>	<i>2023: Recomandat ligaturarea varicelor gastro-esofagiene în mod planic.</i>

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* în ATP7B asupra expresiei fenotipice a BW (anexa 16). Pacienții *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.

O particularitate interesantă s-a înregistrat la grupul de pacienți *non-p.H1069Q*. Acești pacienți au fost stabiliți cu diagnosticul de BW la vârsta de $24,67 \pm 9,31$ ani, iar întârzierea diagnosticului este de circa $39,91 \pm 39,71$ luni (figura 8), fenotipul predominant este fenotipul mixt urmat de cel hepatic. Acest grup, care a constituit 12 pacienți, înregistrează cea mai lungă perioadă până la stabilirea diagnosticului clinic, fiind și cei mai în vârstă pacienți vs grupul *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

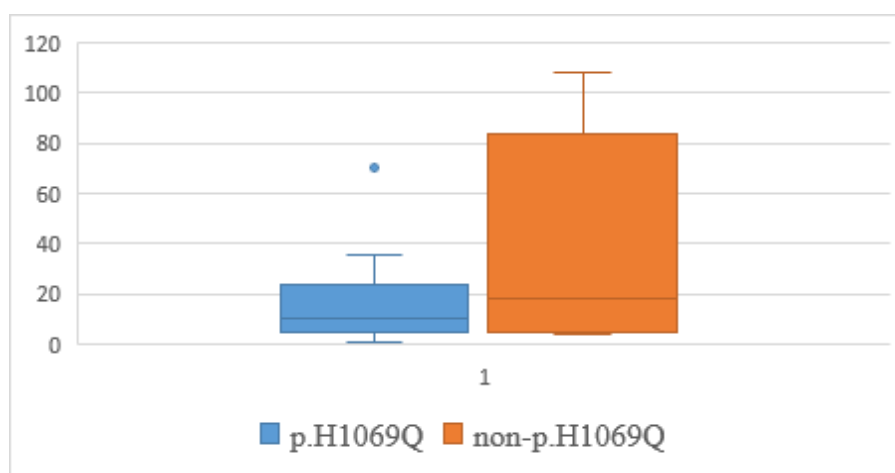


Figura 8. Durata stabilirii diagnosticului în funcție de profilul genetic (raportată în luni)

Profilul *non-p.H1069Q* se caracterizează printr-o diversitate genetică înaltă, fiind înregistrate și mutații unice rare, precum varianta *p.Phe764=* (figura 9). Moștenirea variantei patogene în acest grup este atât de tip homozigot recesiv, cât și heterozigot compus (tabelul 6).

Tabelul 6. Caracteristica genetică a profilului *non-p.H1069Q* în funcție de statutul moștenirii

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 (anexa 17), 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 predominant mixt și hepatic. În ambele grupuri prevalează bărbații.

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 (figura 10), 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.

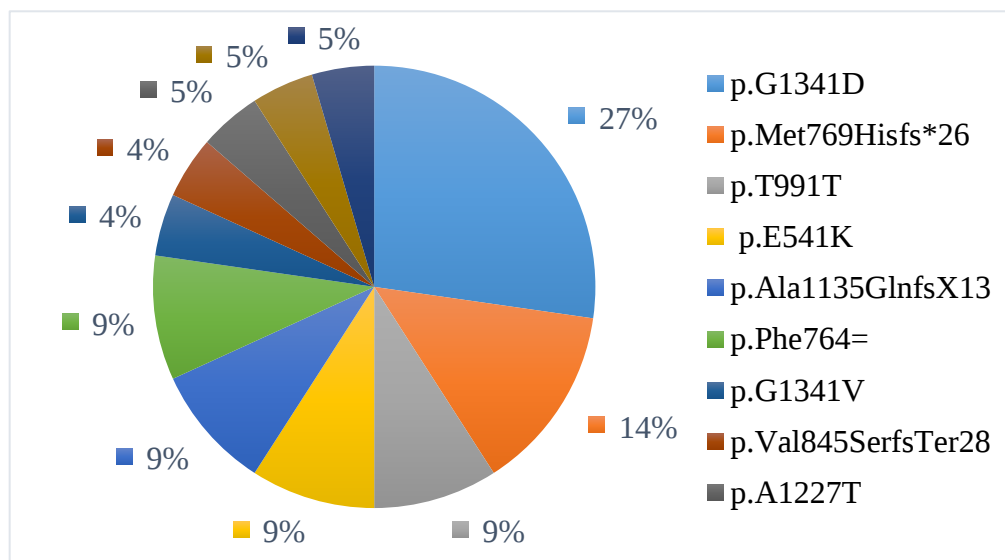


Figura 9. Diversitatea genetică a profilului non-*p.H1069Q*

O altă caracteristică este predominarea variantei mutaționale *missense*, urmată de *frameshift*, *nonsense* și *silentioasă/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 (anexa 18). 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*, *silentioasă/sinonime*, *nonsense* și *frameshift*.

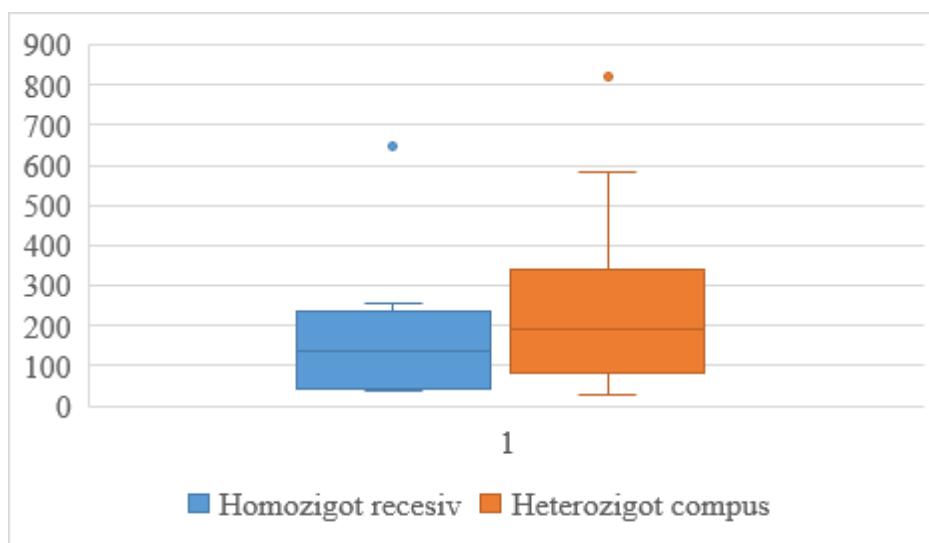


Figura 10. Nivelul cuprului urinar în 24 h în funcție de statutul moștenirii la pacienții cu *p.H1069Q* (raportată în µg/24h)

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 ($t=0,61$; $p=0,54$).

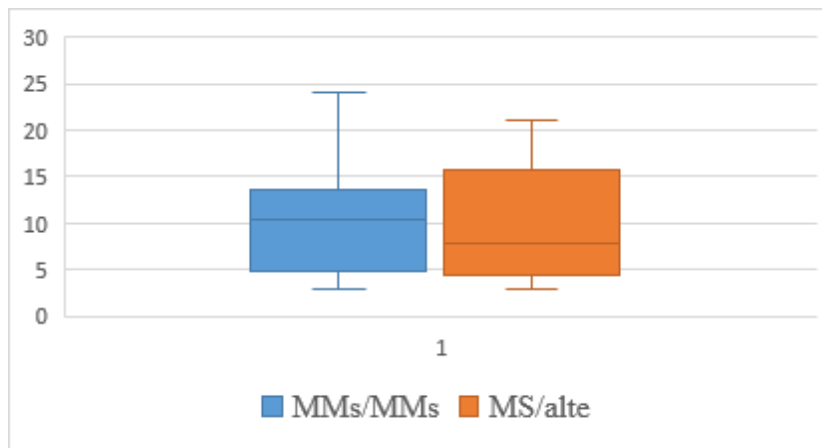


Figura 11. Nivelul ceruloplasminei serice în funcție de tipul mutației (raportat în 20-60 mg/dL)

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 ($233,02 \pm 203,6$) (figura 11). 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 [157]. 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.

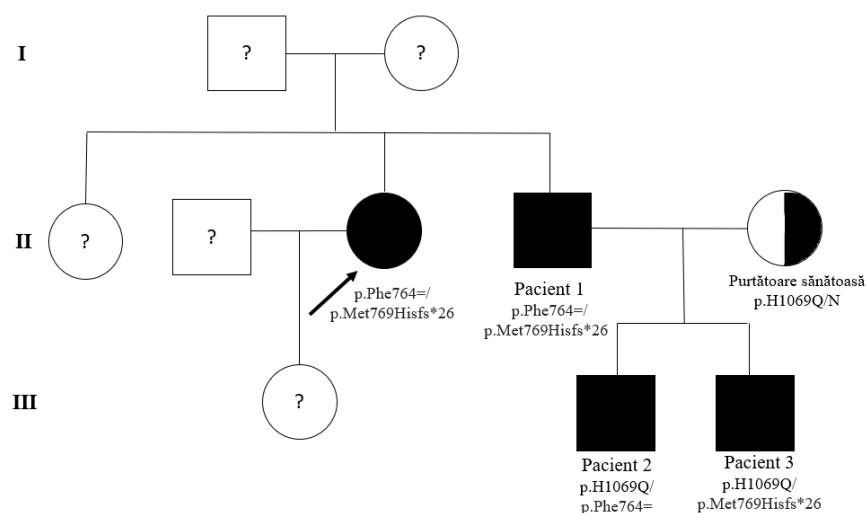


Figura 12. **Moștenire pseudo-dominantă** (imagine proprie) [83]

Note: Forme pline - indivizi afectați; forme pe jumătate pline - un purtător sănătos, ? – statut genetic necunoscut.

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 nozologie până la momentul respectiv (anexa 19). În cazul unei singure familii s-a identificat o transmitere paradoxală a bolii - moștenirea pseudo-dominantă (figura 12). 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 (figura 13). 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.

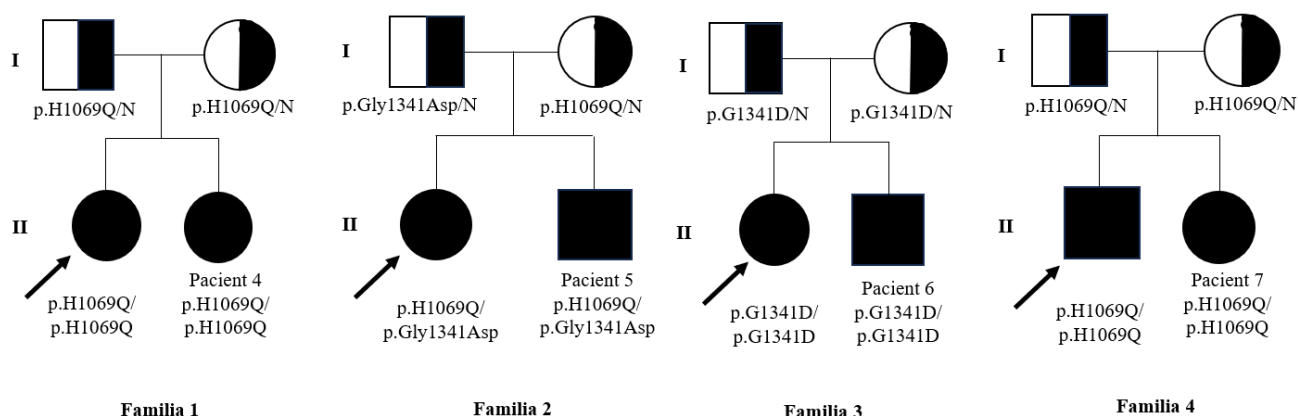


Figura 13. Familii depistate cu ambii copii afectați de maladia Wilson (imagine proprie) [83]

Note: Forme pline - indivizi afectați; forme pe jumătate pline - purtător sănătos.

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 și 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: ghidul Asociației Europene pentru Studiul Ficatului (EASL) din 2012 [2], ghidul Societății Europene Gastroenterologie Pediatrică, Hepatologie și Nutriție (ESPGHAN) din 2018 [133], ghidul Asociației Indiene pentru Studiul Ficatului (INASL) în comun cu Societatea Indiană de Gastroenterologie, Hepatologie și Nutriție Pediatrică și Societatea Indiană al tulburărilor de Mișcare din 2019 [132], și cele mai recente ghiduri înaintate de Asociația Britanică pentru Studiul Ficatului (BASL) din aprilie 2022 [134] și de Asociația Americană pentru Studiul Bolilor Ficatului (AASLD) din septembrie 2022 [131]. 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>) [158]. 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 (tabelul 7).

Tabelul 7. **Recomandările ghidurilor pe subiectul managementului bolii Wilson**

Ghiduri	Diagnostic		Tratament
	Teste de diagnostic	Screening familial	
EASL, 2012	Scorul Leipzig, 2011 Cupru hepatic	Testare genetică a rudelor de gradul I	Terapie cu chelatori +/- Zn
PCN 253, 2016	Teste clinice, biochimice, biopsie hepatică, cupru în țesut hepatic	Nu este analizată opțiune de screening familial	Terapie cu chelatori
ESPGHAN, 2018	Teste clinice și biochimice, scor Leipzig Cuprul hepatic	Evaluare clinică și Testare genetică a rudelor de gradul I	Terapie cu chelatori +/- Zn
INASL, 2019	Scor Leipzig modificat, 2019 Istoric familial, ceruloplasmina < 5 mg/dl	Testare genetică a descendenților probandului cu BW Testarea prenatală nu este recomandată	Terapie cu chelatori +/- Zn
BASL, 2022	Teste clinice, biochimice, genetice Scorul Leipzig, 2011	Testare genetică a rudelor de gradul I	Terapie cu chelatori +/- Zn
AASLD, 2022	Teste clinice, biochimice, genetice (triada biochimică) Scorul Leipzig, 2011	Testare genetică a rudelor de gradul I	Terapie cu chelatori +/- Zn

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 (EASL, ESPGHAN, INASL, BASL, AASLD), cât și cele regionale (PCN 258). Elaborarea algoritmului de diagnostic a întrunit elementele cheie ale cercetării noastre, și anume evaluarea suspectilor 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 uscat); 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 egal sau mai mare de 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 (anexa 20). O altă perspectivă prezintă și algoritmul de screening familial în boala Wilson (anexa 21). Este o componentă obligatorie conform recomandărilor actuale, dar și posibilităților actuale. Aceste nu se regăsesc în PCN 238: Boala Wilson la copil.

3.5. Concluzii capitolul 3

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. Profilul genetic este predominat de heterozigotul compus (54,3 %). Cele mai multe mutații sunt la nivelul exonului 8, iar varianta cea mai comună este de tip *missense* (în 86,04 %). Varianta *p.H1069Q* este prezentă la 34 pacienți (64,1%).
3. Variantele mutaționale severe (*frameshift/nonsense*) au fost asociate cu fenotipul hepatic și mixt, o evoluție severă a bolii hepatice, un nivel mai redus al Cp serice și a Cu urinar.
4. Fenotipul neurologic a fost asociat cu profilul *p.H1069Q*, iar cel hepatic cu profilul *non-p.H1069Q*.
5. Profilul *p.H1069Q* este asociat cu debut mai devreme, diagnostic precoce, un nivel de ceruloplasmină serică și cupru urinar mai ridicat comparativ cu profilul *non-p.H1069Q* ce se prezintă cu un debut mai tardiv, durata de diagnostic mai lungă, un nivel de Cp serică și Cu urinar mai redus.
6. Homozigoții recesivi *p.H1069Q* se prezintă cu un debut tardiv, o durată de diagnostic mai lungă, un nivel de Cp serică și Cu urinar mai scăzut decât în cazul heterozigoților compuși care se asociază cu un debut precoce, o perioadă mai scurtă de diagnostic, un nivel de Cp serică și Cu urinar mai ridicat.
7. 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 pacienți a fost identificată o mutație foarte rară, *p.Phe764=*.
8. 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 presimptomatică a bolii.

4. DISCUȚII

Teoretic este clar că stabilirea diagnosticului de BW este de obicei simplu la un copil cu manifestări hepatice sau la un adult cu modificări ale personalității și tulburări de mișcare, atunci când este asociat cu triada biologică clasică: Cp scăzută, Cu seric scăzut și excreție urinară crescută de Cu în 24h. Dar realitatea este diferită. Studiile demonstrează că diagnosticarea acestei boli hepatice rare rămâne dificilă, nu doar din considerentele nerekunoașterii acestei boli, dar și din motivul variabilității testelor biologice și manifestărilor clinice. Astfel, timpul mediu dintre primele simptome și diagnostic depășește de obicei 2 ani. Desigur, raritatea bolii este motivul principal al lipsei de conștientizare a medicilor și, prin urmare, diagnosticarea greșită și întârzierea diagnosticului. Prevalența clinică a BW este scăzută, estimată a fi 30/100000 – 20/100000 în țările europene. Mai mult, prezentările atipice pot agrava și subestima diagnosticul. Provocările pentru stabilirea unui diagnostic corect al BW sunt multiple și diverse. Una dintre direcțiile care ar putea reduce din provocările conduitei BW este identificarea unei posibile interrelații dintre statutul genetic și cel clinic la pacienții cu BW.

Cercetarea efectuată de noi este un prim studiu dedicat interrelației clinico- genetice al pacienților cu BW din țara noastră. Astfel, noi am înaintat scopul direcționat spre evaluarea relaționării între componenta genetică și cea clinică la pacienții Wilsonieni originari din țara noastră, în același timp analizând particularitățile demografice, clinice, evolutive și genetice la acești pacienți. Este un studiu amplu care valorifică atât depistarea timpurie a pacienților, utilizând metodele neinvazive, dar și accentuează rolul screening-ului familial în managementul acestei boli. Înrolarea în studiu a trecut prin 2 etape, etapa de pre-screening și etapa de screening. Activitatea de pre-screening a avut loc inițial, înainte de consimțământul informat al pacientului, atunci când a fost revizuit registrul pacienților cu BW suspectată. Astfel, după identificarea a 173 de pacienți suspecti, am revizuit criteriile de includere și excludere, determinând grupul de cercetare. În etapa de screening am utilizat scorul Leipzig pentru definirea diagnosticului. Ca și grup de cercetare au fost selectați 53 de pacienți. Parcurgând etapa de pre-screening am putea să evidențiem că suspectarea BW bazată pe clinică sau biologie, necesită suplimentarea investigațiilor pentru a stabili diagnosticul final. Astfel, nu orice scădere de Cu seric sau Cp definește boala Wilson. Despre erorile în interpretarea rezultatelor analizelor de laborator am descris detaliat în capitolul INTRODUCERE.

Rezultatele obținute în studiul nostru de cohortă, marchează unele particularități demografice la pacienții cu BW din țara noastră. Este o boală rară întâlnită la copii și la adulți (18 pacienți cu vârsta mai mică de 18 ani, dintre care 6 copii cu vârsta până la 10 ani), cel mai mic pacient – 5 ani debut hepatic, *p.H1069Q/p.G1341D*, cel mai în vârstă – 46 ani, cu profil neurologic, scor Leipzig

4 (nu necesită testare genetică). Distribuția pe sex este în favoarea bărbaților (1.5 bărbați la 1 femeie). Reprezentativă este și predominarea originii sudice și centrale a țării. Un element important din studiul nostru este că diagnosticarea BW are loc preponderent la vârsta de 25-29 ani. Iar, durata medie a perioadei de diagnostic a fost de $26,8 \pm 35,77$ luni, intervalul de diagnostic variind între 1 - 96 luni. Acest fenomen este întâlnit în toate țările. Savanții care raportează rezultatele evaluării pacienților cu BW, descriu un interval de 2-5 ani de întârziere a diagnosticului clinic. În cohorta germană de 137 de pacienți simptomatici cu BW diagnosticați între 1957 și 2005, decalajul mediu dintre primele simptome și diagnostic a fost de 25,3 luni. O proporție de 60,3% au fost diagnosticați în decurs de 1 an, 68,2% în 2 ani și la 22,5% din totalul pacienților, diagnosticul a fost stabilit la 3 ani de la apariția simptomelor inițiale. Iar, prezentarea neurologică a fost asociată cu un timp semnificativ mai lung de la debutul simptomelor până la diagnostic decât prezentarea hepatică, variind de la 2,5 la 6 ani [159]. Rezultatele noastre evidențiază că întârzierea diagnosticului se asociază cu debutul neurologic (diagnosticat la o vârstă medie de $26,5 \pm 9,92$ ani), care mai frecvent se stabilește la sexul masculin (73%), iar debutul hepatic a fost evidențiat la ambele sexe (cu o tendință mai mare la sexul feminin), cu diagnosticarea definitivată la vârste mai mici ($16,8 \pm 9,81$ ani). BW este o boală foarte eterogenă. Există încă o lipsă de cunoștințe suficiente cu privire la istoria naturală a pacienților cu BW netratați. Este bine cunoscut faptul că BW are tendința spre o vârstă fragedă de debut, deoarece majoritatea diagnosticelor sunt puse între 5 și 35 de ani. Rezultatele noastre au demonstrat că distribuția de vârstă în populație a fost foarte similară cu cea din rapoartele anterioare [160, 161]. În studiul nostru, a existat o predominanță masculină în prevalența acestei afecțiuni la adulți. Interesant, nu a fost observată nicio diferență semnificativă de gen în copilărie. Aceste descoperiri indică faptul că hormonii sexuali pot juca un rol în patogeneza BW, estrogenii exercitând efecte antioxidante, neurotrofice și antiinflamatorii [161]. Gromadzka și colab. a demonstrat că diferențele în metabolismul fierului pot fi asociate cu eterogenitatea clinică legată de sex [162].

Rezultatele studiului nostru demonstrează că după examinarea repetată, boala hepatică a fost diagnosticată la 52,17% dintre cei cu debut neurologic; iar la cei cu debut hepatic au fost depistate leziuni neurologice la 16,7%. La 58,82%, dintre pacienții cu fenotipul hepatic a fost reprezentat de ciroza hepatică, iar din manifestările neurologice, cele mai frecvent au fost sindromul pseudobulbar (disfagie, disartrie) în 35% și tremorul membrelor în 30%. IKF a fost identificat la 32%, dintre care 75% a fost asociat cu leziuni neurologice. Splenomegalia a fost identificată la 58,54%, dintre care 79,17% au fost asociate cu hepatomegalie. Un pacient a suferit un transplant de ficat din cauza IHA, un alt pacient a avut tulburări asociate de ritm cardiac, iar un alt pacient a prezentat modificări osteo-articulare. Insuficiența hepatorenală acută urmată de deces a fost stabilită la un pacient cu BW tratat mai mulți ani cu terapie chelatorie. O analiză amplă, publicată

de Gow P.J și coautorii, efectuată pe o durată de trei decenii a prezentat constatările clinice și de laborator ale 30 de pacienți cu BW [163]. 22 de pacienți au prezentat manifestări hepatice (8 au prezentat insuficiență hepatică fulminantă), 3 - boală neurologică și unul cu anemie hemolitică; patru erau frați asimptomatici ai pacienților cu BW. 70% au fost diagnosticați în termen de 6 luni de la debutul simptomelor, dar diagnosticul a fost amânat cu până la nouă ani. Intervalul de vârstă la diagnostic a fost larg (7-58 de ani), iar 5 pacienți aveau peste 40 de ani. La pacienții care prezentau boală non-fulminantă, 18% nu prezentau nici IKF, nici concentrații scăzute de Cp. Concentrații crescute de Cu din ficat au fost găsite la toți pacienții, cu excepția unuia, care au suferit șase ani de tratament cu D-penicilamină. În insuficiența hepatică fulminantă (n=8), caracteristicile suplimentare utile în diagnostic au inclus dovezi ale hemolizei, creșterea Cu urinar (interval 844-9375 $\mu\text{g}/24\text{ h}$) și un Cu ridicat non-Cp (interval 325-1743 $\mu\text{g}/\text{l}$) [163].

Desigur că diagnosticul BW depinde încă în primul rând de evaluarea dovezilor clinice și de laborator ale metabolismului anormal al Cu. Nici o caracteristică nu este de încredere, dar diagnosticul poate fi pus de obicei cu condiția să fie suspectat. Urmare analizei noastre putem să concluzionăm că indicii biologici cunoscuți ca definatorii pentru BW, sunt insuficienți la o mare parte de pacienți în stabilirea diagnosticului definitiv. S-a observat că doar 42.5 % dintre pacienți prezintă triada biologică clasică (Cp scăzută, Cu seric scăzut și Cu urinar în 24h sporit), alții 57.5 % dintre pacienți nu au prezentat modificări biologice sau au prezentat doar o modificare. În studiul nostru se observă o relație dintre fenotipul hepatic și Cu seric scăzut, excreția de Cu în 24h sporită, dintre fenotipul neuro-psihiatric și nivelul Cp scăzute.

Este cunoscut că Cp serică este, de asemenea, un reactant de fază acută și poate fi fals crescută în prezența sepsisului, fals scăzută în insuficiența hepatică fulminantă de orice etiologie, boala hepatică avansată, boala celiacă și a-Cp-emia, sindromul nefrotic și 20% din heterozigoți [164]. Cu seric poate fi redus în majoritatea bolilor hepatice, din cauza necrozei hepatocitare. Doar în combinație cu Cp scăzută, fiind colectate în același timp poate fi suspect pentru BW. În alte afecțiuni hepatice, cum ar fi hepatita autoimună, boala hepatică colestatică cronică și insuficiența hepatică acută fulminantă de orice etiologie pot da naștere la o excreție mare de Cu în urină de 24 h. Excreția bazală de Cu poate fi scăzută la copii și frații asimptomatici, astfel încât o valoare normală nu exclude BW. Rezultate false se pot obține și în cazul colectării necorespunzătoare a urinei. Rezultatele false pot fi obținute și în cazul măsurării Cu în țesutul histologic [164]. Scorul Leipzig (propus în 2001), mai mare de 4 este foarte sugestiv pentru BW, în timp ce un scor de 2-3 ar merita investigații suplimentare, iar un scor mai mic de 1 face ca diagnosticul de BW să fie puțin probabil [89]. Există dificultăți practice în implementarea scorului Leipzig în țările în curs de dezvoltare. Cuprul hepatic nu este universal disponibil și este inconsecvent în raportare.

Testarea genetică este complicată și specifică regiunii. Majoritatea regiunilor nu raportează mutații. Provocarea cu D-penicilamină nu este validată în toate categoriile de vârstă. De aceea, noi am utilizat în cercetare scorul Leipzig modificat (2019) validat în mediul asiatic, care a dat importanță istoricului familial, puncte mai mari pentru IKF și un scor suplimentar pentru un nivel de $Cp < 5 \text{ mg/dL}$ [132]. Experții europeni au estimat că valorile calculate ale „Cu liber” au o valoare mai mare în monitorizarea efectelor tratamentului decât în diagnosticarea BW [165]. O concentrație „Cu liber” de $\geq 5 \text{ } \mu\text{g/dL}$ ($\geq 50 \text{ } \mu\text{g/L}$) poate indica epuizarea sistemică a Cu, care poate apărea la unii pacienți aflați în tratament pe termen lung [166].

O atenție deosebită în cercetare a fost dedicată profilului genetic al pacienților cu BW. Dintre cei 53 de pacienți stabiliți cu BW, 49 de pacienți au fost testați genetic (utilizând metoda de secvențiere Sanger). 46 pacienți au prezentat mutații, dintre care o singură mutație – 5 pacienți, 2 mutații – 37 pacienți și 3-6 mutații – 4 pacienți. Cele mai multe variante mutaționale au fost de tip heterozigot compus. Se observă că cele mai multe mutații sunt identificate la nivelul exonului 8. Varianta de tip substituție (*missense*) este întâlnită în 88.6 %. Cea mai frecventă alelă (52%) se află la nivelul exonului 14 – varianta *p.H1069Q*, prezentă la 34 pacienți (64.15%). Predominanța acestei variante este de heterozigot compus (52.94 %), urmată de cea de homozigot recesiv (47.05 %). Varianta *p.H1069Q* este dominantă la pacienții din sudul (50%) și centrul țării (80%). Varianta de mutație *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). Observăm că în studiul nostru predomină statutul de heterozigot compus, ceea ce poate fi un indiciu de lipsă a consangvinității. Mutațiile homozigote recesive mai frecvent au fost raportate la persoanele de origine indiană și arabă [21, 166]. Mutațiilor detectate în cercetarea pacienților egipteni [166] au fost găsite în starea homozigotă recesivă la majoritatea pacienților (42 de pacienți din 26 de familii independente). Autorii explică acest fenomen prin procentul mare de consangvinitate din acest studiu (75%) în comparație cu consangvinitatea în populația egipteană (32-35%). Datele noastre evidențiază că mutațiile de tip heterozigot compus se asociază predominant cu fenotip mixt, urmat de fenotipul neurologic, pe când profilul genetic de homozigot recesiv se asociază mai frecvent cu fenotipul hepatic și cel fenotipul mixt. Afecțiunea hepatică a fost asociată cel mai frecvent cu varianta *p.H1069Q* diagnosticarea bolii a fost mai tardivă la pacienții cu varianta non-*p.H1069Q*. Clasificând pacienții cu BW testați genetic din cohorta noastră în grupul *p.H1069Q* și cei non-*p.H1069Q*, am observat că există unele particularități clinice. În grupul *p.H1069Q* mai frecvent a fost observat fenotipul mixt ($p < 0,01$), urmat de fenotipul neurologic, diagnosticarea mai tardivă a bolii a fost în grupul non-*p.H1069Q* ($24,67 \pm 9,31$ vs. $20,03 \pm 8,71$ ani; $p < 0,01$). Un prim studiu

[79, 167] despre profilul genetic al BW în țara noastră a fost efectuat de echipa dnei Dr. Victoria Sacară (din cadrul Laboratorului de Genetică, Institutul Mamei și Copilului, Moldova), care a evaluat 40 de pacienți moldoveni suspecți de BW (suspecție clinică și/sau biochimică) și au fost supuși analizei genetice, inclusiv PCR-SSCP pentru exonii 8, 14 și 20 cu o rată mare de mutații patologice. În consecință, analiza genetică avansată a fost efectuată prin secvențierea ADN-ului genomic „Sanger” (3500dx Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc.) folosind Big Dye Terminator 3.1 pentru confirmarea sau specificarea anomaliilor dacă acestea au fost prezente sau pentru a căuta mutații în ceilalți exoni, începând cu regiuni hotspot (4, 8, 12, 13, 14, 15, 17 și 20 de exoni în gena ATP7B). În timpul tehnicii SSCP au fost observate anomalii la 14 (22%) și 20 (9%) exoni. Datorită faptului că PCR-SSCP nu poate identifica modificarea exactă, a fost utilizată secvențierea ADN. Rezultatele au relevat mutația *p.H1069Q* în exonul 14, fiind una dintre cele mai frecvente mutații din această cohortă (11%). Alte variante patologice identificate în grupul BW au fost *p.G1341D* (3,2%) și *p.G1341V* (1,6%) în exonul 20, *p.H1207R* (1,6%) și *p.A1227T* (1,6%) în exonul 17 al genei ATP7B. Alături de aceste mutații, unele variante genetice nepatogene au fost detectate la pacienții cu BW ca *p.V456L* (exonul 3), *p.R952K* (exonul 12), *p.K832R* (exonul 10) și *p.V1140A* (exonul 16). Varianta *p.R952K* din exonul 12 a fost identificată în 66% din probele de ADN analizate, fiind cel mai frecvent polimorfism. Autorii au conchis că secvențierea Sanger este un instrument eficient în diagnosticul BW care permite identificarea unui spectru larg de variante genetice patogene și nepatogene. Cea mai frecventă mutație patologică la pacienții moldoveni cu BW a fost *p.H1069Q* [167].

BW este o tulburare monogenică cauzată de variante bialelice în gena ATP7B. Testarea genetică este indicată pentru confirmarea diagnosticului, screening-ul în familie și în cazurile neclare suspectate că suferă de BW. Deoarece prezentarea clinică a BW este variată în rândul celor care sunt afectați și nu toți cei care au mutații ale genei ATP7B prezintă manifestări clinice, procesul de diagnosticare este adesea anevoios. Detectarea variantelor genei ATP7B care cauzează boli la o persoană cu caracteristici clinice și biochimice (Cp scăzută, excreție urinară crescută de Cu de 24 de ore și concentrație hepatică de Cu) este o confirmare a bolii [2]. Studiile arată că prevalența genetică a BW este mai mare (1:7026), în timp ce prevalența clinică istorică este mai mică la 1:30000. Mai mulți factori pot contribui la această discrepanță. Prin secvențierea întregii regiuni de codificare și a locus-urilor de îmbinare adiacente ale ATP7B la 1000 de subiecți - control din Marea Britanie, frecvența purtătorilor cu două mutații patologice ATP7B a fost estimată la 1:7026 [72]. În plus, un alt studiu din Franța a arătat o frecvență ridicată a purtătorilor heterozigoți de mutație ATP7B dând o prevalență de 1:31 subiecți [168]. Autorii au explicat această discrepanță parțial din cauza variabilității clinice a BW cu penetranță incompletă și

existenței genelor modificatoare. Dacă aceste observații pot fi replicate, este posibil ca mulți pacienți cu BW să aibă doar simptome foarte subtile și să fie detectați numai prin screening genetic.

Evaluarea variantelor patogene la pacienții din cohorta noastră a identificat predominarea variantei *missense* (86,04%) și *frameshift* (6,97%). În grupul nostru au mai fost identificate și varianta *nonsense* (3,5%) și *silentioasă/sinonimă* (3,5%). Rezultatele obținute sunt foarte interesante, fiind un prim tablou a ceea ce se întâmplă în genetica BW din țara noastră. Este bine cunoscut că variantele patogene ATP7B pot fi împărțite în următoarele grupe: *missense*, *nonsense*, *frameshift* și *splicing*. Variantele patogene *nonsense*, *frameshift* și *splicing* conduc la moartea pacientului în primele etape ale vieții sale, astfel încât atenția cercetătorilor se concentrează asupra variantelor patogene *missense*. Se observă, că la pacienții cu varianta *frameshift* (7 pacienți), a predominat fenotipul mixt (3 pacienți), cu debut neurologic (1 pacienți vs 3 pacienți cu debut hepatic), la vârsta medie de $20,29 \pm 10,55$ ani, 1 pacient a decedat la vârsta de 26 de ani, 4 pacienți sunt stabiliți cu ciroză hepatică decompensată. IKF nu a fost identificat la 3 pacienți. Biologic predomină scăderea Cp și creșterea Cu urinar. Rezultatele obținute în studiul lui Gromazdka și colegii, la evaluarea a 142 de pacienți cu BW diagnosticați clinic, biochimic și genetic au evidențiază că din cele 26 de mutații ai genei ATP7B; 11 - au fost mutații *frameshift/nonsense*; clasificate ca mutații „severe”, iar 14 au fost mutații *missense* și 1 a fost o mutație *splicing*. Pacienții cu varianta de mutație *frameshift/nonsense* aveau Cu seric și Cp mai mici și erau mai tineri când au apărut primele simptome ale bolii, în comparație cu indivizii cu mutația *missense*. Acest studiu a concluzionat că mutațiile din ATP7B sunt foarte eterogene. Mutațiile *frameshift* și *nonsense* sunt asociate cu un fenotip sever al BW [162, 168]. În lotul cu predominarea mutației *missense* din studiul nostru a fost identificat fenotipul mixt, urmat de cel neurologic și hepatic. Datele cercetătorilor indică că mutațiile *missense* au ca rezultat fenotipuri mai ușoare în comparație cu mutațiile *frameshift* și *nonsense*, dar nici acest lucru nu a fost fundamentat. Iar BW cu fenotip neurologic și debut tardiv poate apărea fără nicio dovadă de implicare a ficatului [169].

Pentru noi un interes substanțial a fost evaluarea fenotip-genotip la pacienții cu BW. Ne-am propus să identificăm dacă este posibilă ca diversitatea expresiei fenotipice să fie legată de eterogenitatea alelică, care de fapt ar putea fi împiedicată de numărul mare de mutații ale genei ATP7B detectate până acum. Datele recente aduc atât argumente pentru lipsa unei corelații, dar și unele dovezi în favoarea acesteia. Astfel, studiile se pronunță pentru o corelare bună în prezența mutațiilor specifice care pot afecta procesele individuale de detectare a Cu, traficul mediat de Cu și transportul Cu și că o astfel de variabilitate poate contribui la diversele manifestări clinice ale BW [170]. Iar lipsa corelației genotip-fenotip în BW este argumentată prin > 900 de mutații cunoscute ale genei ATP7B, iar marea majoritate a pacienților sunt heterozigoți compuși.

Deoarece majoritatea mutațiilor sunt rare, au fost raportate puține date despre fenotipurile homozigoților recesivi. Rezultatele studiului efectuat de Stapelbroek J. și echipa prezintă că doar 1/3 dintre cei 1235 de pacienți cu BW, preponderent caucazieni (originari din Europa Centrală și de Est), sunt homozigoți recesivi [171]. În acest studiu, care de fapt este unul din cele mai mari cercetări cu privire la evaluarea genetică a pacienților cu BW (efectuate la Universitatea din Viena), este vizibilă predominarea homozigoților *p.H1069Q*, care reprezintă 25% dintre pacienții cu BW. Homozigoții *p.H1069Q* s-au prezentat mai frecvent la o vârstă mai înaintată cu simptome neurologice. Alte corelații genotip-fenotip nu au fost depistate [171]. Un alt studiu, publicat recent de cercetătorii din Finlanda [172] prezintă datele obținute la analiza corelației genotip-fenotip într-o cohortă retrospectivă de pacienți finlandezi. De fapt au fost evaluați 17 pacienți cu BW, testați genetic: 6 pacienți erau homozigoți recesivi și 11 heterozigoți compuși. În acest studiu nu au fost identificate diferențe ($p > 0,30$) în prezența sau absența simptomelor hepatice, neurologice, psihiatrice între pacienții homozigoți și cei heterozigoți. Totuși pacienții homozigoți (6 pacienți) au avut o vârstă mai devreme de diagnosticare (mediană 6,7 față de 34,5; $p = 0,003$). De asemenea s-a observat că boala hepatică severă se determină exclusiv la pacienții cu varianta *p.H1069Q*. În acest studiu este semnificativă relația dintre *p.H1069Q* și vârstă medie de diagnosticare mai târzie ($30,2 \pm 11,6$ vs. $8,7 \pm 4,9$ ani; $p < 0,001$) comparativ cu cei fără această mutație [172].

Atribuirea unui fenotip specific unei anumite mutații ajută la prezicerea modelului de progresie a bolii, a vârstei aproximative de apariție a simptomelor și facilitează monitorizarea răspunsului la terapie.

Datorită modelului de moștenire recesiv al BW, incidența sa este mai mare în populațiile cu căsătorii consangvine. Nici un pacient din studiul nostru nu a relatat despre prezența consangvinizării părinților sau bunelor. Nu putem afirma veridicitatea acestui fenomen, deoarece acestea au fost datele raportate de bolnavi. În majoritatea studiilor publicate prezența consangvinității este raportată în 25-30% cazuri. Astfel, Mohammed Al Fadda și coautorii [173] prezentând datele a 71 de pacienți cu BW din Arabia Saudită, urmăriți pe o perioadă de 3 decenii, evidențiază vârsta medie $16,8 \pm 10,7$ ani și 56,5% fiind bărbați, istoricul familial de BW a fost pozitiv la 41 pacienți (57,7%), iar consangvinitatea părinților a fost găsită la 26 pacienți (36,6%) [173]. Un alt studiu, a evaluat 40 de pacienți cu BW din Pakistan, dintre ei 95% cazuri aparțineau unor familii consangvinizate, 82,5% fiind produse ale căsătoriilor de veri primari. Această observație este atribuită gradului ridicat de consangvinitate, principal determinant al incidenței mari a tulburărilor recesive în populația Pakistaneză [174]. Studiile epidemiologice sugerează o prevalență clinică mai scăzută a BW în țările europene unde gradul de consangvinitate este scăzut, estimată fiind între 12 -20:1000000 [168].

Rezultatele analizei cohortei noastre de pacienți evidențiază și importanța screening-ului familial la acești pacienți. Anamnesticul eredo-colateral familial agravat prin prezența BW, a fost identificat la 16 pacienți cu BW. Totodată 13 familii din studiul nostru au fost examinate în vederea identificării membrilor bolnavi cu BW. Majoritatea probanzilor sunt originari din sudul țării (7/12 pacienți). Ca rezultat al evaluării în 6 din 12 familii implicate în studiu, au fost identificați 8 membri noi cu BW (6 bărbați și 2 femei). 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). Tabloul clinic a identificat - 7 pacienți asimptomatici, iar un pacient a avut simptome neurologice, dar nu au fost incluși în nici o nozologie până la momentul dat. Mutația predominantă a fost *p.H1069Q*, de tip homozigot recesiv, iar la unul din pacienți a fost identificată o mutație foarte rară *p.Phe764=*. 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 diagnostic survenind prin screening 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 hepato-splenomegalie 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 o terapie specifică. Detectarea unei mutații foarte rare, *p.Phe764=*, în timpul screening-ului familial, prezintă o valoare importantă pentru explicația geneticii neconcludente și variate din BW. Doar în 2 studii a fost raportată această mutație, atribuindu-se rolul patogen. Astfel cercetarea bulgară, identifică 2 pacienți cu această mutație [175], iar studiul din Marea Britanie a raportat că unul din 100 de pacienți cu BW are o variantă genetică sinonimă (*p.Phe764=*), care nu a fost recunoscută anterior precum cauzatoare de boală. 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. Astfel, acest studiu concluzionează că mutația respectivă este patogenă și poate produce boala [157].

În lucrarea noastră am publicat o serie de cazuri clinice, care încă odată demonstrează necesitatea screening-ului familial în BW. Am adus și exemple excepționale, rar întâlnite cu mutație moștenită pseudo-dominant la membrii unei familii care include 3 generații. Deși acesta nu este un tipar tipic pentru tulburările autozomal recesive, poate apărea, în special atunci când frecvența purtătoarei este la fel de mare ca cea observată în BW. În plus, această familie evidențiază importanța testării genetice în diagnosticarea BW, deoarece testarea genetică a fost folosită pentru a confirma diagnosticul la doi indivizi asimptomatici care, datorită aceluși test, vor fi menținute pe terapii eficiente, salvatoare. Prezența mai multor generații afectate este atipică

pentru tulburările autozomale recesive. În absența consangvinității, șansele ca aceasta să apară sunt legate de frecvența purtătorului populației. Această familie evidențiază faptul că, cu o frecvență purtătoare estimată de 1:90, BW nu este rară [168]. Având în vedere această frecvență purtătoare, șansa ca un individ cu BW să aibă un copil afectat este de $\frac{1}{2} \times \frac{1}{90}$, iar șansa de a avea un copil și un nepot afectați este de $\sim 0,003\%$. Cazul nostru este, după cunoștințele noastre, este unic în Europa, la o familie, care nu relatează consangvinitate, și care prezintă varianta de heterozigot compus. De asemenea, subliniază utilitatea analizei secvenței ATP7B în confirmarea unui diagnostic de BW, în special atunci când există un istoric familial pozitiv. Cazurile clinice prezentate sunt ca exemple pentru a evidenția problemele de zi cu zi întâlnite de (interacțiunile dintre) pacienți, clinicieni și oameni de știință în cazul BW. Descrierea cazurilor clinice atenționează unele probleme de etapă, care rămân deschise. Astfel, aici voi aduce câteva întrebări, care au reieșit din cazurile prezentate în teză.

- Putem identifica un standard de aur pentru diagnosticul BW?
- Sunt testele disponibile în prezent adecvate pentru a distinge rapid BW de alte boli hepatice cronice?
- Cum putem identifica pacienții cu BW care sunt expuși riscului de deteriorare neurologică sau hepatică?
- Ce strategii previn sau atenuează severitatea deteriorării neurologice sau hepatice după inițierea tratamentului la pacienții cu BW?
- Ar trebui să facem un examen RMN cerebral la pacienții cu fenotip hepatic, în special la cei cu un examen neurologic normal?
- Cât de frecvent trebuie monitorizați pacienții cu fenotip hepatic?
- Care strategie aplicăm în cazul tranziției pacientului pediatric cu BW care atinge majoratul și trebuie transferat la un sistem medical pentru adulți?

Un alt aspect al tezei respective, este atitudinea pacientului către boala sa, în special atunci când pacientul cu debut pediatric devine adult și necesită îngrijire la etapa de adult. De fapt, aceste întrebări au fost colectate de la pacienții cu BW, care au participat la școlarizările pacientului cu boală rară, organizate de Alianța pentru Boli Hepatice Rare din Moldova.

Din perspectiva pacientului cu BW, la fel sunt câteva întrebări care trebuie soluționate:

- Când putem avea încredere în sfaturile specialiștilor noștri din domeniul sănătății?
- Când ar trebui să căutăm o a doua opinie?
- Cum ne putem ajuta specialiștii noștri din domeniul sănătății să ajungă la un diagnostic precis și precoce?

- Ce putem face pentru a crește gradul de conștientizare cu privire la necesitatea centrelor de experți?
- Cum putem să ne încadrăm eficient în autogestionarea bolii, și unde putem deprinde aceste abilități de autoîngrijire?
- Cum putem educa profesioniștii din domeniul sănătății astfel încât să ia în serios preocupările noastre și să fie dispuși să solicite sfaturi de specialitate atunci când este necesar?

Pentru a ajuta pacienții supravegheați de noi, am publicat primul ghid de îngrijire a pacientului cu BW: "Ghidul pacientului cu boala Wilson", realizat în limba română și rusă. Este un pas important direcționat spre îmbunătățirea calității vieții pacientului cu BW. [175]

Evaluarea cohortei de pacienți cu BW a adus în atenția specialiștilor nu doar unele aspecte specifice a acestei boli, dar și câteva provocări, care ar trebui considerate în managementul actual al pacienților cu BW. În managementul clinic al BW, monitorizarea clinică amănunțită, inclusiv detectarea precoce a potențialelor efecte secundare medicale și a eșecului terapiei este crucială pentru a îmbunătăți motivația și aderența pacientului. Una din provocări este recunoașterea simptomelor atipice sau rare ale BW care vor duce la diagnosticul precoce. O altă provocare este de a confirma diagnosticul mai rapid, de a nu întârzia inițierea tratamentului și de a extinde screening-ul în familie, deoarece prevalența genetică este mai mare decât cea anterior expusă.

Screening-ul familial va trebui să fie regândit și extins deoarece expresia fenotipică este foarte variabilă, chiar și în cadrul aceleiași familii. În prezent, rudele de gradul I ale oricărui pacient nou diagnosticat cu BW trebuie să fie testate pentru BW, deoarece șansa ca un frate să fie homozigot sau heterozigot compus este de 25%. În rândul descendenților, riscul este scăzut (0,5%), dar analiza genei ATP7B pentru mutații la copiii unui pacient indexat este, de asemenea, justificată având în vedere potențialul BW. Orientările viitoare vor recomanda probabil să fie examinați și părinții, deoarece a fost raportată moștenirea „pseudo-dominantă” (am prezentat acest caz anterior), împreună cu unchi, mătușile și nepoții.

Urmare a acestui prim studiu, am înaintat un algoritm de diagnostic al BW, bazat pe secvențierea Sanger și screening-ul familial. Iar o componentă importantă a acestui algoritm este integrarea în diagnosticul bolii a fenotipării pacientului și a îngrijirii multidisciplinare în cazul pacientului cu BW. În algoritmul creat de noi este descris care este traiectoria pacientului suspectat pentru BW. Astfel, de la etapa de suspect (identificat prin criterii clinice și sau biologice), pacientul urmează a fi evaluat conform scorul Leipzig, și dacă întrunește <1 puncte atunci acest pacient decade din etapa următoare și va fi evaluat pentru excluderea altor boli „like – BW”, dacă se obțin 2-3 puncte atunci pacientul este direcționat pentru testarea genetică (aplicând metoda Sanger, iar

la un punctaj egal sau >4 puncte acestui pacient poate fi prescris tratament sau opțional se poate recomanda testarea genetică. Toți pacienții confirmați cu BW, sunt stratificați în funcție de varianta mutațională. Astfel, cei identificați ca și sănătoși, sunt excluși din evaluarea ulterioară specifică BW. Pacienții confirmați ca și heterozigoți compuși sau homozigoți recesivi vor fi supuși ulterior tratamentului, dar și screening-ului familial. Un alt algoritm propus de noi este dedicat screening-ului familial al pacientului cu BW.

5. 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 boala 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 boala 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 Inherit 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. Cocoş R, Şendroi A, Schipor S, Bohîlţea LC, Şendroi 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. Poujois A., Woimant F. Wilson's disease: A 2017 update. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. December 2018; 42 (6): 512-520.
15. Dooley J.S., Purchase R. Wilson Disease. In: *History of Wilson Disease*. Elsevier Inc., 2019. DOI:10.1016/B978-0-12-811077-5.00001-3.
16. Sánchez-Monteagudo A. et al. Wilson's Disease: Facing the Challenge of Diagnosing a Rare Disease. *Biomedicines*. 2021, 9:1100. DOI: 10.3390/biomedicines9091100

17. Gomes A., Dedoussis G.V. Geographic distribution of ATP7B mutations in Wilson disease. *Annals of Human Biology*. 2016; 43(1):1-8. DOI: 10.3109/03014460.2015.1051492
18. Sandahl TD, Laursen TL, Munk DE, Vilstrup H, Weiss KH, Ott P. The Prevalence of Wilson's Disease: An Update. *Hepatology*. 2020 Feb; 71(2):722-732. DOI: 10.1002/hep.30911.
19. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*. 2008;47(6):2089-2111. DOI:10.1002/hep.22261
20. Gilroy RK. Wilson disease: epidemiology. *Medscape*. Updated February 14, 2019. Accessed February 08, 2024.
21. Bhattacharya, K., et Thankappan, B. Wilson's Disease Update: An Indian Perspective. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2022; 25(1), 43-53
22. Mainardi V., Karina Rando K., Valverde M., Olivari D., Castelli J., Rey G., Gerona S. Acute Liver Failure due to Wilson Disease: Eight Years of the National Liver Transplant Program in Uruguay. *Annals of Hepatology*. Jan-Feb 2019; 18(1): 187 – 192. DOI: 10.5604/01.3001.0012.7911
23. Bem RS, Muzzillo DA, Deguti MM, Barbosa ER, Werneck LC, Teive HA. Wilson's disease in southern Brazil: a 40-year follow-up study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66(3):411-6. DOI: 10.1590/s1807-59322011000300008.
24. Abbassi N., Bourrahout A, Bedoya EC, Belmalih A, El Hanafi FZ, Bost M et al. Epidemiology, clinical features, and mortality rate of Wilson disease in Moroccan children: A pediatric case series. *Arch Pediatr*. Aug 2022; 29(6):453-458. DOI: 10.1016/j.arcped.2022.03.010.
25. Haftu H., Mustefa M., and Gebrehiwot T. Zinc monotherapy as an alternative treatment option for decompensated liver disease due to Wilson disease? *Case Reports in Hepatology*. 2020 Jan 14; 2020:1275940. DOI: 10.1155/2020/1275940.
26. Bekele N., Ewnetu F., Tigest H., Tegegne Z. et Tadess A. Wilson's disease: Diagnosis of Wilson's disease in Ethiopian young sisters. *Case Reports in Medicine*. Jul 2020.
27. Dumas M, Girard PL, Jacquin-Cotton L, Konaté S. Premier cas de maladie de Wilson au Sénégal [1st case of Wilson's disease in Senegal]. *Bull Soc Med Afr Noire*. 1970; 15(1):96-9. PMID: 5508491.
28. Esezobor C. I., Banjoko N., Rotimi-Samuel A. and Lesi F.E.A. Wilson disease in a Nigerian child: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2012; 6 (1): pp. 200–202
29. Jamal I. and Rajula A. Wilson Disease in a young Kenyan adult. *South African Gastroenterology Review*. Aug 2019; 17 (2). DOI: 10.10520/EJC-178b256a3f
30. Aboalam, H. S., Hassan, M. K., Ibrahim, N. F., Ali, A. M., Hassan, W., Ghanem, E., Elsaghier, A., Hetta, H. F., & Elbadry, M. (2022). Wilson's disease clinic at the Assiut Liver Center in Egypt: A real well-established step on the way. *Egyptian Liver Journal*, 12(1), 1-5. <https://doi.org/10.1186/s43066-022-00205-z>
31. Iacob R, Iacob S, Nastase A, Vagu C, Ene AM, Constantinescu A. et al. The His1069Gln mutation in the ATP7B gene in Romanian patients with Wilson's disease referred to a tertiary gastroenterology center. *J Gastrointest Liver Dis*. 2012 Jun; 21(2):181-5. PMID: 22720308.

32. Lepori MB, Zappu A, Incollu S, Dessì V, Mameli E, Demelia L, et al. Mutation analysis of the ATP7B gene in a new group of Wilson's disease patients: contribution to diagnosis. *Mol Cell Probes*. 2012 Aug;26(4):147-50. DOI: 10.1016/j.mcp.2012.03.007.
33. Gheorghe L, Popescu I, Iacob S, et al. Wilson's disease: a challenge of diagnosis. The 5-year experience of a tertiary center. *Rom J Gastroenterol*. 2004 Sep; 13(3):179-85.
34. Makukh, H., Hayboniuk, I., Zarina, A. et al. Mutations in the ATP7B Gene in Ukrainian Patients with High Risk of Wilson's Disease. *Cytol. Genet*. 2020; 5:324–332.
35. Lekomtseva Y, Voloshyn-Gaponov I, Tatayna G. Targeting Higher Levels of Tau Protein in Ukrainian Patients with Wilson's Disease. *Neurol Ther*. 2019 Jun; 8(1):59-68. DOI: 10.1007/s40120-019-0134-3.
36. Poujois A, Woimant F, Samson S, Chaîne P, Girardot-Tinant N, Tuppin P Characteristics and prevalence of Wilson's disease: a 2013 observational population-based study in France. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2017; 42:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2017.05.011>.
37. Møller LB, Horn N, Jeppesen TD, et al. Clinical presentation and mutations in Danish patients with Wilson disease. *Eur J Hum Genet*. 2011; 19:935–941.
38. Giagheddu A, Demelia L, Puggioni G, et al. Epidemiologic study of hepatolenticular degeneration (Wilson's disease) in Sardinia (1902–1983). *Acta Neurol Scand*. 1985; 72:43–55.
39. Adhami EJ, Cullufi P. Wilson's disease in Albania. *Panminerva Med*. 1995; 37:18–21.
40. Reilly M, Daly L, Hutchinson M. An epidemiological study of Wilson's disease in the Republic of Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993; 56:298–300.
41. Park RH, McCabe P, Fell GS, Russell RI. Wilson's disease in Scotland. *Gut*. 1991; 32:1541–1545.
42. García-Villarreal L, Daniels S, Shaw SH, et al. High prevalence of the very rare Wilson disease gene mutation Leu708Pro in the Island of Gran Canaria (Canary Islands, Spain): a genetic and clinical study. *Hepatol*. 2000; 32:1329–1336.
43. Dedoussis GVZ, Genschel J, Sialvera T-E, et al. Wilson disease: high prevalence in a mountainous area of Crete. *Ann Hum Genet*. 2005;69 Pt 3:268–274.
44. Wijayasiri P, Hayre J, Nicholson ES, Kaye P, Wilkes EA, Evans J, Aithal GP, Jones G, Pearce F, Aravinthan AD. Estimating the clinical prevalence of Wilson's disease in the UK. *JHEP Rep*. 2021 Jul 7;3(5):100329. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100329.
45. Tai C-S, Wu J-F, Chen H-L, Hsu H-Y, Chang M-H, Ni Y-H. Modality of treatment and potential outcome of Wilson disease in Taiwan: a population-based longitudinal study. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. 2017; 117:421–426.
46. Lai C-H, Tseng H-F. Population-based epidemiologic study of Wilson's disease in Taiwan. *Eur J Neurol*. 2010; 17:830–833.
47. Cheng N, Wang K, Hu W, et al. Wilson disease in the South Chinese Han population. *Can J Neurol Sci*. 2014; 41:363–367.

48. Bonne-Tamir B, Frydman M, Agger MS, et al. Wilson's disease in Israel: a genetic and epidemiological study. *Ann Hum Genet.* 1990;54 Pt 2:155–168.
49. Choe, E.J., Choi, J.W., Kang, M. et al. A population-based epidemiology of Wilson's disease in South Korea between 2010 and 2016. *Sci Rep* 10, 14041 (2020).
50. Yamaguchi, H., Nagase, H., Tokumoto, S., Tomioka, K., Nishiyama, M., Takeda, H., Ninchoji, T., Nagano, C., Iijima, K., & Nozu, K. (2021). Prevalence of Wilson disease based on genome databases in Japan. *Pediatrics International*, 63(8), 918-922.
51. Cheung KS, Seto WK, Fung J, Mak LY, Lai CL, Yuen MF. Epidemiology and natural history of Wilson's disease in the Chinese: A territory-based study in Hong Kong between 2000 and 2016. *World J Gastroenterol.* 2017 Nov 21;23(43):7716-7726. DOI: 10.3748/wjg.v23.i43.7716.
52. Chang I.J., Hahn S.H. Handbook of Clinical Neurology, Vol. 142 (3rd series) Wilson Disease. In: The genetics of Wilson disease. Elsevier Inc., 2017. pp. 19-34.
53. Fanni D., Pilloni L., Orrù S., Coni P., Liguori C., Serra S. et al. Expression of ATP7B in normal human liver. *Eur J Histochem.* Oct 2005; 49(4):371-8. DOI: 10.4081/965.
54. Camarata M.A., Si Houn Hahn. Wilson Disease. In: The genetics of Wilson disease. Elsevier Inc., 2019.
55. Jayakanthan S, Braiterman LT, Hasan NM, Unger VM, Lutsenko S. Human copper transporter ATP7B (Wilson disease protein) forms stable dimers in vitro and in cells. *J Biol Chem.* 2017; 292(46): 18760-18774. doi:10.1074/jbc.M117.807263
56. Scvortova E. Evaluarea expresiei genei ATP7B în liniile celulare CHO transgenice la nivelul proteinei. *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină.* 2014; 1(52):54-57.
57. 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]. *Arta Medica.* 2022;82(1):16-22. DOI: 10.5281/zenodo.6510173
58. Polishchuk RS. Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. In: Cellular Function of ATP7B (Wilson ATPase). Elsevier Inc., 2019.
59. Armer J., De Goede C. How to use tests for disorders of copper metabolism. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2017 Dec;102(6):319-327. DOI: 10.1136/archdischild-2016-310960.
60. Hirst J, Borner GH, Antrobus R, et al. Distinct and overlapping roles for AP-1 and GGAs revealed by the "knocksideways" system. *Curr Biol.* 2012; 22(18):1711-1716. DOI: 10.1016/j.cub.2012.07.012
61. Pierson H, Muchenditsi A, Kim BE, et al. The Function of ATPase Copper Transporter ATP7B in Intestine. *Gastroenterology.* 2018; 154(1):168-180.e5. DOI:10.1053/j.gastro.2017.09.019
62. Scheiber IF, Brůha R, Dušek P. Pathogenesis of Wilson disease. *Handb Clin Neurol.* 2017; 142:43-55. DOI: 10.1016/B978-0-444-63625-6.00005-7
63. Członkowska A, Litwin T, Dusek P, et al. Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4(1):21. DOI:10.1038/s41572-018-0018-3

64. Langwińska-Wośko E, Litwin T, Dzieżyc K, Karlinski M, Członkowska A. Optical coherence tomography as a marker of neurodegeneration in patients with Wilson's disease. *Acta Neurol Belg.* 2017; 117(4):867-871. DOI:10.1007/s13760-017-0788-5
65. Zhuang XH, Mo Y, Jiang XY, Chen SM. Analysis of renal impairment in children with Wilson's disease. *World J Pediatr.* 2008; 4(2):102-105. DOI:10.1007/s12519-008-0019-5
66. Weiss KH, Van de Moortele M, Gotthardt DN, et al. Bone demineralisation in a large cohort of Wilson disease patients. *J Inherit Metab Dis.* 2015; 38(5):949-956. DOI:10.1007/s10545-015-9815-y.
67. Buksińska-Lisik M, Litwin T, Pasierski T, Członkowska A. Cardiac assessment in Wilson's disease patients based on electrocardiography and echocardiography examination. *Arch Med Sci.* 2019; 15(4):857-864. DOI:10.5114/aoms.2017.69728
68. Scvortova E. Classification of mutations in ATP7B in Wilson's disease patients. *Curierul medical.* February 2014, 57(1): 3-9.
69. 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.
70. Curs de Genetică Umană II. Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu". Chișinău, 2012.
71. Beyzaei, Z., Mehrzadeh, A., Hashemi, N., et Geramizadeh. The mutation spectrum and ethnic distribution of Wilson disease, a review. *Molecular Genetics and Metabolism Reports.* 2024; 38, 101034.- 44
72. Coffey A.J. and al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain.* March 2013; 136:1476-1487.
73. Cumpata V. Phenotypic polymorphism in Wilson's disease – between genetics and epigenetics. *Mold Med J.* 2022;65(1):61-67. <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.65-1.22.10>.
74. Usta J. et al. Phenotype–genotype correlation in Wilson disease in a large Lebanese family: association of c.2299insC with hepatic and of p. Ala1003Thr with neurologic phenotype. *PLoS One.* 2014; 9 (11): e109727
75. Dmitriev O. et al. Solution structure of the N-domain of Wilson disease protein: distinct nucleotide-binding environment and effects of disease mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 2006; 103:5302-5307.
76. Lutsenko S., Jayakanthan S., Dmitriev O.Y. Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. In: *Molecular Architecture of the Copper-Transporting ATPase ATP7B.* Elsevier Inc., 2019.

77. Braiterman L.T. et al. Communication between the N and C termini is required for copper-stimulated Ser/Thr phosphorylation of Cu (I)-ATPase (ATP7B). *Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290:8803-8819.
78. Lepori, M.B. et al. Mutation analysis of the ATP7B gene in a new group of Wilson's disease patients: Contribution to diagnosis. *Molecular and Cellular Probes*. 2012; 26, 147–150.
79. Hlistun V., Sacară V. et al. Clinical and Molecular Characterization of Wilson Disease in Moldova. *Filodiritto Editore – Proceedings*. 2018; pp. 142-147.
80. Marcia Leung, Paul B. Aronowitz, Valentina Medici. The present and Future Challenges of Wilson's Disease Diagnosis and Treatment. *Clinical Liver Disease*. April 2021, 17(4): 267–270. DOI: 10.1002/cld.1041
81. Tofan-Scutaru L., Dumbravă V.-T, Răilean L, Țurcan A., Moscalu I., Ouș-Cebotar M. Boala Wilson, stare heterozigotă. *Caz clinic. Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2014, 5 (56): pp.92-97.
82. Bruno Campos Santos, Ludmila Resende Guedes, Luciana Costa Faria, Claudia Alves Couto. Wilson's disease presentation resembling autoimmune hepatitis. *BMJ*. 2019 Oct 25; 12(10):e230721. DOI: 10.1136/bcr-2019-230721.
83. 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. <https://doi.org/10.52645/MJHS.2024.1.03>
84. Mocanu N., Sacară V., Groppa St. Particularitățile formelor clinice și posibilitățile de diagnostic al bolii Wilson în Republica Moldova. *Curierul medical*. 2011; 1(319): 63-66.
85. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut*. 2007, Jan; 56(1):115-20. DOI: 10.1136/gut.2005.087262.
86. Turcanu A. The “Mimic” liver disease in Wilson's disease. *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2015; 4(16): 74-76.
87. Mocanu N. Particularitățile diagnostice ale bolii Wilson în legătură cu vârstă sexul și prezentarea clinică. *Buletinul AȘM. Științe Medicale*. 2014; 1(42): 232-236. ISSN 1857-011.
88. Mocanu N., Groppa St. Diagnosticul și evaluarea formelor clinice ale pacienților cu boala Wilson în populația Republicii Moldova. *Buletinul AȘM. Științe Medicale*. 2008; 19(5): 68-69. ISSN 1857-011.
89. Ferenci P, Caca K., Loudianos G., Mieli-Vergani G., Tanner S., Tanner S. et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson's disease. *Liver International*. 2003; 23:139-42. DOI: 10.1034/j.1600-0676.2003.00824.x.
90. Litwin T, Gromadzka G, Członkowska A. Gender differences in Wilson's disease. *J Neurol Sci*. 2012 Jan 15; 312(1-2):31-5. DOI: 10.1016/j.jns.2011.08.028.
91. Turcanu A. and Cumpata V. The spectrum of liver presentation in Wilson's disease: a literature review. *OH&RM*. 2023, 4(1): pp 27-36. DOI: 10.38045/ohrm.2023.1.03

92. Christoph Eisenbach, Olivia Sieg, Wolfgang Stremmel, Jens Encke, and Uta Merle. Diagnostic criteria for acute liver failure due to Wilson disease. *World J Gastroenterol*. 2007 Mar 21; 13(11): 1711–1714. DOI: 10.3748/wjg.v13.i11.1711
93. Dhawan A, Taylor RM, Cheeseman P, De Silva P, Katsiyiannakis L, MieliVergani G. Wilson's disease in children: 37-year experience and revised King's score for liver transplantation. *Liver Transpl*. 2005
94. Yi Tian, Guo-Zhong Gong, Xu Yang, Feng Peng. Diagnosis and management of fulminant Wilson's disease: a single center's experience. *World J Pediatr*. 2016 May; 12(2):209-14. DOI: 10.1007/s12519-015-0026-2.
95. Shribman S., Warner Th T., and Dooley J.S. Clinical presentations of Wilson disease. *Ann Transl Med*. 2019 Apr; 7(Suppl 2): S60. DOI: 10.21037/atm.2019.04.27
96. Sabina M., N. Inada, A. Izumi, M. Kawanaka, H. Kobashi, G. Yamada. Wilson's disease masquerading as nonalcoholic steatohepatitis. *N Am J Med Sci*. 2009 Jul; 1(2): 74–76.
97. Loudianos G., S. Incollu, E. Mameli, and Maria B. Lepori. Wilson's disease in an adult asymptomatic patient: a potential role for modifying factors of copper metabolism. *Ann Gastroenterol*. 2016 Jan-Mar; 29(1): 96–98.
98. Bruno Campos Santos, Ludmila Resende Guedes, Luciana Costa Faria, Claudia Alves Couto. Wilson's disease presentation resembling autoimmune hepatitis. *BMJ*. 2019 Oct 25; 12(10): e230721. DOI: 10.1136/bcr-2019-230721.
99. Sood V, Rawat D, Khanna R, Alam S. Cholestatic liver disease masquerading as Wilson disease. *Indian J Gastroenterol* 2015 Mar; 34(2):174-7. DOI: 10.1007/s12664-015-0552-9.
100. Roberts E A., Socha P. Wilson disease in children. In: *Handb Clin Neurol*. 2017; 142:141–156
101. Dehghani SM, Imanieh MH, Haghighat M, Malekpour A, Falizkar Z. Etiology and complications of liver cirrhosis in children:report of a single center from southern Iran. *Middle East J Dig Dis*. 2013; 5:41–46
102. Pfeiffenberger, J. et al. Hepatobiliary malignancies in Wilson disease. *Liver Int*. 2015 May; 35(5):1615-22. DOI: 10.1111/liv.12727
103. Beinhardt S, Leiss W, Stattermayer A et al. Long-term outcomes of patients with Wilson disease in a large Austrian cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Apr; 12(4):683-9. DOI: 10.1016/j.cgh.2013.09.025.
104. van M.S., de Man R.A., van den Berg A.P., Houwen R.H., Linn F.H., van Oijen M.G., et al. No increased risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis due to Wilson disease during long-term follow-up. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Mar; 30(3):535-9. DOI: 10.1111/jgh.12716.
105. Riordan S.M., Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity. *Journal of Hepatology*. 2001; 34:165–171. DOI: 10.1016/s0168-8278(00)00028-3.

106. Roberts EA, Schilsky ML. Current and emerging issues in Wilson's disease. *New Engl J Med*. 2023;389(10):922-938. DOI: 10.1056/NEJMra1903585
107. Dusek P, Litwin T, Członkowska A: Neurologic impairment in Wilson disease. *Ann Transl Med*. 2019, 7:S64. DOI: 10.21037/atm.2019.02.43
108. Yu XE, Gao S, Yang RM, Han YZ: MR imaging of the brain in neurologic Wilson disease. *Am J Neuroradiol*. 2019, 40:178-83. DOI: 10.3174/ajnr.A5936
109. Bhatia KP, Bain P, Bajaj N, et al. Consensus statement on the classification of tremors from the task force on tremor of the International Parkinson and Movement Disorder Society. *Mov Disord*. 2018, 33:75-87.
110. Gavriluc O., Fala P., Gavriluc M., Andrușca A. Tremorul esențial - criterii de diagnostic și modalități de tratament. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*, 2021, nr. 3(71), pp. 25-29. ISSN 1857-0011. <https://doi.org/10.52692/1857-0011.2021.3-71.24>
111. Kim TJ, Kim IO, Kim WS, et al.: MR imaging of the brain in Wilson disease of childhood: findings before and after treatment with clinical correlation. *Am J Neuroradiol*. 2006, 27:1373-8.
112. Ranavolo A, Serrao M, Varrecchia T, et al.: The working life of people with degenerative cerebellar ataxia. *Cerebellum*. 2019, 18:910-21. DOI: 10.1007/s12311-019-01065-x
113. Popil L., Gavriluc O. Caz clinic: pacientă cu ataxie, dismetrie, dizartrie, tremor. o problemă de diagnostic diferențial. In: *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*, 21-23 octombrie 2020, Chișinău. 2020, p. 368
114. Członkowska A, Litwin T, Chabik G: Wilson disease: neurologic features. *Handb Clin Neurol*. 2017, 142:101-19. DOI: 10.1016/B978-0-444-63625-6.00010-0
115. Steeves TD, Day L, Dykeman J, et al.: The prevalence of primary dystonia: a systematic review and metaanalysis. *Mov Disord*. 2012, 27:1789-96.
116. Heder P: Wilson's disease: a master of disguise. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019, 59:140-5. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2019.02.016
117. Litwin T, Dusek P, Szafranski T, Dzieżyc K, Członkowska A, Rybakowski JK: Psychiatric manifestations in Wilson's disease: possibilities and difficulties for treatment. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2018, 8:199-211. DOI: 10.1177/2045125318759461
118. Mura G, Zimbrea PC, Demelia L, et al. Psychiatric comorbidity in Wilson's disease. *Int Rev Psychiatry*. 2017 Oct; 29(5):445-462. DOI: 10.1080/09540261.2017.1311845
119. Kevin Chevalier, Martine Mauguet-Faÿsse, Vivien Vasseur, Georges Azar, Michaël Alexandre Obadia, Aurélia Poujois. Eye Involvement in Wilson's Disease: A Review of the Literature. *J Clin Med*. 2022 Apr 30; 11(9):2528. DOI: 10.3390/jcm11092528
120. Nussinson E., Shahbari A., Shibli F., Chervinsky E., Trougouboff Ph., and Markel A. Diagnostic challenges of Wilson's disease presenting as acute pancreatitis, cholangitis, and jaundice. *World J Hepatol*. 2013 Nov 27; 5(11): 649–653. DOI: 10.4254/wjh.v5.i11.649.

121. Kumar, S., Sundaram, S., Darak, H. et al. Recurrent acute pancreatitis in a Wilson disease patient: an unusual association. *Egypt Liver Journal* 11, 66 (2021). <https://doi.org/10.1186/s43066-021-00135-2>
122. Ferenci P, Caca K., Loudianos G., Mieli-Vergani G., Tanner S., Tanner S. et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson's disease. *Liver International*. 2003; 23:139-42. DOI: 10.1034/j.1600-0676.2003.00824.x.
123. Medici V., Weiss K.-H. Handbook of Clinical Neurology, Vol. 142 (3rd series) Wilson Disease. In: Genetic and environmental modifiers of Wilson disease. Elsevier Inc., 2017. pp. 19-34.
124. Kalita J, et al. R778L, H1069Q, and I1102T mutation study in neurologic Wilson disease. *Neurology India*. 2010; 58(4):627–630.
125. Mihaylova V., Todorov T., Jeleu H. et al. Neurological symptoms, genotype-phenotype correlations and ethnic specific differences in Bulgarian patients with Wilson disease. *Neurologist* 2012; 18:184-9.
126. Takeshita Y., Shimizu N. et al. Two families with Wilson disease in which siblings showed different phenotypes. *Journal of Human Genetics*. 2002; 47: 543-547
127. Sapuppo A. and al. Genotype-phenotype variable correlation in Wilson disease: clinical history of two sisters with the similar genotype. *BMC Medical Genetics*. 2020; 21:128
128. Santhosh S., Shaji R.V. et al. Genotype phenotype correlation in Wilson's disease within families-a report on four south Indian families. *World Journal of Gastroenterology*. 2008; 14(29):4672-4676.
129. Kieffer D.A., Medici V. Wilson disease: At the crossroads between genetics and epigenetics -A review of the evidence. *Liver Research*. 2017; 1:121-130.
130. Lichtmannegger J., Leitzinger et al. Methanobactin reverses acute liver failure in a rat model of Wilson disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2016; 126:2721-2735.
131. Schilsky M. L., Roberts E. A., Bronstein J.M., et al. A multidisciplinary approach to the diagnosis and management of Wilson disease: 2022 practice guidance on Wilson disease from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* [online]. September 13, 2022; 00:1–49. DOI: 10.1002/hep.32801
132. Nagral A, Sarma S.M., Matthai J., Kukkle L.P., Devarbhavi H., Sinha S. et al. Wilson's Disease: Clinical Practice Guidelines of the Indian National Association for Study of the Liver, the Indian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, and the Movement Disorders Society of India. In: *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* [online]. January-February 2019; 9 (1):74–98.
133. Socha P., Janczyk W., Dhawan A., Baumann U., D'Antiga L. et al. Wilson's Disease in Children: A Position Paper by the Hepatology Committee of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. In: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [online]. February 2018; 66(2): 334–344.

134. Shribman. S., Marjot Th., Sharif Ab., Vimalasvaran S., Aftab A., Graeme Al., and al. Investigation and management of Wilson's disease: a practical guide from the British Association for the Study of the Liver. In: *Lancet Gastroenterol Hepatol* [online]. April 13, 2022. DOI: 10.1016/S2468-1253(22)00004-8
135. Wieland Hermann. Classification and differential diagnosis of Wilson's disease. *Annals of Translational Medicine*. 2019; 7(Suppl 2): S63. DOI: 10.21037/atm.2019.02.07
136. Mocanu N., Sacară V., Todorov T., Groppa St. Cercetarea legăturii hipoceruloplasminemiei cu mutațiile în gena ATP7B. *Buletin de Perinatologie*. 2013, nr. 1(57), pp. 32-37. ISSN 1810-5289.
137. Chloe M. Mark. Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. In: *Biochemical Diagnosis of Wilson Disease*. Elsevier Inc., 2019.
138. Mallikarjun Patil, Keyur A. Sheth, Adarsh C. Krishnamurthy, and Harshad Devarbhavi. A Review and Current Perspective on Wilson Disease. *J Clin Exp Hepatol*. 2013 Dec; 3(4): 321–336. DOI: 10.1016/j.jceh.2013.06.002
139. Mazumder M., Karim K., M Rukunuzzaman. Penicillamine challenge test in the diagnosis of Wilson's disease. *Mymensingh Med J*. 2014 Jul; 23(3):489-95.
140. Schroeder S.M., Matsukuma K. E., Medici V. Wilson disease and the differential diagnosis of its hepatic manifestations: a narrative review of clinical, laboratory, and liver histological features. *Ann Transl Med*. Jul 2021; 9 (17): 1394. DOI: 10.21037/atm-21-2264
141. Fanni D, Guido M, Gerosa C, Vallascas V, Moi M, Coni P, et al. Liver changes in Wilson's disease: the full spectrum. A report of 127 biopsies from 43 patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Jun; 25(12):4336-4344. DOI: 10.26355/eurrev_202106_26142.
142. Madakshira, M. G., Das, A., Umairv, M., et Dutta, U. Liver histology and histochemistry in Wilson disease. *Autopsy & Case Reports*. 2018; 8(3). DOI: 10.4322/acr.2018.026
143. Clark I, Torbenson MS. Immunohistochemistry and special stains in medical liver pathology. *Adv Anat Pathol*. 2017; 24(2):99-109.
144. Song, Y., et Chen, M. A single determination of liver copper concentration may misdiagnose Wilson's disease. *Clinical Biochemistr*. 2000; 33(7), 589-590.
145. 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.
146. Brunet AS, Marotte S, Guillaud O, et al. Familial screening in Wilson's disease: think at the previous generation! *J Hepatol*. 2012;57(6):1394-5. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.07.011.
147. Lorincz MT. Neurologic Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1184:173-87. DOI: 10.1111/j.1749- 6632.2009.05109.x.
148. Dzieżyc K, Gromadzka G, Członkowska A. Wilson's disease in consecutive generations of one family. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011;17(7):577-578. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2011.04.013.

149. Sacară V., Uşurelu N., Puiu M. Metode de diagnostic clinic şi laborator în genetica medicală (ghid practic). In: Metode de diagnostic molecular- genetic postnatal, SSCP. Editura Baster Media SRL. 2018, p.24.
150. Sacară V., Uşurelu N., Puiu M. Metode de diagnostic clinic şi laborator în genetica medicală (ghid practic). In: Metode de diagnostic molecular- genetic postnatal, Secveţierea ADN-ului. Editura Baster Media SRL. 2018, p.27.
151. Cumpata V. Turcanu A., Tcaciuc E. Phenotypic and genotypic diagnosis of Wilson's disease: A Clinical Case. In materialile Conferinţei: Zilele Medicale ale Spitalului Clinic Municipal „Sfântul Arhanghel Mihail”. 21 Noiembrie 2021; pp.246-251. E-ISSN: 2587-3873.
152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> [accesat la 26.04.2024].
153. <https://omim.org/> [accesat la 26.04.2024].
154. <https://gnomad.broadinstitute.org/> [accesat la 26.04.2024].
155. <https://clinvarminer.genetics.utah.edu/> [accesat la 26.04.2024].
156. <https://clingen.igib.res.in/WilsonGen/> [accesat la 26.04.2024].
157. 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
158. PCN-258. Protocolul clinic naţional: Boala Wilson la copil. Chişinău, 2016. <https://msmps.gov.md>.
159. Poujois A. and Woimant F. Challenges in the diagnosis of Wilson Disease. *W Ann Transl Med.* Apr 2019; 7(Suppl 2): S67. DOI: 10.21037/atm.2019.02.10.
160. Lin Cai, Xiaotao Huang, Yan Ye, Dailan Yang, Linshen Xie, Daigang Fu et al. Role of gender and age in features of Wilson's disease. *Front Neurogenetics.* 2023;14: 1176946. DOI: 10.3389/fneur.2023.1176946.
161. Członkowska, A, Ciesielska, A, Gromadzka, G, and Kurkowska-Jastrzebska, I. Gender differences in neurological disease: role of estrogens and cytokines. *Endocrine.* 2006; 29:243–56. DOI: 10.1385/endo:29:2:243
162. Gromadzka, G, Wierzbicka, D, Litwin, T, and Przybyłkowski, A. Difference in iron metabolism may partly explain sex-related variability in the manifestation of Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol.* 2020; 62:126637. DOI: 10.1016/j.jtemb.2020.126637.
163. Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut.* 2000 Mar; 46(3):415-9. DOI: 10.1136/gut.46.3.415.
164. Ghosh U, Sen Sarma M, Samanta A. Challenges and dilemmas in pediatric hepatic Wilson's disease. *World J Hepatol.* 2023; 15(10): 1109-1126. DOI: 10.4254/wjh.v15.i10.1109

165. Medici, V.; Heffern, M.C. Monitoring and treatment of Wilson disease: Progress and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022 Dec; 7(12):1063-1065. DOI: 10.1016/S2468-1253(22)00284-9.
166. Abdelghaffar, T. Y., Elsayed, S. M., Elsobky, E., Bochow, B., Büttner, J., & Schmidt, H. Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *Journal of Human Genetics*. 2008; 53(8), 681-687. DOI: 10.1007/s10038-008-0298-7
167. Hlistun V, Boiciuc C, Sacara V. Molecular-genetic diagnosis of Wilson Disease in Republic of Moldova. *Human and Medical Genetics*. 2021; p.53. DOI:10.53040/cga11.2021.035.
168. Collet C, Laplanche JL, Page J, Morel H, Woimant F, Poujois A. High genetic carrier frequency of Wilson's disease in France: discrepancies with clinical prevalence. *BMC Med Genet*. 2018 Aug 10;19(1):143. DOI: 10.1186/s12881-018-0660-3.
169. Ferenci P, Czlonkowska A, Merle U, et al. Late-onset Wilson's disease. *Gastroenterology*. 2007; 132(4):1294–1298. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.02.057
170. Schaefer M., Hopkins R.G., Failla M.L., Gitlin J.D. Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *Am J Physiol*. 1999; 276: G639-G646. DOI: 10.1152/ajpgi.1999.276.3.G639
171. Stapelbroek J.M., Bollen C.W., van Amstel J.K., et al. The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J Hepatol*. Nov 2004; 41(5): 758-763. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.07.017
172. Sipilä, J. O., Kytövuori, L., et Kaasinen, V. Clinical spectrum and genotype-phenotype associations in Finnish patients with Wilson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 2023; 448, 120620. DOI:10.1016/j.jns.2023.120620
173. Al Fadda M., Al Quaiz M., Al Ashgar H., Al Kahtani K., Helmy A., Al Benmoussa A. et al. Wilson disease in 71 patients followed for over two decades in a tertiary center in Saudi Arabia: a retrospective review. *Ann Saudi Med*. 2012 Nov-Dec; 32(6): 623–629. DOI: 10.5144/0256-4947.2012.623
174. Bushra Gul, Sabika Firasat, Raeesa Tehreem, Tayyaba Shan, Kiran Afshan. Analysis of Wilson disease mutations in copper binding domain of ATP7B gene. *PLOS ONE*. 2022, p.1-13. DOI: 10.1371/journal.pone.0269833
175. Todorov T, Savov A, Jelev H, Panteleva E, Konstantinova D, Krustev Z, et al. Spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B) in the Bulgarian population. *Clin Genet*. 2005;68:474–6. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2005.00516.x.
176. Cumpata V., Turcanu A. Ghidul pacientului cu boala Wilson. Bons Offices, 2024. ISBN 978-5-36241-347-7.

ANEXE

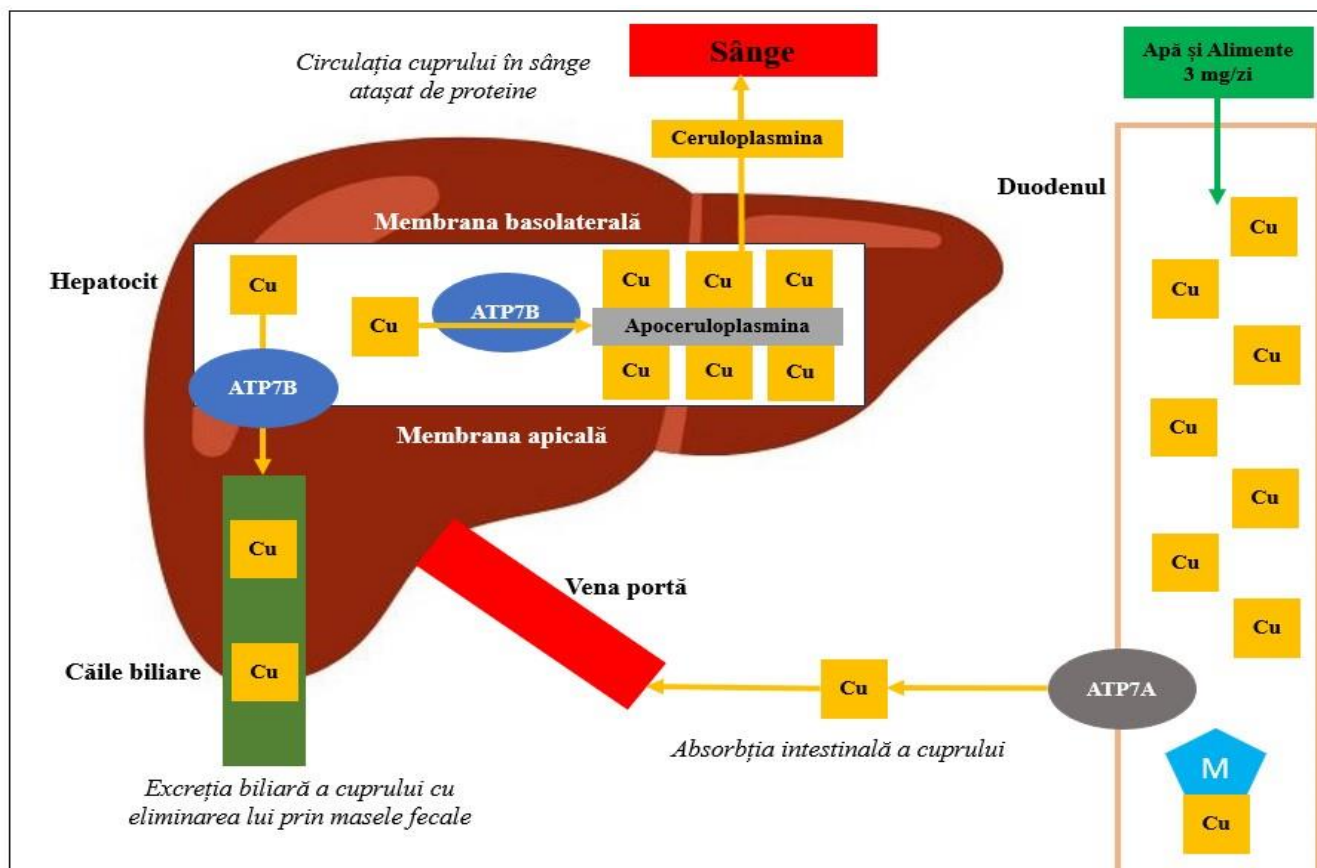
Anexa 1.	Studii epidemiologice ce estimează prevalența bolii Wilson	97
Anexa 2.	Absorbția și metabolismul cuprului la o persoană sănătoasă	98
Anexa 3.	Absorbția și metabolismul cuprului în boala Wilson	99
Anexa 4.	Clasificarea variantelor în boala Wilson	100
Anexa 5.	Manifestări clinice în boala Wilson	101
Anexa 6.	Diagnosticul diferențial în BW conform parametrilor specifici	102
Anexa 7.	Sistemul de scorificare Leipzig (EASL, 2012)	104
Anexa 8.	Sistemul de scorificare Leipzig modificat (INASL, 2019)	105
Anexa 9.	Design-ul studiului	106
Anexa 10.	Formularul de evaluare clinică a pacientului cu boala Wilson elaborat în cadrul studiului	107
Anexa 11.	Algoritmul de evaluare prin testul molecular-genetic	109
Anexa 12.	Caracteristica demografică și clinică a subiecților suspecți cu boala Wilson	110
Anexa 13.	Caracteristica clinică și genetică a fenotipurilor	111
Anexa 14.	Definirea variantelor conform parametrilor genetici și fenotip	113
Anexa 15.	Caracteristicile variantelor genetice ATP7B identificate în lotul studiat	115
Anexa 16.	Diferențierea clinico-biologică raportată la profilul <i>p.H1069Q</i> și <i>non-pH1069Q</i>	116
Anexa 17.	Tabloul clinico-biologic a profilului <i>p.H1069Q</i> în funcție de statutul moștenirii	117
Anexa 18.	Caracteristica clinico-biologică raportată la tipul variantei genetice	118
Anexa 19.	Rezultatele investigațiilor pacienților identificați prin screening familial	119
Anexa 20.	Algoritmul de stabilire a diagnosticului de boala Wilson	121
Anexa 21.	Algoritmul de screening familial în boala Wilson	122
Anexa 22.	Act de implementare "Algoritmul de stabilire a diagnosticului de boala Wilson"	123
Anexa 23.	Act de implementare "Algoritmul de screening familial în boala Wilson"	124
Anexa 24.	Certificat de inovație "Algoritmul de stabilire a diagnosticului de boala Wilson"	125
Anexa 25.	Certificat de inovație "Algoritmul de screening familial în boala Wilson"	126
Anexa 26.	Adeverință privind înscrierea obiectelor dreptului de autor și alte drepturi conexe "GHIDUL PACIENTULUI CU BOALA WILSON"	127

Anexa 27.	Adeverință privind înscrierea obiectelor dreptului de autor și alte drepturi conexe "РУКОВОДСТВО ДЛЯ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА"	128
Anexa 28.	Certificat de participare la 1st ERN RARE-LIVER EASL ACADEMY	129
Anexa 29.	Diplomă din cadrul evenimentului "The 10 th edition of MedEspera International Medical Congress For Students And Young Doctors"	130
Anexa 30.	Diplomă din cadrul evenimentului "3rd edition of the International Exhibition of Innovation and Technology Transfer EXCELLENT IDEA - 2024"	131

Anexa 1. Studii epidemiologice ce estimează prevalența bolii Wilson

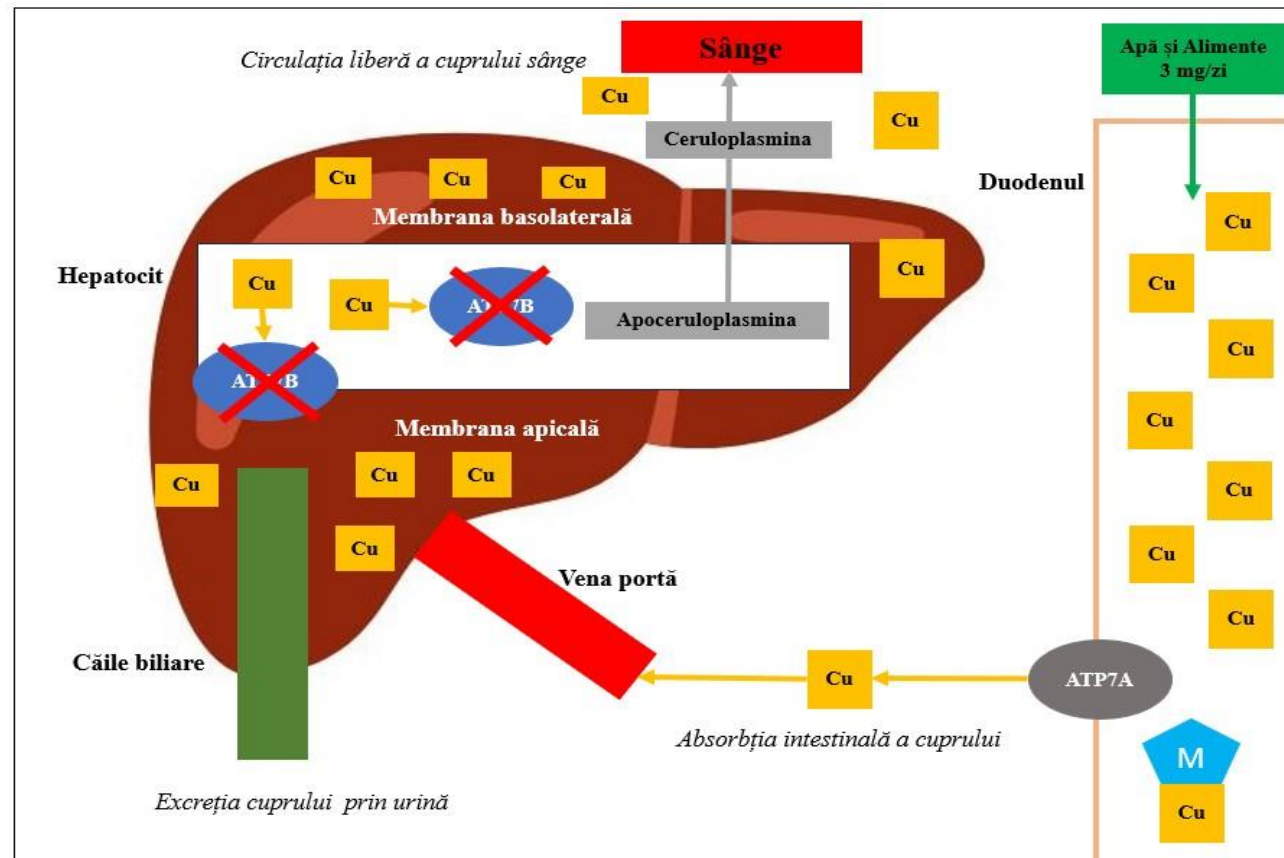
Publicația	Locația	Vârsta (ani)	Anul	Populația (1000)	Prevalența (per 100000)
Europa					
Poujois et al. [36]	Franța	Toate	2013	58000	1.50
Moller et al. [37]	Danemarca	Toate	1990-2008	5494	2.02
Giagheddu et al. [38]	Sardinia	Toate	Nu este clar	74	2.77
Adhami et al. [39]	Albania	Toate	?-1991	3267	0.68
Reilly et. al. [40]	Irlanda	Toate	1986	3541	0.54
Park et al. [41]	Scoția	Toate	1989	5091	0.40
Garcia-Villareal et al. [42]	Insulele Canare, Spania	Toate	1981	1586	38.50
Dedoussis et al. [43]	Sat din Creta	Toate	1978-?	Nu este clar	6666.67
Wijayasiri P. et al. [44]	Marea Britania	Toate	2011-2018	1794	1.55
Asia					
Tai et al. [45]	Taiwan	Toate	2000-2011	23162	1.81
Lai et al [46]	Taiwan	Toate	2005	22700	1.60
Cheng et al. [47]	Anhui, China	7–75	2008-2011	2700	5.87
Bonne-Tamir et al. [48]	Israel	Toate	1958-1985	4106	0.25
Choe E.J. et al. [49]	Corea de Sud	Toate	2009-2016	1333	3.87
Yamaguchi H. et al. [50]	Japonia	Toate	2020	Bază de date genomică	19.6
Cheng Sh.-K. et al. [51]	Hong-Kong, China	Toate	2010-2016	211	1.793
Africa					
Abbassi N. et al. [24]	Maroc	≤ 18	2008-2019	42	15.4

Anexa 2. Absorbția și metabolismul cuprului la o persoană sănătoasă



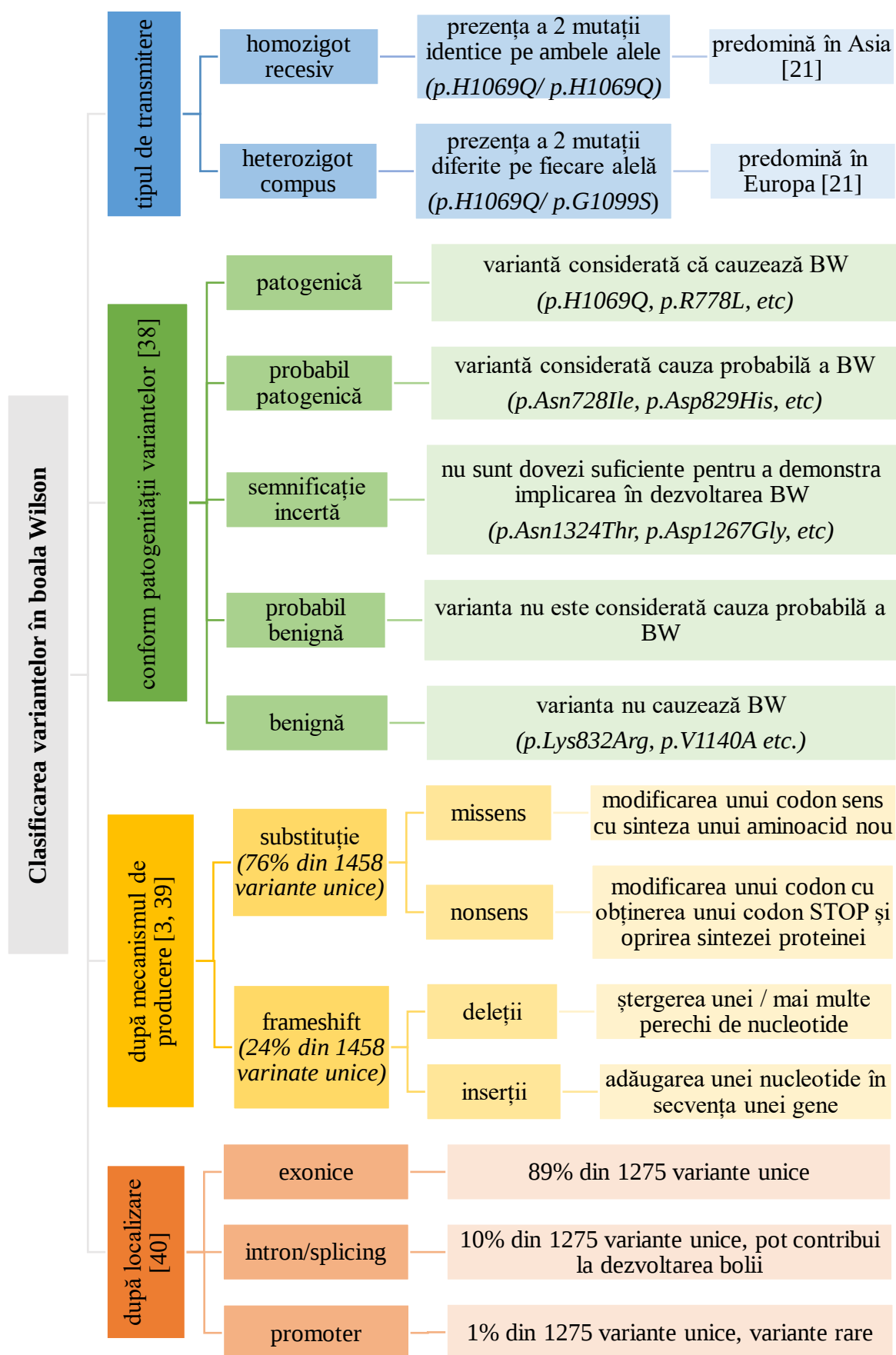
Note: Cu – cupru, M -metalotionein. Adaptată după: Wu F. and al. International Journal of Molecular Sciences; 2015. [1]. Armer, Ch. Goede. Arch Dis Child Educ Pract Ed; 2017 [59].

Anexa 3. Absorbția și metabolismul cuprului în boala Wilson

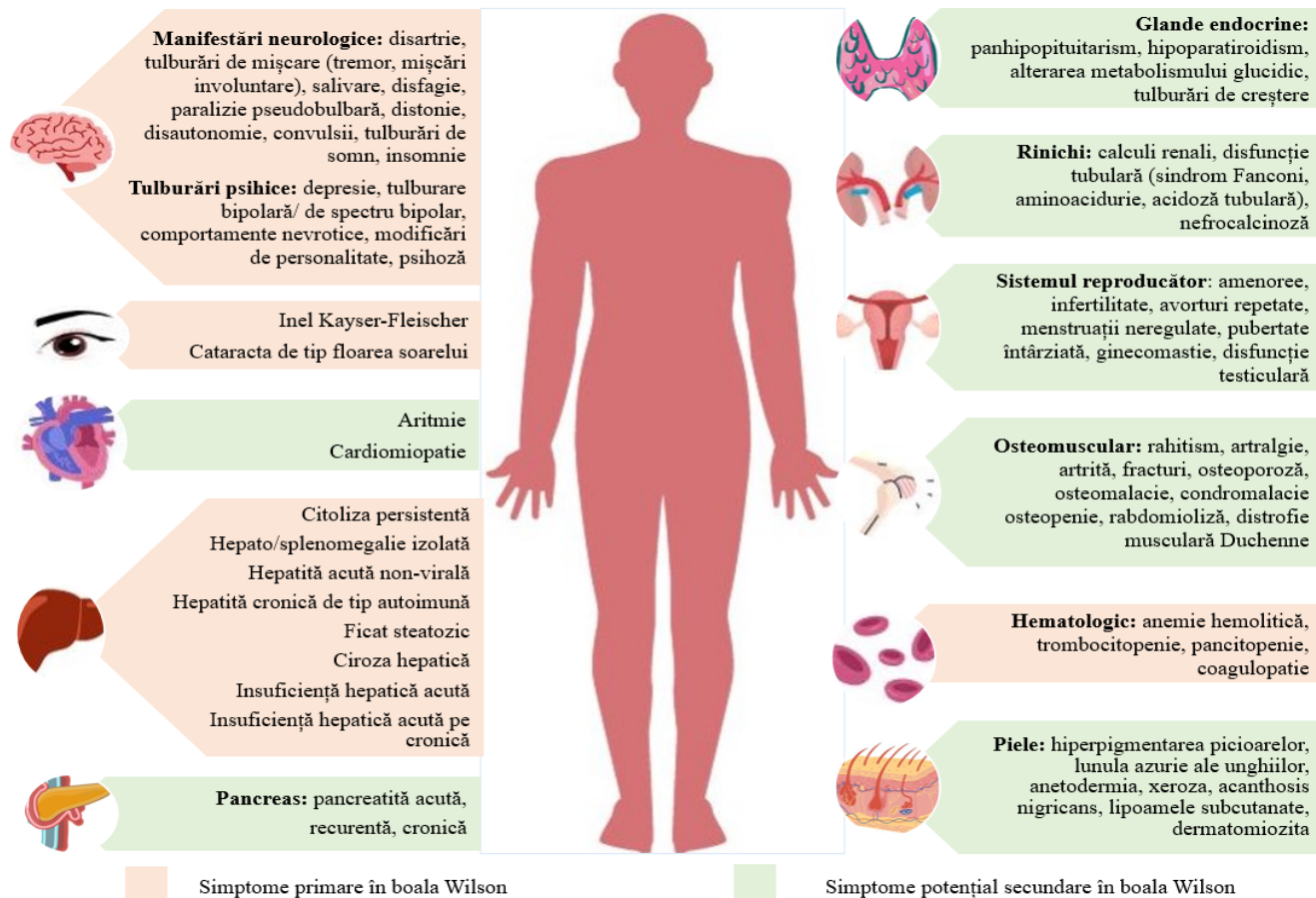


Note: Cu – cupru, M -metalotionein. *Adaptată după:* Wu F. and al. International Journal of Molecular Sciences; 2015. [1]. Armer, Ch. Goede. Arch Dis Child Educ Pract Ed; 2017 [59].

Anexa 4. **Clasificarea variantelor în boala Wilson (imagine proprie)** [3, 55, 69-71]



Anexa 5. Manifestări clinice în boala Wilson



Adaptată după: Członkowska A et al. Nat Rev Dis Primers, 2018 [63]. Roberts E.A., Schilsky M.L. New Engl J Med, 2023 [106]. Nussinson E. et al. World J Hepatol, 2013 [120].

Anexa 6. Diagnosticul diferențial în BW conform parametrilor specifici [137-140]

	Fals-negativ	Fals-pozitiv
Cp serică	- Niveluri normale: - la pacienții cu inflamație marcată 15-36% dintre copii cu BW - Supraestimare prin test imunologic - Valoare crescută: - Sarcină, preeclampsie, terapie cu estrogeni, contraceptive orale - Intoxicație cu Cu, deficit de zinc - Cancer, limfom, boala Alzheimer, artrita reumatoidă	- Stări asociate cu pierderea proteinelor - sindroame de malabsorbție (exemplu, chirurgie bariatrică), pierderi pe cale renală sau intestinală - Deficit de Cu dobândit – malnutriție, nutriție parenterală totală cu conținut insuficient de Cu, cașexie - Funcție hepatică sintetică sever afectată - hepatită de orice etiologie, boală hepatică în stadiu terminal sau insuficiență hepatică acută de orice etiologie - Tulburări genetice rare - hipo-/a-Cp-emie ereditară, boala Menkes - Boli neurologice – scleroza multiplă, boala Huntington, parkinsonismul, boala Hallervorden-Spatz - Heterozigoți sănătoși BW (20% din cazuri) - Individual, fără semnificație patologică, sezonul de iarnă
Cu seric total	- Niveluri normale sau crescute - leziuni hepatice severe, colestază cronică, diferite boli hepatice, carcinoame, infecții acute și cronice, artrită reumatoidă și alte afecțiuni legate de sinteza crescută a Cp în calitate de reactant de fază acută. - Crescut - otrăvire cu sulfat de Cu - Marcat crescut - insuficiență hepatică acută din cauza BW	- aport oral insuficient - sindroame de malabsorbție (exemplu, chirurgie bariatrică) - absorbție crescută de zinc (prin suplimente alimentare, cremă adezivă pentru proteze dentare) - administrare de acid valproic - cazuri idiopatice (20%)
Cu liber	- Niveluri normale - supraestimare prin test imunologic - Valoare crescută - insuficiența hepatică acută de orice etiologie, în colestază cronică și în cazuri de intoxicație cu Cu	
Cu urinar în 24h	- Normal: - Colectare incorectă de urină (probă de urină incompletă, probă spot) - Copii fără leziuni hepatice - Rude asimptomatici	- Creștere: - Necroza hepatocelulară - alte tipuri de boli hepatice - hepatită autoimună, BCF activă sau colestază și în special în timpul IHA de orice origine - Contaminarea cu Cu a dispozitivului de colectare

Fals-negativ		Fals-pozitiv
		- Heterozigoți sănătoși (niveluri intermediare)
Cu hepatic	1. Subestimat din cauza erorii de colectare 2. Din cauza variației regionale: - la pacienții cu boală hepatică activă - la bolnavii cu noduli regenerativi	1. Datorită distribuției neomogene a Cu: - tulburări colestatice de lungă durată: colangită biliară primară, colangită sclerozantă primară - sindroame de toxicoză cuprică idiopatică, cum ar fi ciroza indiană din copilărie

Note: BW–boala Wilson; Cu–cupru; Cp–ceruloplasmină; h-oră; BCF–boală cronică de ficat; IHA–insuficiență hepatică acută

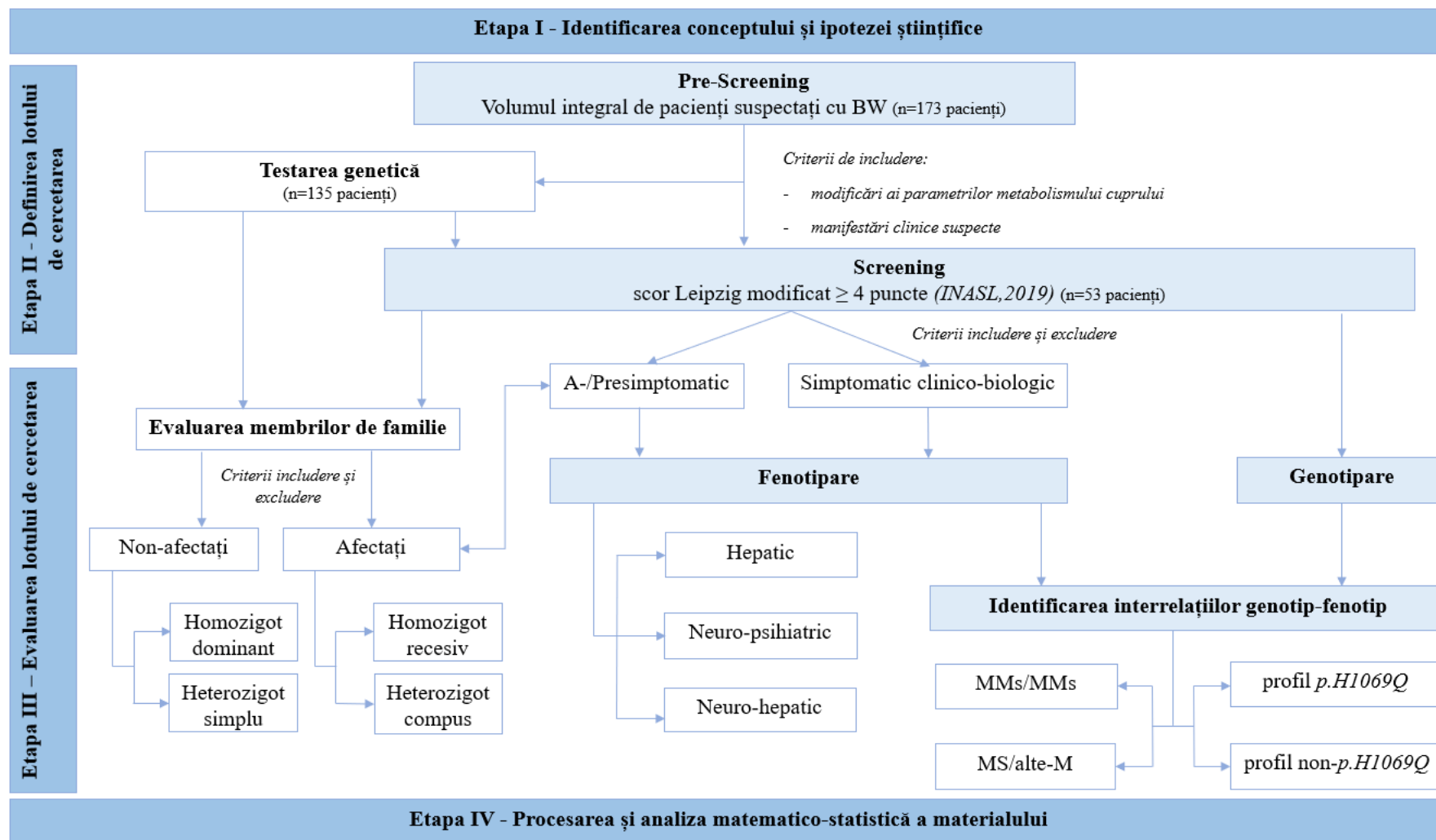
Anexa 7. **Sistemul de scorificare Leipzig (EASL, 2012)** [2]

Semne și simptome clinice tipice	Scor
Inelul Kayser-Fleischer:	
Prezent	+1
Absent	0
Simptome neuro-psihiatrice sugestive sau modificări tipice evidențiate la RMN cerebral:	+2
Severe	+1
Moderate	0
Absente	
Ceruloplasmina serică:	
Normal (> 0.2 g/L)	0
0.1 - 0.2 g/L	+1
< 0.1 g/L	+2
Anemia hemolitică Coombs-negative:	
Prezent	+1
Absent	0
Alte teste	
Cantitatea cupru la biopsia hepatică (în absența colestazei):	
> 5 * ULN (>4 μmol/g)	+2
0.8 – 4 μmol/g	+1
Normal (<0.8 μmol/g)	-1
Granule rhodanine – pozitiv	+1
Cupru urinar (în absența hepatitei acute):	
Normal	0
1 – 2 * ULN	+1
> 2 * ULN	+2
Normal, dar > 5 * ULN după D-penicilamina	+2
Prezența mutațiilor:	
Pe ambii cromozomi	+4
Pe 1 cromozom	+1
Absența mutațiilor	0
Scor total: ≥ 4 puncte – diagnostic stabilit	
2-3 puncte – diagnostic probabil, sunt necesare teste suplimentare	
≤ 1 puncte - diagnostic improbabil	

Anexa 8. Sistemul de scorificare Leipzig modificat (INASL, 2019) [132]

Semne și simptome clinice tipice	Scor
Inelul Kayser-Fleischer	
Prezent	2
Absent	0
Ceruloplasmina serică	
Normal (> 0.2 g/L)	0
11 - 20 mg/dL	1
6 - 11 mg/dL	2
0 - 5 mg/dL	3
Cupru urinar în 24h (în absența hepatitei acute)	
> 100 μ g	2
40 – 100 μ g	1
< 40 μ g	0
Anemia hemolitică Coombs-negativă asociată cu boală hepatică	
Prezent	1
Absent	0
Testarea genetică	
Pe ambii cromozomi	4
Pe 1 cromozom	1
Absența mutațiilor	0
Biopsie hepatică cu examenul histologic sugestiv pentru boala Wilson	
Granule rodanine – sau orcin - pozitive	1
Simptome neuro-psihiatrice	
Severe	2
Absente	0
Modificări tipice la RMN cerebral	
Prezent	1
Absent	0
Istoric de boală Wilson în familie	
Rude decedate de boală hepatică/neurologică sugestivă pentru boala Wilson	1
Scor total : ≥ 4 puncte – diagnostic stabilit	
2-3 puncte – diagnostic probabil, sunt necesare teste suplimentare	
≤ 1 puncte - diagnostic improbabil	

Anexa 9. 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.

Anexa 10. Formularul de evaluare clinică a pacientului cu boala Wilson elaborat în cadrul studiului

Cod pacient _____

Data _____

• **Caracteristici demografice și de bază:**

Sexul: Bărbat Femeie Datele nașterii : _____

Etnia _____ Rasa _____

Locul nașterii _____ Locul de trai _____

• **Statut social:** elev/student celibatar/ă căsătorit/ă divorțat/ă văduv/ă

• **Date fiziologice** (secțiune dedicată doar _____ pentru sexul feminin):
prima menstruație _____

Numărul de sarcini _____ Numărul de nașteri _____ Avorturi _____ Menopauză _____

• **Date ale familiei de bază:** completă incompletă orfan/ă căsătorii între rude
Frați/surori _____ al câtelea copil este _____

• **Statut educațional:** nefinisate gimnaziu liceu superioare profesionale calificate

• **Acuze:** _____
—

• **Debut:** Primele semne clinice (an) _____ Stabilirea diagnosticului (an) _____
Durata bolii fără diagnostic (în luni) _____ Prezentare clinică _____

• **Evoluția bolii:**

• **Anamneza eredo-colaterală** (rude bolnave cu boală hepatică și/sau neuropsihiatrică; consangvinizare):

• **Examenul fizic** (modificări clinic semnificative): m _____ H _____ IMC _____

• **Parametrii hematologici:** _____ data _____

• **Parametrii biochimici:** _____ data _____

• **Parametrii metabolismului cuprului:** _____ data _____

Cupru în ser _____ Zinc în ser _____

Ceruloplasmina serică _____ Cuprul urinar în 24 h _____

- **Evaluare imagistică:** data _____

- **Evaluarea fibrozei hepatice:** data _____

- **Evaluare endoscopică:** data _____

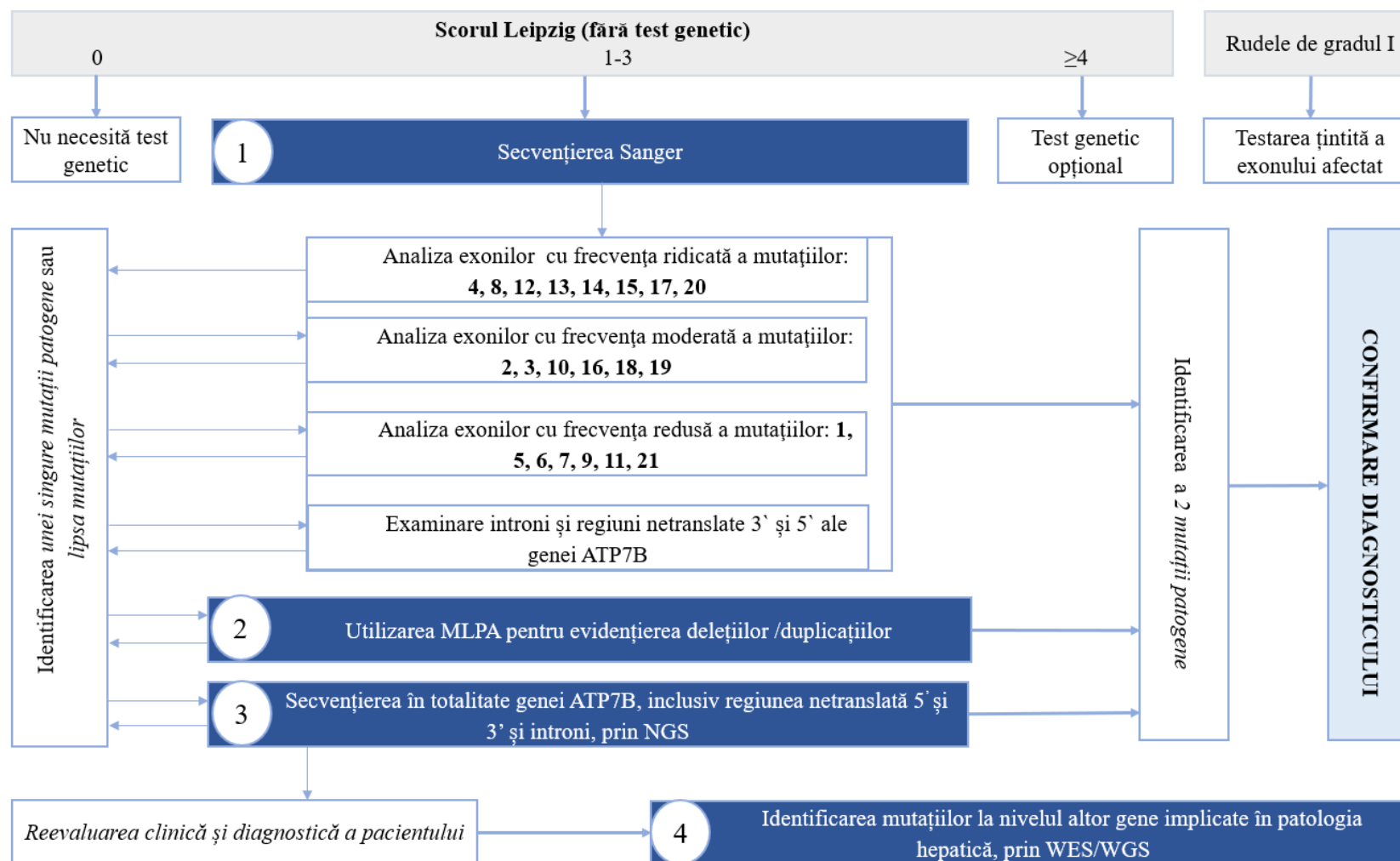
- **Examinarea ochiului în lampa cu fantă:** data _____

- **Testul genetic:** data _____

- **Scorul Leipzig modificat (INASL, 2019)**

- **Evaluări suplimentare:**

Anexa 11. 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 [145].

Anexa 12. Caracteristica demografică și clinică a subiecților suspecți cu boala Wilson

Total suspecți, n=173	Valoare obținută	IÎ (95%)
Raport bărbați: femei, n (%)	97 (56,1%) : 76 (43,9 %)	
Media $\pm$ DS, ani	25,68 $\pm$ 16,10	
Mediana (perc.25 – perc.75), ani	25 (13-35)	
Copii < 5 ani, n (%)	9 (5,2%)	
Locul de origine, n (%)		
Nord	30 (17,34%)	11,7 - 23,0
Centru	90 (52,02%)	44,6 - 59,5
Sud	38 (21,96%)	15,8 - 28,1
Stânga Nistrului	15 (8,67%)	4,5 - 12,9
Caracteristica clinică, n (%)		
doar manifestări clinice	62 (35,84%)	28,7 - 43,0
doar modificări ale cuprului	54 (31,21%)	24,3 - 38,1
manifestări clinice și paraclinice	57 (32,94%)	25,9 - 40,0
Nu au fost găsiți/ date insuficiente	43 (24,85%)	
Membri de familie evaluați, n (%)	24 (13,87%)	
Testați genetic, n (%)	135 (78,1%)	
mutații depistate	73 (54,1%)	45,7 - 62,5
absența mutațiilor	62 (45,9%)	37,5 - 54,3
Scorul Leipzig modificat, n (%)		
≤ 1 punct	83 (48%)	40,5 - 55,4
2 – 3 puncte	37 (21,38%)	15,3 – 27,5
$4 \leq$ puncte	53 (30,63%)	23,8 – 37,5

Anexa 13. Caracteristica clinică și genetică a fenotipurilor

Parametri clinici	Hepatic	Neuro- psihiatric	Neuro-hepatic
Bărbați/femei	1/1	1.4/1	2/1
Vârsta medie la debut ± DS, ani	15,2 ± 10,01*	24,25 ± 10,89*	20,64 ± 7,98
	F=2,63; p=0.08		
Vârsta medie la stabilirea diagnosticului ± DS, ani	16,8 ± 9,81* _{a,b}	26,5 ± 9,92* _a	24,13 ± 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 ± DS, luni	20,5 ± 30,72	25,17 ± 30,96	30,91 ± 41,36
	F=0,305; p=0.74		
Manifestări hepatice, %			
manifestări nespecifice	70%	-	66,7%
hepatomegalie	90%		62,5%
splenomegalie	70%		50%
hepatita cronică	30%		33,3%
ciroză hepatică compensată	30%		12,5%
ciroză hepatică decompensată	10%		20,8%
Manifestări neurologice, %			
tulburare de mișcare hiperkinetică	-	66,7%	58,3%
sindrom pseudo-bulbar		58,3%	45,8%
sindrom cerebelos ataxic		50%	45,8%
afectarea mișcărilor fine		75%	45,8%
tetrapareză		16,7%	4,2%
Manifestări psihiatrice, %			
absența acestor simptome	-	33,3%	25%
afectarea concentrației		58,3%	50%
modificări de dispoziție		50%	37,5%
tulburarea somnului		41,6%	45,8%
tulburare de comportament		33,3%	12,5%
sindrom depresiv		16,7%	16,6%
tulburări cognitive		16,7%	4,16%

IKF, %	10%	25 %	62,5%
Leziuni cerebrale la RMN, %	-	66,7%	66,7%
Modificări biologice, %			
pancitopenie	20%	-	16,7%
trombocitopenie	10%		25%
Sindrom de citoliză	100%*		54,16%*
Sindrom de colestază	80%*		20,8%*
Sindrom hepatopriv	60%*		25%*
Modificări ale metabolismului Cu			
Cp serică ± DS, (20-60 mg/dL)	10,46 ± 3,14	14,33 ± 9,96	10,61 ± 7,08
<i>F=1,29 p=0.28</i>			
Cu urinar în 24h ± DS, (10-60 µg/24h)	258,71 ± 176,76*	120,52 ± 69,85*	213,03 ± 176,43
<i>F=1,68 p=0.11</i>			
Varietatea genetică, %			
Absența de variante patogene	-	25%	4,17%
p.H1069Q	60%	58,3%	62,5%
p.Phe764=	30 %	-	-
p.G1341D	20 %	8,33%	16,7%
variante benigne	20 %	-	16,7%
p.Met769Hisfs*26	20 %	-	12,5%
p.Ala1135GlnfsX13	10%	-	-
p.T991T	-	8,33 %	-
p.E541K	-	8,33 %	-
p.Q544X	-	8,33 %	-
c.2532delA	-	-	4,17%
p.G1341V	-	-	4,17%
p.Asn728Ile	-	-	4,17%
p.A1227T	-	-	4,17%

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

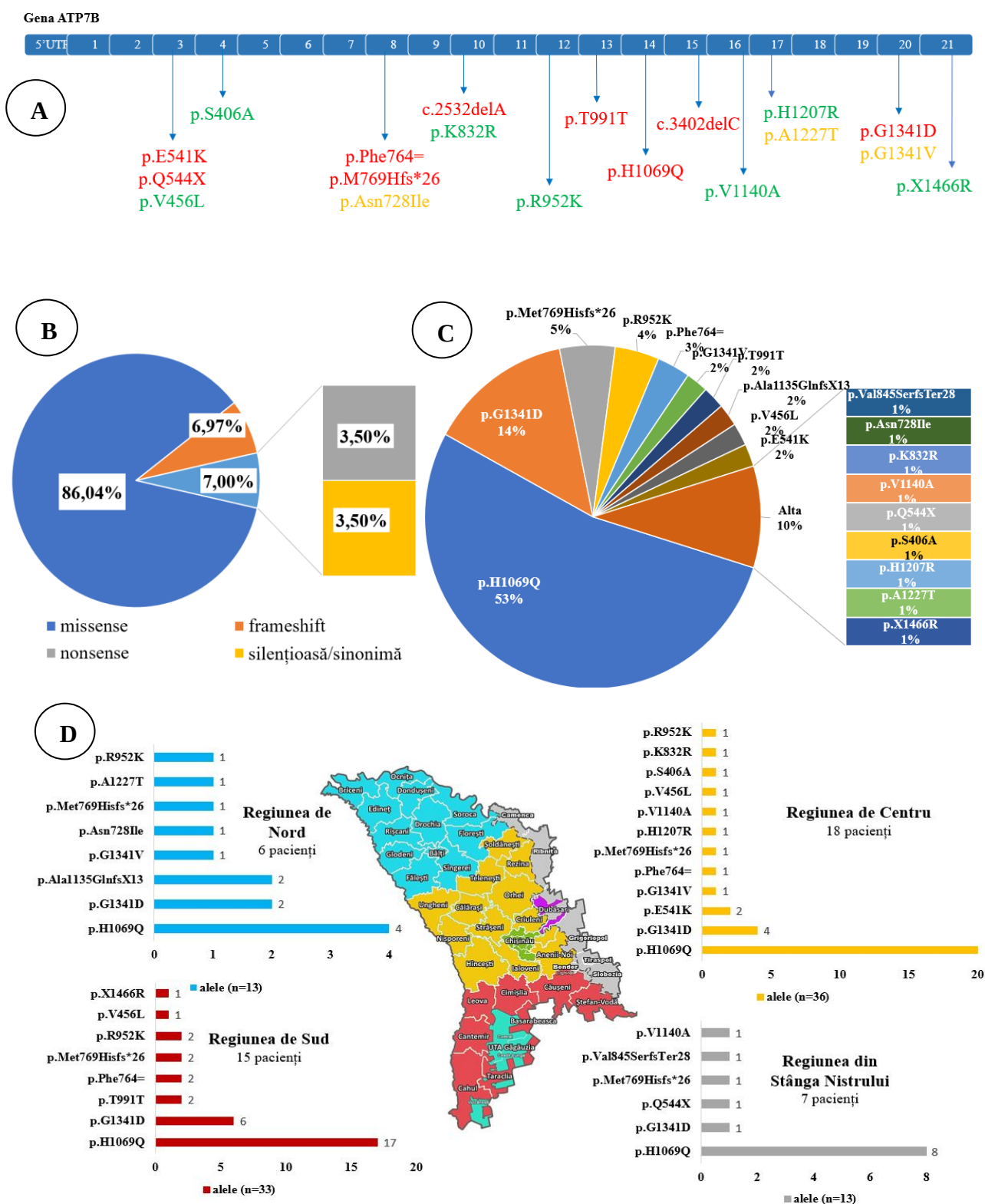
Anexa 14. Definirea variantelor conform parametrilor genetici și fenotip

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=	silențioasă/ 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 (premature STOP)	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

Exon	Modificare nucleotide	Modificare aminoacizi	Tip variant	Regiune proteică	Patogenitate	Statut/ n pacient	Fenotip
	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

Nota: het com – heterozigot compus; hom rec – homozigot recesiv; N – neurologic; H - hepatic; N-H – neuro-hepatic; n - număr

Anexa 15. 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 alelor și a pacienților testați în funcție de regiunea țării (n).

Anexa 16. 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
		$t=0,46; p=0.65$	
Vârsta medie la stabilirea diagnosticului ± DS, ani		20,03 ± 8,71	24,67 ± 9,31
		20,5	27,5
mediana (perc.25 – perc.75), ani		(14,25-26,75)	(16,25-31,75)
		$t=1,56; p=0.13$	
Durata diagnostic ±DS, luni		16,65 ± 20,52*	39,91 ± 39,71*
Debutul bolii <18 ani, %		38,3%	33,3%
Decedați, n		2	1
Fenotip, n (%)	hepatic	8 (23,5%)	4 (33,3%)
	neurologic	9 (26,5%)	2 (16,7%)
	mixt	17 (50%)	6 (50%)
		$\chi^2=3,66, gl=2, p=0,16$	
IKF, %		38,3%	13,3%
Modificări ale metabolismului cuprului,			
medie	Cp serică (20-60 mg/dL)	11,73 ± 7,46	9,85 ± 7,48
		$t=2,60; p=0,46$	
		224,64 ± 212,77	216,21 ± 133,78
Cu urinar în 24h (10-60 µg/24h)		$t=0,75; p=0,89$	
Modificări biologice, %			
pancitopenie		11,7%	8,33%
trombocitopenie		26,5%	33,3%
sindrom de citoliză		41,2%	58,3%
sindrom de colestază		29,4%	25%
sindrom hepatopriv		20,6%	33,3%
		$\chi^2=13,05, gl=2, p<0.001$	

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

Anexa 17. 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
		<i>t=0,68, p=0.5</i>	
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%)
		<i>χ²=2.11, gl=2, p=0.35</i>	
IKF, %		50%	27,8%
		<i>p=0.19</i>	
Modificări ale metabolismului Cu,			
medie	Cp serică (20-60 mg/dL)	11,91 ± 6,86	15,59 ± 8,14
		<i>t=1,42; p=0.17</i>	
	Cu urinar în 24h (10-60 μg/24h)	190,95 ± 190,97	247,96 ± 231,25
		<i>t=0,778; p=0.44</i>	
Modificări biologice, %			
	pancitopenie	12,5%	16,7%
	trombocitopenie	31,5%	22,2%
	sindrom de citoliză	18,75%*	61,1%*
	sindrom de colestază	12,5%*	44,4%*
	sindrom hepatopriv	18,75%	22,2%
		<i>χ²=24,88, gl=4, p<0.001</i>	

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

Anexa 18. 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
<i>t=0,15; p=0.89</i>		
Vârsta medie la stabilirea diagnosticului ± DS, ani	21,03 ± 9.02*	23,43 ± 10,61*
mediana (perc.25 – perc.75), ani	21,0 (13,5-28)	26,0 (16,0-32,5)
Durata diagnostic ±DS, luni	22,85 ± 24,72	16,28 ± 30,07
<i>t=0,61; p=0.54</i>		
Debutul bolii <18 ani, n (%)	11 (43,75%)	3 (42,86%)
<i>p=0.96</i>		
Decedați, n	2	1
Fenotip, n (%)		
hepatic	5 (15,63%)	3 (42,86%)
neurologic	8 (25,0%)	1 (14,29%)
mixt	19 (59,37%)	3 (42,86%)
<i>χ²=2,64, gl=2, p=0.27</i>		
IKF, n (%)	13 (40,63%)	2 (28,57%)
<i>p=0.96</i>		
Modificări ale metabolismului Cu,		
medie Cp serică (20-60 mg/dL)	10,27 ± 5,92	9,78 ± 6,69
<i>t=0,19; p=0,84</i>		
Cu urinar în 24h (10-60 μg/24h)	233,02 ± 203,6	170,19 ± 234,72
<i>t=0,72; p=0,48</i>		
Modificări biologice, %		
pancitopenie	3 (9,38%)	2 (28,57%)
trombocitopenie	4 (12,5%)	1 (14,29%)
sindrom de citoliză	12 (37,5%)	5 (71,43%)
sindrom de colestază	8 (25,0%)	2 (28,57%)
sindrom hepatopriv	6 (18,75%)	3 (42,86%)
<i>χ²=0.97, gl=4, p=0.91</i>		

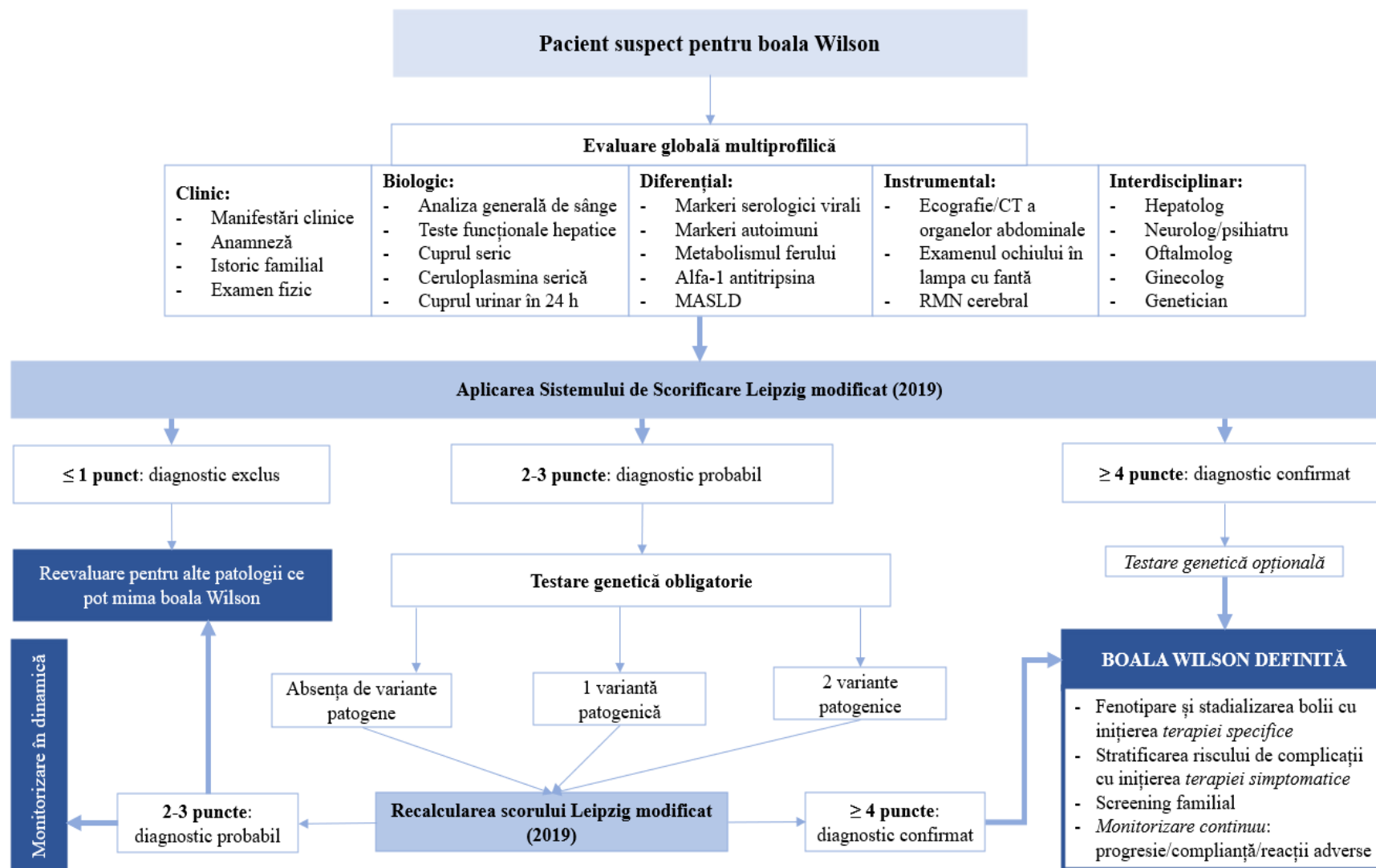
* prag semnificație statistică între 2 grupe comparate: p<0.05

Anexa 19. Rezultatele investigațiilor pacienților identificați prin screening familial [83]

	Pacient 1	Pacient 2	Pacient 3	Pacient 4	Pacient 5	Pacient 6	Pacient 7	Pacient 8
Vârsta diagnostic, ani	34	8	5	12	5	23	21	22
Sex	Bărbat	Bărbat	Bărbat	Femeie	Bărbat	Bărbat	Femeie	Bărbat
Raport proband	Frate	Nepot	Nepot	Soră	Frate	Frate	Soră	Verișor
Simptome clinice	Absente	Absente	Absente	Absente	Absente	Absente	Absente	Prezente
Fenotip	H	H	H	H	H	H	N-H	N-H
Cp (mg/dL)	5 (15-30)	14 (15-30)	10 (15-30)	24 (16-45)	24 (16-45)	6.9 (25-43)	14 (20-60)	53 (200-600mg/l)
Cu urinar/ 24 h (µg/24h)	139.4 (10-60)	117.95 (10-60)	72.7 (3-35)	41.91 (10-60)	41.91 (10-60)	52.4 (10-60)	121.98 (10-60)	189 (<60)
Cu urinar/ 24 h după test D-PA (µg/24h)	484.9 (10-60)	976.5 (10-60)	424.9 (10-60)	1022 (10-60)	325 (10-60)	1324 (<60)	-	317 (15-59)
ALT (U/L)	38 (<41)	173 (<29)	185 (<36)	100 (<30)	20 (<30)	58.8 (<35)	27 (<30)	19.9 (<35)
AST (U/L)	26 (<37)	104 (<36)	88.6 (<53)	39 (<30)	15(<30)	35 (<31)	20 (<30)	20.2 (<35)
IKF	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Prezent	Prezent
Eco Abd	HS-M	H-M	Normal	HM	HS-M	HS-M	HS-M	S-M
RMN cerebral	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	-	-	Atrofie cerebrală difuză în ambele

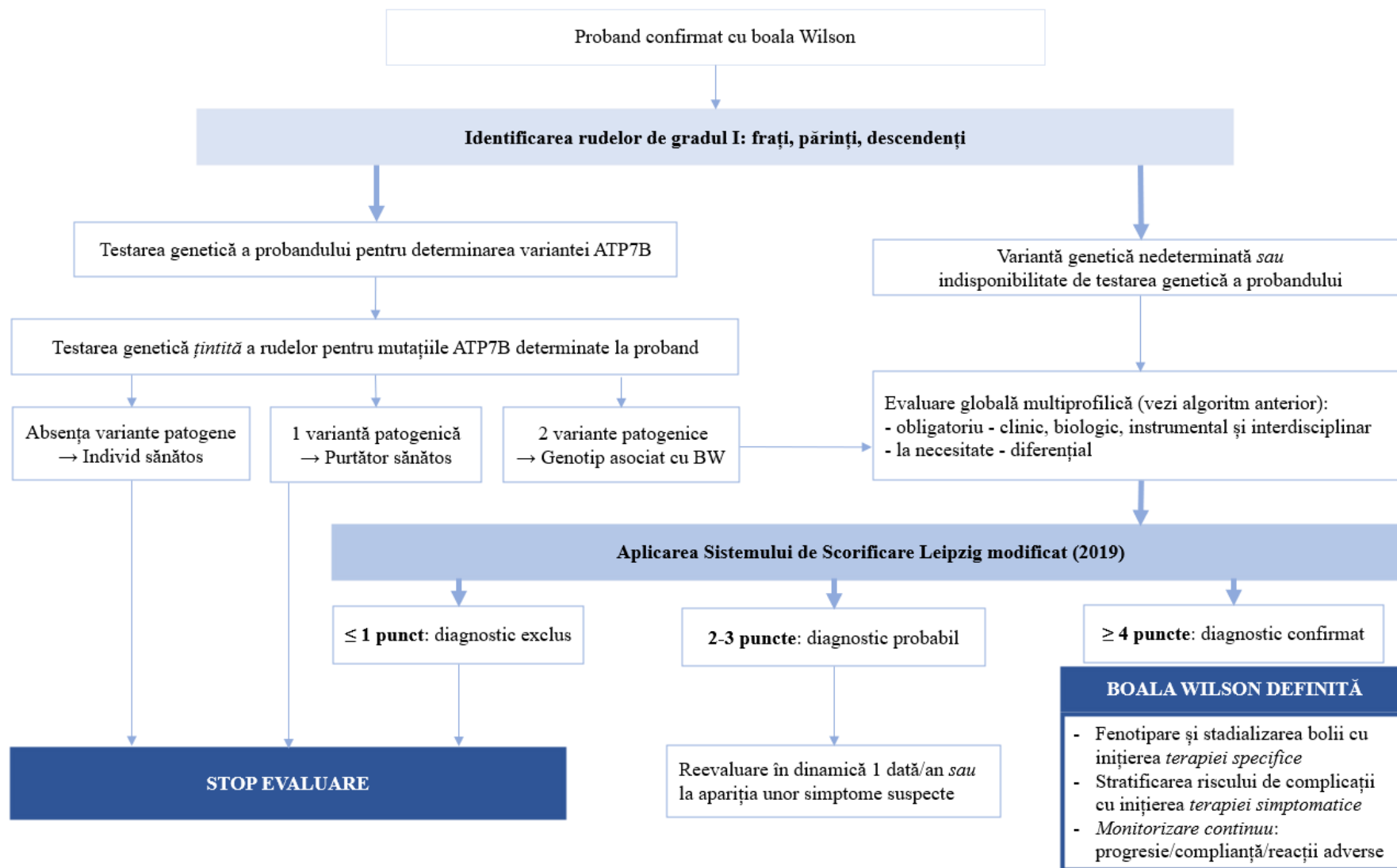
								emisfere cerebelare și cerebrale
Genotip ATP7B	p.Phe764=/ p.Met769Hisf s*26	p.H1069Q/ p.Phe764=	p.H1069Q/ p.Met769Hisf s*26	p.H1069Q/ p.H1069Q	p.H1069Q/ p.Gly1341Asp	p.G1341D / p.G1341D	p.H1069Q/ p.H1069Q	p.H1069Q/ p.G1341D
Scor Leipzig modificat	8p	8p	9p	6p	6p	8p	9 p	12 p
<i>Note:</i> ALT – alaninaminotransferaza; AST – aspartataminotransferaza; D-PA - D-Penicilamin; Eco Abd – ecografie abdominală, H-M – hepatomegalie; HS-M – hepatosplenomegalie; S-M – splenomegalie; IKF- inel Kayser-Fleischer; Cu – cupru; Cp – ceruloplasmina; RMN – rezonanța magnetică nucleară.								

Anexa 20. Algoritmul de stabilire a diagnosticului de boala Wilson



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

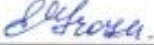
Anexa 21. Algoritmul de screening familial în boala Wilson



Anexa 22. Acte de implementare "Algoritmul de stabilire a diagnosticului de boala Wilson"

	INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA	Pag. 5 / 5
APROB Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM prof. univ., dr. hab. șt. med., academician al AȘM Stanislav GROPPA  ACTUL nr. 84 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (în procesul științifico – practic) 1. Denumirea ofertei pentru implementare: „ALGORITMUL DE STABILIRE A DIAGNOSTICULUI DE BOALĂ WILSON” 2. Autori: ȚURCANU A., dr. hab. șt. med., conf. univ., CUMPĂȚĂ V., doctorandă, medic gastroenterolog; TCACIUC E., dr. hab. șt. med., prof. univ.; SACARĂ Victoria, dr. hab. șt. biol., conf. cercet. 3. Numărul inovației: Nr.6243 din 19 aprilie 2024. 4. Unde și când a fost implementată: Metoda au fost implementată în IMSP SCR ”Timofei Moșneaga”, dep.Gastroenterologie și IMSP IM și C, Laboratorul de Genetică Moleculară Umană a IMSP IM și C. în calitate de parte componentă în algoritmul de stabilire a diagnosticului de boală Wilson în 2020-2024 aa. 5. Eficacitatea implementării: Valoarea aplicativă a acestei metode se încadrează în activitatea practică – prin asigurarea unor standarde optime de îngrijire, toți pacienții cu boli cronice ar avea dreptul la acces echitabil la cea mai înaltă calitate a îngrijirii clinice, bazate pe dovezile actuale și furnizate de echipe multidisciplinare cu resurse adecvate și cu experiență. 6. Rezultatul implementării: Screening-ul activ al pacienților suspectați de dereglarea metabolismului cuprului poate îmbunătăți diagnosticul prompt, ameliora răspunsul și rezultatele la tratament, astfel încât să se asigure accesul în timp util la îngrijiri medicale de calitate. <i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.</i> Șef departament, Departamentul Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. Director, ISMP SCR ”Timofei Moșneaga”, dr. șt. med., conf. univ. Director IMSP IM și C dr. șt. med., conf. univ.  RAEVSCI Elena  UNCUȚA Andrei  GLADUN Sergiu  5		

Anexa 23. Acte de implementare "Algoritmul de screening familial în boala Wilson"

	INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA	Pag. 5 / 5
APROB Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM prof. univ., dr. hab. șt. med., academician al AȘM Stanislav GROPPA  ACTUL nr. 85 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (în procesul științifico – practic) 1. Denumirea ofertei pentru implementare: „ALGORITMUL DE SCREENING FAMILIAL ÎN BOALĂ WILSON” 2. Autori: CUMPĂȚĂ V., doctorandă, medic gastroenterolog; ȚURCANU A., dr. hab. șt. med., conf. univ., SACARĂ V., dr. hab. șt. biol., conf. cercet. 3. Numărul inovației: Nr.6244 din 19 aprilie 2024. 4. Unde și când a fost implementată: Metoda au fost implementată în IMSP SCR "Timofei Moșneaga", dep.Gastroenterologie și IMSP IM și C, Laboratorul de Genetică Moleculară Umană a IMSP IM și C. în calitate de parte componentă în algoritmul de stabilire a diagnosticului de boală Wilson în 2020-2024 aa. 5. Eficacitatea implementării: Valoarea aplicativă a acestei metode se încadrează în activitatea practică – prin asigurarea unor standarde optime de îngrijire, toți pacienții cu boli cronice ar avea dreptul la acces echitabil la cea mai înaltă calitate a îngrijirii clinice, bazate pe dovezile actuale și furnizate de echipe multidisciplinare cu resurse adecvate și cu experiență. 6. Rezultatul implementării: Screening-ul activ al pacienților în forma a-/presimptomatică printre membrii de familie a unui pacient nou diagnosticat cu boala Wilson poate îmbunătăți diagnosticul prompt, ameliora răspunsul și rezultatele la tratament, astfel încât să se asigure accesul în timp util la îngrijiri medicale de calitate. <i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.</i> Șef departament, Departamentul Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. Director, ISMP SCR "Timofei Moșneaga", dr. șt. med., conf. univ. Director IMSP IM și C dr. șt. med., conf. univ.  RAEVSCHI Elena  UNCUTA Andrei  GLADUN Sergiu  5		





Anexa 26. Adeverință privind înscrierea obiectelor dreptului de autor și alte drepturi conexe "GHIDUL PACIENTULUI CU BOALA WILSON"

(<https://db.agepi.md/opere/SearchResult.aspx>)


REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

ADEVERINȚĂ
privind înscrierea obiectelor
dreptului de autor și ale drepturilor conexe

SERIA OȘ NR. 7981
DIN 15.08.2024

eliberată în temeiul Legii nr. 230/2022 privind dreptul de autor
și drepturile conexe, prin care se confirmă înscrierea obiectului de pe verso
în Registrul de Stat al obiectelor protejate de dreptul de autor și drepturile conexe


Director general

CHIȘINĂU

Anexa 27. Adeverință privind înscrierea obiectelor dreptului de autor și alte drepturi conexe "РУКОВОДСТВО ДЛЯ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА"
(<https://db.agepi.md/opere/SearchResult.aspx>)


REPUBLICA MOLDOVA
Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuala

ADEVERINȚĂ
privind înscrierea obiectelor
dreptului de autor și ale drepturilor conexe

SERIA OȘ NR. 7982
DIN 15.08.2024

eliberată în temeiul Legii nr. 230/2022 privind dreptul de autor
și drepturile conexe, prin care se confirmă înscrierea obiectului de pe verso
în Registrul de Stat al obiectelor protejate de dreptul de autor și drepturile conexe


Director general

CHIȘINĂU

Anexa 28. Certificat de participare la 1st ERN RARE-LIVER EASL ACADEMY



Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf | Martinistraße 52 | 20246 Hamburg
I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Veronica Cumpata
Stefan cel Mare si Sfânt Boulevard 165,
Chişinău 2004
Moldavia

ERN RARE-LIVER Coordinator
Anger W. Lohse

Martinistraße 52
D-20246 Hamburg

Contact: Hendrik Matthies
Tel.: +49 (0) 40 7410-59134
E-Mail: ern.rareliver@uke.de
Website: www.ukh.de

Hamburg, 11.05.2023

Certificate of attendance

I hereby confirm that Veronica Cumpata attended the 1st ERN RARE-LIVER EASL ACADEMY which took place in Barcelona, Spain, on 27 April 2023 (08:00-18:00, CEST) and 28 April 2023 (08:00-14:00, CEST).

Kind regards

Hendrik Matthies

ERN RARE-LIVER Project Management
University Medical Centre Hamburg-Eppendorf



Gerichtsstand: Hamburg
Körperschaft des öffentlichen Rechts
UStId: DE 21 8518 948

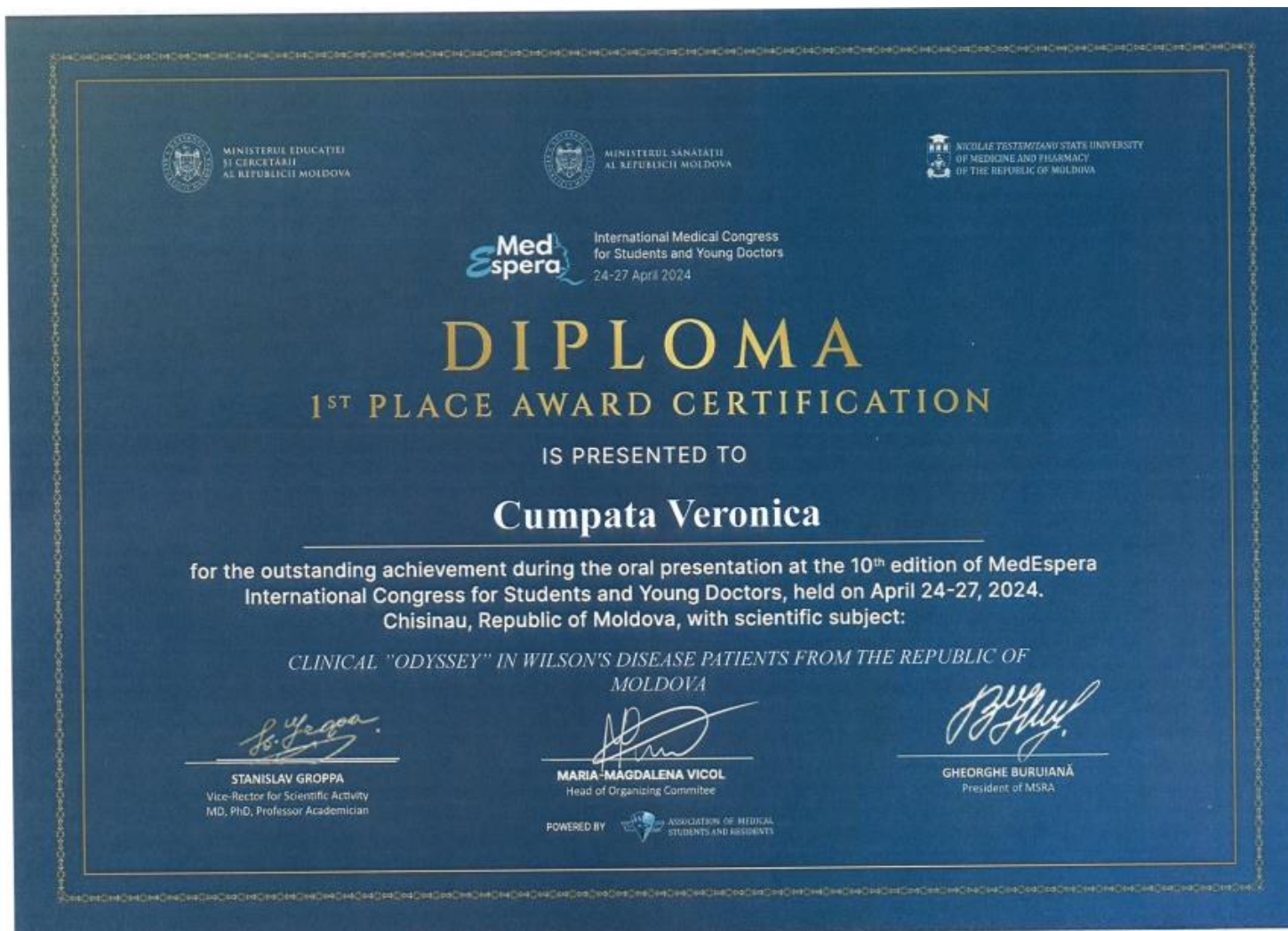
Bank: Hamburg Commercial Bank AG
BIC: HSHNDE33 | Kontoc: 104 364 000
IBAN: DE97 2105 0000 0104 3640 00

Vorstandsmitglieder:
Prof. Dr. Burkhard Göke (Vorstandsvorsitzender)
Prof. Dr. Blanche Schwappach-Pignataro | Joachim PröB | Marja Vendel



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Anexa 29. Diplomă din cadrul evenimentului "The 10th edition of MedEspera International Medical Congress For Students And Young Doctors"



Anexa 30. Diplomă din cadrul evenimentului "3rd edition of the International Exhibition of Innovation and Technology Transfer EXCELLENT IDEA - 2024"



LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRIILOR 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*. Chişinău; 2024, p.124. ISBN 978-9975-3544-2-4.

- naţionale

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*. Chişinău; 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 Testemiţanu": abstract book*. Chişinău; 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 Testemiţanu": abstract book*. Chişinău; 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 Testemiţanu": abstract book*. Chişinău; 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. **Cumpata 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.

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală, că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Numele de familie, prenumele

Cumpătă Veronica

Semnătura

V. Cumpata
16 mai 2015

Data

Declaration on accountability

I declare the personal responsibility that the information presented in this thesis is the result of my own research and scientific achievements. I realize that, otherwise, will suffer the consequences by law.

Surname, first name

Cumpata Veronica

Signature

V. Cumpata
16 mai 2015

Date

Déclaration sur la responsabilité

Je déclare la responsabilité personnelle que les informations présentées dans cette thèse sont le résultat de mes propres recherches et réalisations scientifiques. Je me rends compte que, sinon, en subiront les conséquences conformément à la loi.

Nom, prénom

Cumpata Veronica

Signature

V. Cumpata
16 mai 2015

Date

	
INFORMAȚII PERSONALE	
Nume / Prenume	Cumpăta Veronica
Adresa	Str. Așhabad 127/8, ap.24, orașul Chișinău, MD-2002, Republica Moldova
Telefoane	GSM: (+373) 69353776
e-mail	veronica.cumpataciorba@gmail.com
Sex	Feminin
Data nașterii	22 mai 1989
Naționalitatea	Republica Moldova
EXPERIENȚA PROFESIONALĂ	
Perioada Funcția și postul ocupat Tipul activității	Septembrie 2024-prezent Asistent universitar Catedra Medicină de familie, USMF “Nicolae Testemițanu” Bd. Ștefan cel Mare și Sfânt 165, Chișinău
Perioada Funcția și postul ocupat Tipul activității	2019-prezent Medic gastroenterolog/hepatolog Clinica de Gastroenterologie și Hepatologie/ HELPA, bd. Grigore Vieru 23, Chișinău
Perioada Funcția și postul ocupat Tipul activității	2017-2021 profesor Medicină Internă Centrul de Excelență în Medicină și Farmacie ”Raisa Pacalo”, str. N. Testemițanu 28, Chișinău
Perioada Funcția și postul ocupat Tipul activității	2013-2017 Medic-rezident, specialitate Gastroenterologie, Disciplina de gastroenterologie IMSP Spitalul Clinic Republican ”Timofei Moșneaga”, str. N. Testemițanu 29, Chișinău
EXPERIENȚĂ DE CERCETARE	
Perioada Funcția și postul ocupat Tipul activității	Iulie 2024 – prezent Sub-Investigator, doctorand Studiul IRI-OP-OB (cod PN-IV-P8-8.3-ROMD-2023-0262) în colaborare cu Institutul Național de Endocrinologie „C. I. Parhon”, București, România.

Perioada Funcția și postul ocupat Tipul activității	Iulie 2022 – May 2024 Sub-Investigator Studiu de faza a 3-a, randomizat, în regim deschis, pe grupuri paralele, pentru evaluarea eficacității și siguranței injecției subcutanate cu Peginterferon Lambda-la (Lambda) 180 mcg timp de 48 de săptămâni la pacienți cu infecție cronică cu virusul hepatic Delta (VHD) (LIMT-2)
Perioada Funcția și postul ocupat Tipul activității	Mai 2020 – Mai 2023 Sub-Investigator Studiu de fază 3, cu design matriceal, parțial dublu-orb, randomizat, privind eficacitatea și siguranța tratamentului cu 50 mg Lonafarnib/100 mg Ritonavir b.i.d. cu și fără 180 mcg Peg INF-alfa-2a timp de 48 de săptămâni comparativ cu tratamentul cu Peg INF -alfa-2a în monoterapie și placebo la pacienții infectați cronic cu virusul hepatitei Delta aflați în terapie de întreținere anti-VHB cu analogi nucleoz(t)idici (D-LIVR)
Perioada Funcția și postul ocupat Tipul activității	2020-2023 Voluntar Proiectul de cercetare de în Programul de Stat "Infertilitatea masculină sistematogeneza factorilor de risc, studiul mecanismelor patologice și optimizarea strategiilor de prevenire, monitorizare și tratament în populația Republicii Moldova"
EDUCAȚIE ȘI FORMARE	
Perioada Calificarea/diploma obținută Numele și tipul instituției de învățământ	Noiembrie 2013 – August 2017 Gastroenterologie, diploma AL nr. 007855 din 01.08.2017 USMF "Nicolae Testemițanu", facultatea Rezidențiat, Chișinău.
Perioada Calificarea/diploma obținută Numele și tipul instituției de învățământ	Septembrie 2007 – Iunie 2013 Medicină Generală, diploma ASM nr. 000004018 din 14.06.2013 USMF "Nicolae Testemițanu", facultatea Medicină, Chișinău.
Perioada Calificarea/diploma obținută Numele și tipul instituției de învățământ	Septembrie 2004 – Iunie 2007 Bacalaureat, profil Real, diploma AB nr. 0000014581 din 30.06.2007 Liceul Teoretic „Ștefan cel Mare”, or. Rezina
ALTE FORMĂRI/INSTRUIRI	
	♦ Educație profesională continuă:

2013-prezent	Certificate congrese, conferințe, seminare, workshop-uri: >70 European CME credits of European Accreditation Council for Continuing Medical Education; >100 de credite de Educație Medicală Continuă ale Colegiului Medical din România; >200 de Ore de Educație Medicală Continuă în Republica Moldova.				
COMPETENȚE PERSONALE					
Limba maternă	Română				
Autoevaluare	Înțelegere		Vorbire		Sc ier e
Nivel european (*)	Ascultare	Citare	Participare la conversație	Discurs oral	Expr imar e scris ă
Rusă	C2	C2	C2	C2	C2
Franceză	B2	B2	B1	B1	B1
Engleză	B2	B2	B1	B1	B1
	(*) Nivelul Cadrului European Comun de Referință Pentru Limbi Străine				
Competente organizaționale/ manageriale	◆ Membrul al comitetului de organizare – 2nd Update Hepatology Course, 17-18 Decembrie 2021 (Chișinău, Republica Moldova) ◆ Membrul al comitetului de organizare - 3rd Update Hepatology Course 2022: New frontiers in Hepatology! 09-10 Decembrie 2022 (Chișinău, Republica Moldova) ◆ Membrul al comitetului de organizare – 4th Update Hepatology Course 2023: Rare liver diseases – the transition of care from pediatric to adult patients. 09 Decembrie 2023 (Chișinău, Republica Moldova) ◆ Secretar al Alianței pentru Boli Hepatice Rare din Moldova				
Competente dobândite la locul de muncă	◆ o bună cunoaștere a procesului de examinare clinică a pacienților cu patologie gastrointestinală și hepatică; ◆ aptitudini în analiza multivariațională statistică, obținute în timpul realizării diferitor lucrări științifice;				

	◆ acumularea de experiență în colectarea și păstrarea datelor, pe parcursul implicării ca sub-investigator în studiile clinice menționate anterior.
Competențe și aptitudini PC	Windows, MS Office: Word, Excel, Power Point; Internet, Sisteme Informaționale Automatizate, utilizarea aplicațiilor Adobe, Photoshop, Canva; crearea și gestionarea în sistemul Google Meet și Zoom.
Permis de conducere	Categoria B
ALTE INFORMAȚII	
Publicații	>30 de lucrări științifice publicate (articole, materiale/teze), 2 materiale cu caracter informativ, 2 inovații, 2 acte de implementare
Prezentări	Orale și postere: UpDate Hepatology Chișinău (2021-2024), Conferințe/Congrese USMF (2015, 2019-2023), Congres MedEspera (2022, 2024), Congres Național de Gastroenterologie, Hepatologie și Endoscopie Digestivă din România (2023, 2024), Săptămâna Medicală Balcanică (2023), UpDate Hepatology România (2023), APASL (2024), Congres "Ziua bolilor rare" (2025), EASL (2025).
Membru al unor Societăți/ Asociații medicale	✓ Membru al Asociației Europene de Studiu al Ficatului (EASL) ✓ Membru al Societății de Boli Hepatice din Africa (SOLDA) ✓ Membru al Societății Române de Gastroenterologie și Hepatologie (SRGH) ✓ Secretar la Alianța pentru Boli Hepatice Rare din Moldova (ABHR) ✓ Membru al Societății de Gastroenterologie și Hepatologie din Republica Moldova