

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ ÜNİTESİ**

**WILSON SİROZU OLAN HASTALARDA SERUM TNF- α
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

118662

Uzm. Dr. Taylan Kav

118662

**TEZ DANIŞMANI
Prof Dr. Yusuf Bayraktar**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Ankara

2002

TEŞEKKÜR

Yazar bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesindeki katkılarından dolayı adı geçen kişilere içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Prof Dr. Yusuf Bayraktar tez danışmanlığını üstlenmiş ve her aşamasında yardım ve desteklerini esirgememişlerdir.

Gastroenteroloji bölümünün değerli öğretim üyelerine araştırma örneklemini oluşturmada gösterdikleri destek nedeniyle,

Laboratuvar çalışmalarını yürüten Hematoloji Laboratuvarından sayın Şerafettin Kirazlı ve Gastroenteroloji laboratuvarından sayın Mahmut Eren.

Bu çalışmaya katılan bütün hastalarımız ve sağlıklı gönüllülerimize ayrıca teşekkür etmek isterim.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.



ÖZET

Wilson Hastalığı otozomal resesif geçiş gösteren, bakır metabolizmasında bozulma sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. WH geni 13. kromozom üzerinde yer alır. Bu genin ürünü ATP7B adındaki bakır taşıyıcı proteindir. Bu proteini üreten gen üzerinde 200 ün üzerinde mutasyon gösterilmiştir. Mutasyonların fazla çeşitli olması nedeni ile genetik tarama yapılması pratik bir yaklaşım değildir.

Bazı nedenlerden dolayı hastalık tablosu kişiden kişiye değişiklikler göstermektedir. Bu değişiklikleri sadece mutasyonlarla açıklamak mümkün değildir. Aynı mutasyona sahip bireylerde hastalığın görünümü ve seyri farklı olabilmektedir.

Amaç: Karaciğerde ki inflamasyon kişiler arasında farklılıklar gösteren bir süreçtir. Wilson hastalığında artmış TNF- α düzeylerinin rolü var mıdır. Bu çalışmanın amacı Wilson Hastalarında kan TNF- α düzeylerinin belirlenmesi ve kontrollerle karşılaştırılmasıdır.

Metod: Bölümümüzce izlenmekte olan wilson hastalarının kayıtları incelendi. Kesin Wilson hastalığı tanısı olan hastalar belirlendi ve çalışmaya katılmaları istendi. Hastaların kan TNF- α düzeyleri bir ELİSA sistemi ile yapıldı.

Sonuçlar: 24 wilson hastası ve 28 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı. Gruplar yaş ve cinsiyet açısından birbirine benzerdi. Beklendiği üzere, her iki grup arasında karaciğer fonksiyon testleri açısından anlamlı fark vardı $p < 0.05$. Kan TNF- α düzeyleri açısından araştırıldığında ise anlamlı bir fark olmadığı görüldü $p > 0.05$.

Wilson hastalığı bilemediğimiz çeşitli faktörler tarafından etkilenen bir hastalıktır. TNF- α nın hastalık patogeneğinde rol oynamadığını kesin olarak söylemek mümkün değildir. Ancak bu sonucun ileri çalışmalarca desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Wilson Hastalığı, Kronik KC Hastalığı, İnflamasyon, Tumor Necrosis Factor Alfa, Hepatit.

ABSTRACT

Wilson's disease is a rare inherited autosomal recessive disorder, characterized by impaired incorporation of copper into ceruloplasmin and by impaired excretion via the bile. About 200 mutations have been detected throughout the whole gene that is located at chromosome 13 and coding ATP7B protein, a copper transporter protein. The underlying mutations are very heterozygous, thus the genetic screening for mutations is not practical.

Because of some factors disease presentations differ person to person. This could not be explained solely by mutations. Patients with same mutations may have different clinical pictures. Spectrum of disease could be affected by some factors such as differences in copper trafficking in the liver cells.

Aim: Inflammatory response is unique for everyone and changes the disease processes in variety of diseases including hepatitis. Is there role of an elevated level of TNF- α in Wilson's Disease. This study aimed to investigate blood TNF- α levels of Wilson's disease patients.

Methods: Clinical records of patients with WD admitted to our Gastroenterology outpatient department were analyzed. Patients with exact diagnosis of Wilson's disease were identified and called to participate the study. Measurements of blood TNF- α levels were performed by an ELISA system.

Results: 24 patients and 28 normal controls were involved the study. Distributions of age and gender were equal. There was a statistically significant difference between the liver function tests of both groups ($p < 0.05$), as expected. When we compared the blood TNF- α levels between groups, there was no significant difference ($p > 0.05$).

Conclusions: Wilson's Disease is a multifactorial disease that is affected by different variables. Interestingly TNF- α doesn't seem to involved in the pathogenesis of the disease. This conclusion should be supported by further studies.

Key Words: Wilson's Disease, Hepatitis, Tumor Necrosis Factor Alpha, Inflammation, Chronic Liver Disease

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
TABLolar.....	VII
ŞEKİLLER.....	IX
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	-
1.1. Wilson Hastalığı Hakkında Genel Bilgiler	4
1.1.1 Giriş	4
1.1.2. Tarihçe	4
1.1.3. Epidemiyoloji	5
1.1.4. Bakır Metabolizması	5
1.1.5. Hepatik Bakır Metabolizması	6
1.1.6. Wilson Hastalığı ATPazı (ATP7B)	11
1.1.7. İntrasitoplazmik Bakır Taşıyıcılar	13
1.2.1. Patogenez	13
1.2.2 Tümör Nekrosis Faktör α (TNF-α)	16
1.2.3. Patoloji	18
1.2.4. Diğer Organlar	18
1.3.1. Klinik	19
1.3.2. Hepatik form	19
A) Akut Karaciğer Yetmezliği	19
B) Kronik hepatit	20
C) Siroz	20
D) Hepatoselüler Karsinom	20
1.3.3. Nörolojik form	21

	SAYFA
1.3.4. Psikiyatrik form.....	22
1.3.5. Oftalmolojik bulgular.....	22
1.3.6. Böbrek bulguları.....	22
1.3.7. Diğer değişiklikler.....	22
1.4. Tanı.....	23
1.4.1. Seruloplazmin düzeyleri.....	23
1.4.2. İdrar bakır atılımı.....	23
1.4.3. Karaciğer biyopsisi.....	23
1.4.4. Genetik tanı.....	24
1.5. Tedavi.....	24
1.5.1. İlaç tedavisi.....	24
1.5.2. BAL (British Anti Lewisite).....	26
1.5.3. D-Penisilamin.....	26
1.5.4. Trientine.....	27
1.5.5. Elemental çinko.....	27
1.5.6. Tetrathiomolybdate.....	27
1.5.7. Karaciğer transplantasyonu.....	28
1.6. Prognoz.....	28
2. BİREYLER VE YÖNTEM.....	29
2.1. Gruplar.....	29
2.1.1. Wilson hastaları.....	29
2.1.2. Sağlıklı kontrol grubu.....	30
2.2. Ölçümler.....	30
2.2.1. Serum TNF- α Düzeylerinin Ölçüm İşlemi.....	30
A) Reaktiflerin hazırlanması.....	31
B) Deney prosedürü.....	31
3. İstatistiksel Çalışma.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Tanımlayıcı istatistikler.....	34

	SAYFA
4.1.1. Wilson hastaları.....	34
4.1.2. Sağlıklı kontroller.....	34
4.2. Gruplar arası karşılaştırmalar.....	34
5. TARTIşMA.....	37
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR.....	44



SİMGELER VE KISALTMALAR

WH: Wilson Hastalığı

TNF- α : Tumor Necrosis Factor - α

HBV: Hepatit B Virüs

HCV: Hepatit C Virüs

KC: Karaciğer

KFH: Kaiser-Fleischer halkası

GİS: Gastrointestinal Sistem

CTR1, CTR2 ve CTR3: *copper transporter protein 1,2 ve 3*

hCTR1: *human copper transporter protein 1*

CPC : ATP7B proteini üzerindeki özel bir bölge

SEHPL: ATP7B proteini üzerindeki özel bir bölgede bulunan aminoasid dizisi

HCC: hepatoselüler karsinom

LEC: Long-Evans Cinnamon

MRG, MR: Manyetik Rezonans Görüntüleme

EEG: Elektroensefalogram

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ApoE: Apolipoprotein E

TABLolar**SAYFA**

Tablo 4.1. ALT ve AST Değerleri Açısından Hastaların Karşılaştırılması35

Tablo 4.2. Grupların Ortalama TNF- α Düzeyleri Açısından Karşılaştırılması35



ŞEKİLLER

Şekil	SAYFA
1.1. İnsanlardaki Bakır Metabolizması Görülmektedir.....	7
1.2. Karaciğerde Normal Bakır Metabolizması.....	9
1.3. WH ATPaz Proteini (ATP7B) Moleküler Yapısı.....	11
1.4. WH da Patogenetik Mekanizmalar.....	15
4.1. WH ve Kontrol Grubunda Serum ALT ve AST Düzeyleri.....	36
4.2. WH ve Kontrol Grubunda TNF- α Düzeyleri.....	36



GİRİŞ:

WH otozomal resesif geçiş gösteren, bakır metabolizmasında bozulma sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu hastalığa ait bilgiler 200 yıl öncesine kadar dayanmakla birlikte hastalığın tanısı ve tedavisindeki gelişmeler 20. yüzyıl içinde olmuştur.

Hastalığın geni bir çeşit katyon taşıyıcı ATPaz sentezlemektedir. Bu proteinin asıl görevi karaciğer hücre sitoplazmasındaki bakır düzeyinin sabit tutulmasıdır. Bu fonksiyonu düzgün bir şekilde yerine getirebilmesi için belirli organel ve hücresel alanlarda proteinin bulunması gereklidir. Golgi organeli üzerinde bulunan protein sayesinde aposeruloplazminden seruloplazmin sentezi yapılmaktadır ki bu sayede bakır hücre dışına, ihtiyaç olan diğer organlara zarar vermeden rahatlıkla taşınabilmektedir. Bakırın vücuttan atılımı safra yoluyla olmaktadır. Lizozom cidarındaki ve safra kanalikülleri etrafında bulunan ATP7B proteini sayesinde bu işlem gerçekleşmektedir.

WH da ATP7B proteini normal işlevlerini yerine getiremediği için karaciğer ve beyinde fazla miktarda bakır birikmekte ve hastalığın bulguları ortaya çıkmaktadır. WH belirti ve bulguları kişisel farklılıklar göstermektedir. Aynı genetik mutasyonu taşıyan bireyler arasında bile hastalık tablosu değişiklik gösterir.

şu ana kadar WH geni üzerinde 200 n üzerinde mutasyon saptanmıştır ve her yeni hasta ile birlikte yeni mutasyonlar izlenmektedir. Bazı zel mutasyonlar hastalık tablosunu değiştirmektedir, örneğin; nörolojik form ön plana çıkmakta veya bazı hastalar fulminant hepatitle gelmektedir. Ancak mutasyon çeşitliliği teorisi klinik tablonun neden bu kadar farklı olabildiğini açıklamaktan uzaktır.

Bir diğer teori ise sitoplazmadan bakır alıp işlev görecekleri yere taşımada sorumlu olan taşıyıcı proteinlerin fonksiyonlarında değişiklik olmasıdır. Bakır taşıyıcı proteinler öncelikle bakterilerde bulunmakta, daha sonra insanda eşdeğerleri saptanmaktadır. İnsandaki eşdeğerlerinin fonksiyonları ise hala tam olarak aydınlatılamamıştır ve şu anda WH zerine yapılan çalışmaların çoğunluğu bu proteinlere odaklanmıştır.

Bakır metabolizmasının her aşaması hastalık seyri üzerine etkili gibi görünmektedir. Bu açıdan baktığımızda insan karaciğerinde bakır depolanmasında

görevli proteinler sunduğumuz problemi aydınlatmada yararlı olabilir. Metallothioneinler bu grup içinde en çok çalışılmış proteindir. Bakır veya diğer katyonlar fazla miktarda alındığında bağırsaklar ve karaciğerde yapımı indüklenebilmektedir. Bu sayede emilim azaltılır veya inaktive olması sağlanır. Hastalık tedavisinde çinkonun kullanılması bu teorinin en önemli destek noktasıdır.

TNF- α inflamasyonda rol oynayan önemli araçlardan birisidir. Hücre çoğalması, inflamasyon ve apoptozis gibi çok değişik süreçler üzerine etkileri bilinmektedir. Kronik B ve C hepatitli hastalarda yapılan araştırmalarda TNF- α düzeylerinin artması sonucu ortaya çıkan apoptozisin hepatik hasarın ilk basamağı olduğu görülmüştür. KC de ki yenilenme süreci apoptotik süreçten daha yavaş olursa organ yapısında bozulma görülebilir. Kronik hepatitli hastalarda TNF- α nın rolü yoğun bir şekilde araştırılmaktadır, ancak WH da ki yeri incelenmemiştir.

Hastalık geni büyük olduğu için daha fazla sayıda mutasyonların belirleneceği bir gerçektir. Ancak mutasyonlar her zaman hastalıkları açıklamada yeterli olmayabilir. Bu durumda bireysel farklılıklar ortaya girer ki insanoğlunun hayatta kalmasında ve çevreye uyumunda ki en önemli mekanizmadır. Hastalığın etiyopatogenezinde aydınlatılacak daha bir çok nokta olduğu açıktır.

AMAC

İnflamasyon birçok hastalığın etiopatogenezinde rol oynayan önemli bir süreçtir. Proinflamatuvar mediatörlerin kronik hastalıklarda, ki bunlar; ateroskleroz, koroner arter hastalığı ve kollajen doku hastalığı gibi, rolü araştırılmaktadır. Sitokinler neredeyse bütün çekirdekli hücreler tarafından üretilen peptidlerdir. Karaciğerde ve diğer dokularda sürekli bir sitokin üretimi yoktur. Artık bazı sitokinlerin hepatik inflamasyon, apoptozis ve nekrozda rol oynadığını biliyoruz. Aynı zamanda ilginçtir ki bu mediatörler karaciğer dokusunun rejenerasyonunda da rol almaktadır. Bu sitokinlerin arasında tümör necrosis faktör alfa anahtar rol oynamaktadır. Bu yüzden TNF blokajının bazı karaciğer hastalıklarında tedavi edici rolü araştırılmaya başlanmıştır.

Kronik hepatitlerde özellikle HBV ve HCV ye bağlı olanlarda TNF- α düzeylerinin arttığı bilinmektedir. Bu hastalık gruplarında TNF- α düzeyleri ile hastalık progresyonu ve tedaviye yanıt arasında belirgin bir ilişki vardır. WH da inflamatuvar sitokinlerin hastalığın görünümü ve seyri üzerine etkileri araştırılmamıştır.

Bu çalışmada ki amacımız:

Wilson hastalarında TNF- α düzeylerinin saptanması ve normal kontrollerle arada fark olup olmadığının araştırılmasıdır. Bu sayede hastalık etiopatogenezinde inflamatuvar mediatörlerin yeri araştırılabilecektir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. WILSON HASTALIĞI HAKKINDA GENEL BİLGİLER

1.1.1 Giriş:

WH, bakır metabolizmasının nadir görülen otozomal resesif bir hastalıdır. Karaciğer hastalığı (KC) ve nörolojik semptomlarla kendini belli eder.

Bakır taşıyan P tipi ATPaz daki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. Etkilenen kişilerde KC de bakır birikimi seruloplazmin sentezinde azalma ve safra yoluna bakır atılımında azalma mevcuttur (1,2).

Fazla miktarlardaki bakır KC ve sinir sistemi yanında gözde *decement membran* da birikerek hastalık için tipik sayılan *KFH* oluşumuna yol açar. Bakır diğer dokularda da birikerek bozulmalara neden olabilir. KC deki hasar sonucunda siroz gelişimi ile birlikte beyinde bazal ganglionlarda dejenerasyon görülür(1,2).

1.1.2. Tarihçe:

Tıp literatürü incelendiğinde Hepatik siroz ve nöronal dejenerasyon ile seyreden vakaların ilk olarak 1850 yılında bildirildiği görülmektedir. Bu hastalık ayrı bir klinik tablo olarak 1912 de Kinnear Wilson tarafından bildirilmiştir. Wilson bir nörologdu ve lentiküler nukleusta progresif dejenerasyonla giden, birlikte hepatik sirozun olduğu ailesel bir hastalık olarak tanımlamıştı. Yayınladığı makalenin başlığı ise “Progresif Lentiküler Dejenerasyon: Karaciğer Sirozu İle Birlikte Sinir Sistemi Hastalığı Olan Bir Aile” dir. Başlangıçta Wilson KC ve sinir sistemini birlikte etkileyen bir toksinden bahsetse de bakırın hastalık patogenezindeki rolünün ortaya çıkartılması 35 yıl kadar sürdü (3,4).

1952 de Scheinberg ve Gitlin adında iki araştırmacı hastalığın etkilediği bireylerde seruloplazmin düzeyinin düşük olduğunu buldular. Bearn tarafından hastalığın otozomal resesif karakteri aydınlatıldı. 1985 yılında Frydman ve arkadaşları hastalık geninin kromozom 13 te esteraz D lokusunda olduğunu gösterdiler.

1993 yılında hastalığın geni klonlandı ve ürününün katyon taşıyan P tip ATPaz olduğu belirlendi (3-9).

1.1.3. Epidemiyoloji:

Hastalık belirli bir coğrafik dağılım göstermez. Buna rağmen doğu Avrupa kökenli Yahudilerde, Araplarda, İtalyan, Japon, Çinlilerde, akraba evliliklerinin çok olduğu toplumlarda biraz daha yüksek oranda görülür (10).

Hastalığın prevalansı 1 / 30 000 ila 1 / 100 000 canlı doğum civarındadır. Taşıyıcılık frekansı ise yaklaşık 1 / 90'dır (10).

Hastalık genin tanımlandığı 1993 yılından itibaren şu ana kadar 200 ün üzerinde mutasyon bildirilmiştir. İleriki kısımlarda tartışılacağı gibi bunlar anlamsız, eklenme veya çıkma vb. mutasyonlardır(11).

His1069Gln mutasyonu en sık rastlananlardan bir tanesi olup Polonya da %70 ve Avusturya da % 60 oranında bulunmaktadır. Kuzey Amerika ve Avrupa da saptanan mutasyonların % 10 ila 40 ını oluşturmaktadır. Tam tersine bu mutasyon Asya, Hindistan ve Sardinya da çok nadir görülmektedir (12-15). Ne yazık ki ülkemizde hastalığın prevalansı ve görülen mutasyonlar üzerine yapılmış kapsamlı bir araştırma yoktur.

1.1.4. Bakır Metabolizması:

Bakır yaşam için gerekli eser elementlerden biridir. Özel bakır proteinleri (*cuproproteinler*) bu metalin redoks özelliğini kullanırlar (16).

Bunlar;

- Selüler respirasyon: sitokrom c oksidaz
- Demir hemostazı
- Pigment oluşumu: tirozinaz
- Nörotransmitter yapımı: dopa b-hidroksilaz
- Peptid biyogenezi
- Bağ dokusu sentezi: lizil oksidaz
- Antioksidan savunma: süperoksit dismutaz gibi değişik proteinlerin fonksiyonları için gereklidir.

Hastalıkla ilişkili semptom ve bulgular bu *cuproenzim* lerin fonksiyonlarının bozulmasına bağlıdır.

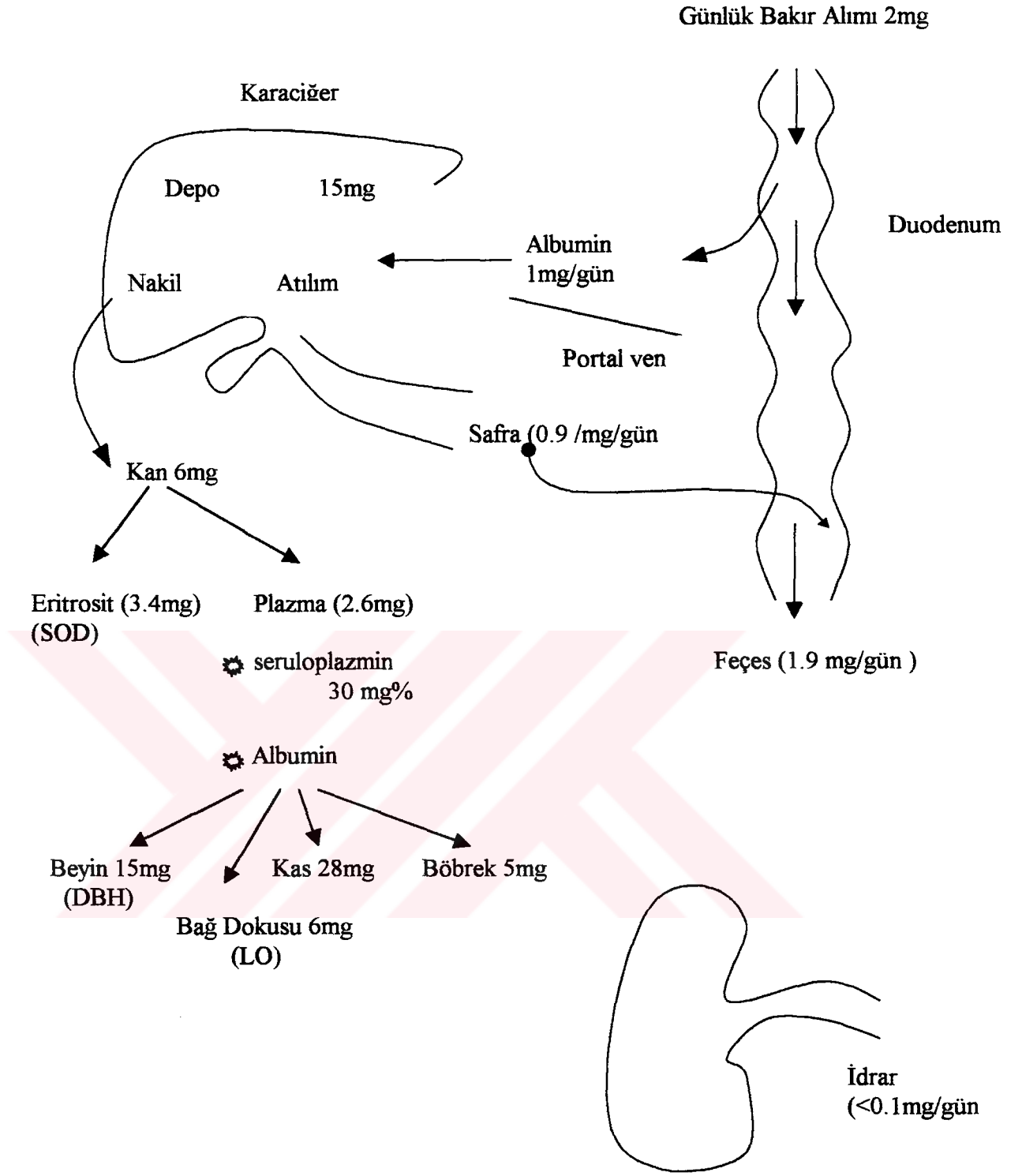
Bakır reaktif bir metal olduğu için homeostasis bozulduğunda toksik olabilir. Bakırın doku üzerine toksik etkileri ise; oksijen radikallerinin oluşumu ve bunun sonucunda hücredeki glutatyon düzeylerinde azalma, lipid, protein ve enzimlerin oksidasyonudur. CD 95 aracılı apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (16-18).

Diyette alınan bakır genelde ihtiyacın çok üzerindedir ve bakırın etkili bir şekilde uzaklaştırılması gerekmektedir. Burada hepatobilier sistem devreye girmektedir.

1.1.5. Hepatik Bakır Metabolizması:

Erişkin insan vücudunda yaklaşık 100 mg bakır bulunmaktadır. Bu metalin dengesini sağlamada iki sistem rol oynamaktadır: gastrointestinal sistemden emilim ve hepatobilier yoldan atılım. Ortalama günlük diyet 4-6 mg bakır içermektedir. Bakırın %40 ı emilir ve aynı miktarda bakır safra yoluyla gastrointestinal sisteme atılır (16-19). (Şekil 1)

Bakır mide ve duodenumdan aktif olarak emilir. Emilen bakırın %25 ila 60'ı serum albumine bağlı olarak portal dolaşıma verilir. İnce barsak epitelinde kalan bakır metallothioneinlere bağlanır ve intestinal hücrelerin yenilenmesi ile dışarıya atılır. Bakır emiliminde Menke's gen ürünü (ATP7A) önemli bir yer tutmaktadır. Bu gen ürününün olmadığı durumlarda bakır yetmezliği ile seyreden Menkes hastalığı ortaya çıkar (16,19,20).



Şekil 1: İnsanlardaki Bakır Metabolizması Görülmektedir. Karaciğer ve Safra Yollarından Bakır Atılımı Bakır Hemostazında Önemli Yer Tutmaktadır. SOD: Superoksid Dismutaz, DBH: Dopamin B Hidroksilaz, LO: Lizil Oksidaz

Portal dolaşıma geçen bakır KC tarafından hızla alınır. Albümine bağlı çok az miktardaki bakır (<50 µgr/24sa) ise böbreklerden atılır (19).

Vücuttaki toplam bakır miktarı diyet değişiklikleri ile ve bakırın gastrointestinal sistemden (GİS) emiliminin engellenmesi ile değiştirilebilir (16).

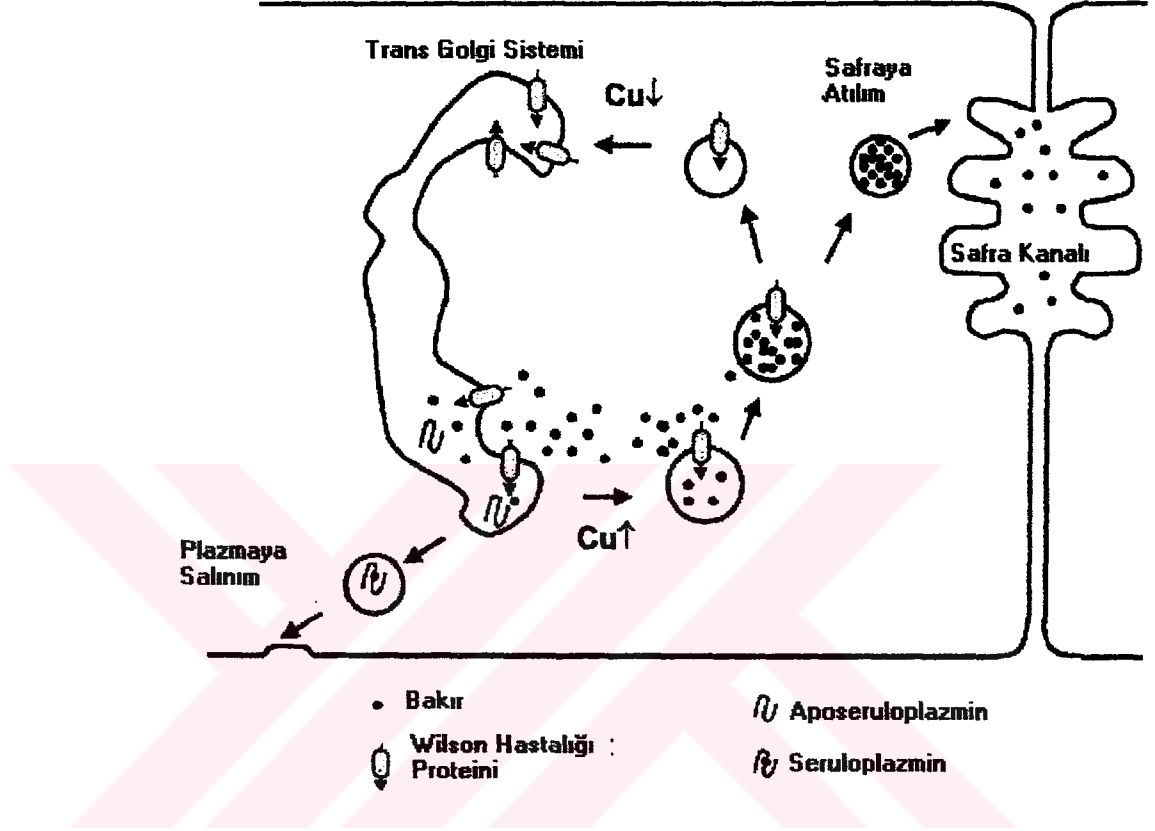
GİS den emilen bakır histidin ve albümine bağlı olarak taşınır. Radyoaktif işaretlenmiş bakırla yapılan çalışmalar sonucunda verilen bakırın hızla alındığını ve verilen dozun %10 unun 24 saat içinde seruloplazmine bağlı olarak plazmada bulunduğu belirlenmiştir. Seruloplazmine bu derecede bağlanması molekülün miktarı ile ilgili olup bu proteinin fonksiyonel rolü hakkında fikir vermemektedir. Bakır plazmada histidine ve diğer aminoasitlere bağlı olarak bulunur. Bakırın çevre dokulara taşınmasında bu moleküllerin önemli olduğu düşünülmektedir. KC in vücut bakır dağılımı üzerine etkisi olduğu bilinmekle birlikte bunun nasıl gerçekleştiği tam olarak anlaşılamamıştır (16).

GİS ve KC hücrelerince bakırın nasıl alındığına dair mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olsa da Saccharomyces cerevisiae de yapılan araştırmalar sonucunda bakır taşınmasında rol alan CTR1, CTR2 ve CTR3 adında 3 gen saptanmıştır. CTR1 ve CTR3 yüksek afiniteli bakır emilimi için gereklidir. Daha sonra insanda, CTR1 e benzeyen bir proteini kodlayan hCTR1 ve düşük afiniteli bakır alımında rol oynayan hCTR2 genleri bulundu. Bu proteini kodlayan mRNA transkriptleri değişik insan dokularında gösterilmekle birlikte fonksiyonları tam olarak belirlenememiştir (21,22).

KC bakır homeostasisinde ki en önemli organdır. Bakır dengesi bakırın safra yollarına atılması ile olmaktadır. Safrada atılan bakır miktarı hepatik bakır rezervi ile direkt olarak ilişkilidir.

Hepatositler bakırın hem alıcısı hem de depo bölgesidir. Sitoplazmada ki bakır oranı algılanarak intraselüler düzeyi düzenlenir. Burada WH geni tarafından üretilen bakır taşıyıcı ATPazlar (ATP7B) devreye girer. Bu proteinin transgolgi kompleksinde bulunduğu bilinmektedir. Hepatositlerde bakır düzeyi yükseldiğinde bu proteinler transgolgi kompleksinden ayrılıp kanaliküler membran etrafındaki

sitoplazmik mikroveziküler alanlar yayılırlar. Yakın dönemde az miktarda da olsa kanalikül membranında da yerleştiği gösterilmiştir (23,24). Şekil 1.2.



Şekil 1.2. Karaciğerde Normal Bakır Metabolizması

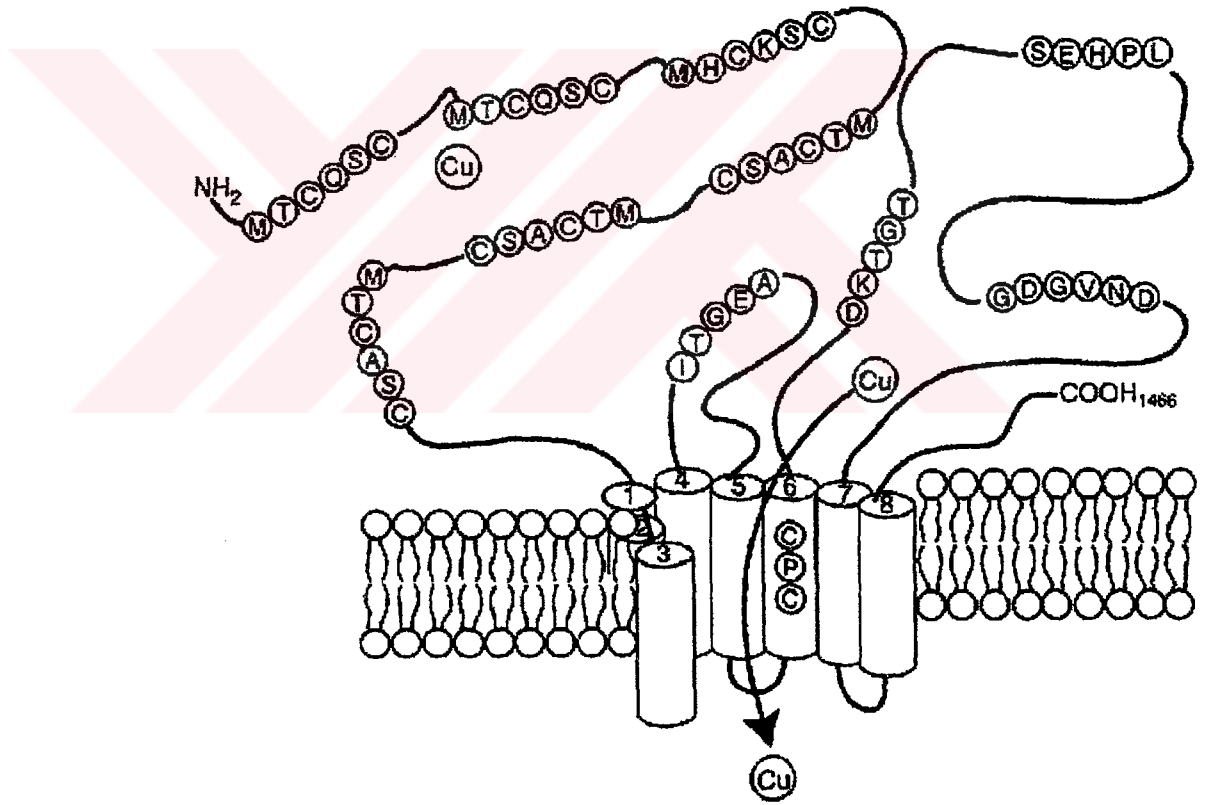
Bu veziküler alanda yeterli bakır birikimi olduktan sonra ATPaz protein tekrar transgolgi kompleksine dönerken veziküller safra kanalikülüne boşalır. Bu mükemmel mekanizma ile intraselüler bakır düzeyi hızla düzenlenir. Hepatositlerden bu son aşamada bakırın atılımı ile ilgili bilgilerimiz yetersizdir (23,24).

Seruloplazmin plazmada bulunan bakırın %95 inden fazlasını bağlayan bir glikoproteindir. Apoprotein olarak sentezlenir ancak hepatosit içinde salınmadan önce golgi kompleksinde 6 bakır atomu alır. Bakır düzeyinin bu proteinin sentezi üzerine etkisi yoktur ancak bakırın apoproteinle birleşmemesi sonucunda salgılanan apoprotein plazmada hızla yıkılır. Wilson ATPaz ı hepatositlerin salgılama yollarına bakırın taşınmasında rol oynamaktadır. Bu salgılama bölgelerine bakır gelmemesi holoseruloplazmin sentezini etkiler. Bu yüzden hastaların kanlarında seruloplazmin düzeyleri çok düşük olarak bulunur (25).

1.1.6. Wilson Hastalığı ATPazı (ATP7B):

Yaklaşık 7.5 kilobaz büyüklüğündeki WH geni 1465 aminoasidlik bir protein olan P tip ATPaz kodlar (16,26). (Şekil 3) Bu molekül üzerinde;

- Altı adet bakır bağlayan bölge
- ATP domain i,
- Transmembran katyon kanalı,
- Fosforilasyon bölgesi ve
- ATP hidrolizi sonucu ortaya çıkan enerji ile katyon taşıyan bölge.



Şekil 1.3: WH ATPaz Proteinini (ATP7B) Moleküler Yapısı

WH P-ATPazı diğer katyon ATPazları ile ortak bir takım bölgeler içerir. Bunlar ATP bağlayan bölge ve iyon transportunda gerekli olan *aspartylfosforyl* aracısında kullanılan aspartat bölgesidir. İyon taşınması sadece ATP hidrolizi ile olur(16).

Proteinin ileri analizi sonucunda sekiz tane transmembran bölgesi olduğu ve amino ile karboksi ucunun membranın aynı tarafında yerleştiği bulunmuştur. Yukarıda belirtilen ortak noktalara ek olarak altıncı transmembran bölgesinde CPC dizisi adında, bütün ağır metal membran taşıyıcılarında bulunan bir bölge mevcuttur. Bu bölgedeki aminoasitler özellikle bakır taşınması için gereklidir ve sistein oranının yüksek olması sistein in metal bağlama fonksiyonları ile ilişkilidir (16).

Bütün bu benzerliklerin yanında WH ATPazında bakır taşıma işlemini sağlayan iki önemli özellik mevcuttur; amino ucunda bakırın bağlandığı 6 homolog bölge vardır (MXCXXC). Bu bölgeler ayrıca bakır chaperone' u atox1 ile protein-protein bağlantısını sağlar, bu yüzden proteinin fonksiyonları için çok önemlidir. Bunlara ek olarak protein üzerinde SEHPL dizisi bulunur. Burası ATP bağlayan bölgeye çok yakındır. Bu bölgede bulunan histidine en çok mutasyona uğrayan bölgedir (H1069Q). Bu dizinin asıl görevi proteinin üç boyutlu katlanması ve proteinin hücre içi hareketliliğinin kontrolüdür (27).

ATP7B proteinin bakır bağlayan bölgeleri sitozolik ligandlardan bakırı alır ve atılım bölgesine kadar taşırlar. Bu bölgeler aynı zamanda bakır algılayıcıları olarak ta çalışırlar. Hepatoblastoma kaynaklı HepG2 hücre dizilerinde ATP7B proteinin 165kda protein olarak transgolgi bölgesinde yerleştiği görülmüştür. Hücrelerin yüksek düzeyde bakıra maruz kalmaları sonucunda bu protein safra kanalikülleri etrafında yoğunlaşır ama bu geri dönüşümlü bir olaydır. Bu bakır aracılı yer değiştirme proteinin fizyolojik fonksiyonlarını göstermesi açısından anlamlıdır (28).

Proteinin transmembran kanalına yakın bölgedeki bakır bağlayan motifler bakırın kanal içindeki bölümlere oradan da içeriye taşınmasında rol oynamaktadır. Diğer amino ucu motifleri ise sitozolik bakır düzeyine cevap olarak proteinin yer değiştirmesini sağlamaktadır. ATP7B proteinin sentez sonrasında işleme sırasında açığa çıkan 140kda ATP7B ürünü mitokondride de gösterildi ve proteinin enerji üretimi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

1.1.7. İntrasitoplazmik Bakır Taşıyıcılar:

S. cerevisiae de yapılan çalışmalar sonucunda bakırın intrasitoplazmik bölgelere taşınmasını sağlayan bir takım proteinler bulundu ve bunlara bakır *Chaperone* ları adı verildi. Atx1 adı verilen bu küçük molekül insandaki Wilson ATPaz ına benzeyen CCC2 adındaki proteine bakır taşınmasından sorumludur. Bu molekülün benzeri insanlarda da bulundu ve buna atox1 (daha önceden HAH1 adıyla bilinen) adı verildi. Atox1 üzerinde MXCXXC motifi bulunmaktadır ki bu motif daha öncede belirtildiği gibi bakır taşıyıcı ATPaz üzerinde de bulunmaktadır. Atx1 üzerinde yapılan çalışmalar bu birbirine benzeşen bölgeler arasında bakırın hızla yer değiştirdiğini göstermiştir (29-32).

ATP7B proteini hepatositler yanında çok sayıda dokuda gösterilmiştir. Bunlar: böbrek, placenta, beyin, kalp, akciğerler, kas ve pankreasır. WH hayvan modellerinde ATP7B proteini ve mRNA sı hipokampus, olfaktor bulbus, serebellum, serebral korteks ve beyin sapı nöronal hücrelerinde bulunmuştur. Buralarda yüksek düzeyde bakır bulunması neden fonksiyonları bozuk olan protein sonucunda serebral ve bazal ganglion sorunları çıktığını göstermektedir. Nöropsikiyatrik bozuklukların KC transplantasyonu sonucunda gerilemesi birincil genetik bozukluğun nöronlardan çok KC de olduğunu düşündürmektedir (16,26).

1.2.1. Patogenez:

WH geni 7.5 kilobazlık bir mRNA kodlar, bu mRNA nın işlenmesi sonucunda 165kDA boyutunda tek bir protein elde edilir. Bu protein trans-Golgi kompleksinde yerleşir. Üretilen ATPaz ın fonksiyonlarında mutasyonlar sonucunda bir takım değişiklikler oluşur, holoseruloplazmin sentezi ve safra yoluna atılım engellenir.

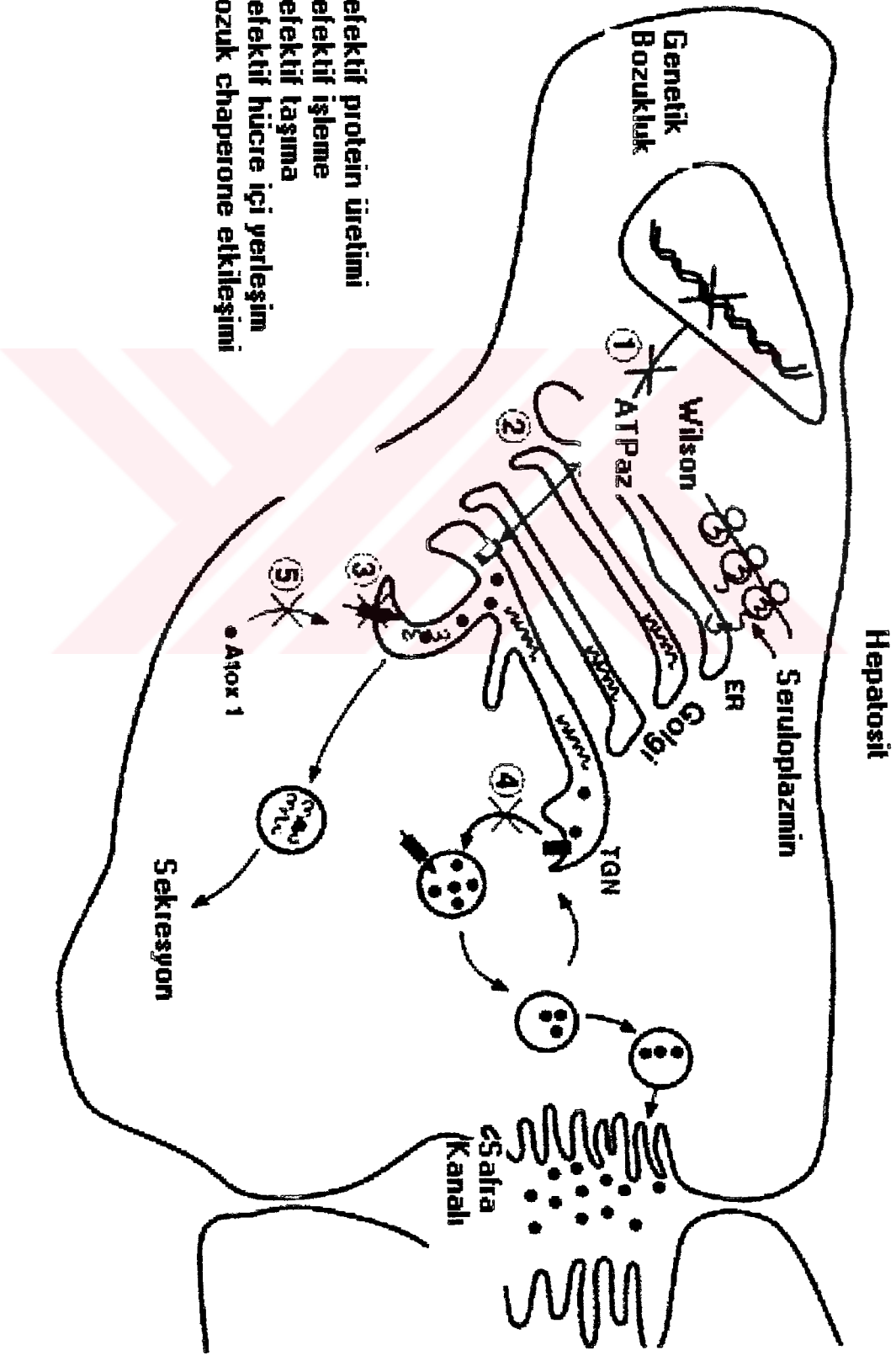
Daha öncede belirtildiği gibi ATP7B nin hepatosit içinde bulunduğu bölge hücre içi bakır konsantrasyonu ile ilişkilidir. Hücre içinde proteinin yer değiştirmesi ve yenilenmesi çok hızlı gelişen bir olaydır. Protein yapısında meydana gelen değişiklikler hücre içi bakır yükselmesine olan cevap ve proteinin yerleşimini etkiler. Örneğin H1069Q mutasyonunda proteinin üç boyutlu katlanmasında sorun ortaya çıkar, sonuç olarak protein endoplazmik retikulum üzerinde yerleşir ve hızla yıkılır.

Ayrıca aynı mutasyon üzerinde yapılan çalışmalar sonucu belirli bölgelerdeki histidin aminoasitlerinin proteinin hücre içindeki hareketini etkilediğini göstermiştir.

Hastalık patogeneğinde atox1 önemli bir yer tutmaktadır. Atox1 ile ATP7B proteinin etkileşimi bakır aracılıdır ve bu etkileşimde bozulmalar bakır hemostazını bozabilir. Bunu test etmek için yapılan bir çalışmada ATP7B proteini üzerinde bakır bağlayan bölgelerde mutasyonu olan moleküller kullanılmış ve atox1 in buralara bağlanmasında belirgin azalma olduğu görülmüştür. WH da asıl patogenetik mekanizma atox1 den ATP7B proteinine bakırın aktarılamamasıdır (32,34,35).

Bu bilgiler ışığında WH da şu mekanizmaların önemli olabilir (Şekil 1.4.).

1. Defektif protein üretimi
2. Defektif işleme
3. Defektif taşıma
4. Defektif hücre içi yerleşim
5. Bozuk chaperone etkileşimi



1. Defektif protein üretimi
2. Defektif işleme
3. Defektif taşıma
4. Defektif hücre içi yerleşim
5. Bozuk chaperone etkileşimi

Şekil 1.4.: WH da Patogenetik Mekanizmalar

Aklıda tutulması gerekli bir diğer nokta ise WH nı açıklayabilecek herhangi bir patogenez modelinin etkilenen bireylerdeki klinik çeşitliliği açıklamasıdır

Aynı mutasyonu taşıyan kişilerde bile hastalığın başlama yaşı, klinik özellikler, biyokimyasal özellikler ve hastalığın aktivitesi arasında belirgin farklılıklar gözlenmektedir. Hatta aynı aileden olan hastalarda bile seyir farklı olabilmektedir, sonuç olarak hastalığın seyrini değiştirebilecek ek genetik veya çevresel faktörlerin birlikteliği araştırılmalıdır. Hepatosit içi metallothionein, diğer bakır şelatörleri ve bakır yüklü veziküllerin oluşumunu taşınmasını etkileyen diğer faktörler olabilir.

Bakır toksisitesi bu hastalığın patogenezindeki birincil faktördür. Etkilenen organlarda yüksek düzeyde bakır bulunur ve bakırın uzaklaştırılması ile organ fonksiyonlarında belirgin düzelme görülür. Daha önceden düşünüldüğü gibi bakır taşıyıcı seruloplazmin düzeyinin düşüklüğü hastalık patogenezinde yer almaz, tam tersine hastalığın sonucunda ortaya çıkar. Fazla miktarlardaki bakır, serbest radikallerin oluşumuna yol açar. Serbest radikal oluşumu sonrasında lipid peroksidasyonu, antioksidanların azalması ve bakır tutucu thioneinlerin polimerizasyonu meydana gelir. Hücre içindeki antioksidanlarda glutatyon ve vitamin e düzeylerinin düştüğü bilinmektedir. DNA, mitokondri ve değişik hücre içi enzimlerin oksidatif hasara uğraması ile mitokondrial solunum bozulur (36).

Oksidatif strese bağlı olarak gelişen hepatosit nekrozu ve buna karşı verilen inflamatuvar cevabın yeri konusunda herhangi bir çalışma olmadığı görülmektedir. Bilindiği gibi inflamatuvar yanıt genetik kontrol altında olup hastalığın seyri ve prognozunu değiştirmede önemli rol oynamaktadır.

1.2.2 Tümör Nekrosis Faktör α (TNF- α):

(TNF- α) aktive makrofajlar ve daha az oranda diğer çekirdekli hücreler tarafından salınan bir sitokindir. Değişik hücre tipleri üzerine etkilidir ve çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik olayda rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca apoptozis' in en önemli mediatörlerindendir. TNF- α nın hücre çoğalması, inflamasyon ve apoptozis üzerine olan *pleotropic* etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (37).

Apoptozis toksik hepatitlerde etkili ilk olaydır ve doku inflamasyonu ile fibrosis oluşumundaki rolü aydınlatılmıştır. Deneysel karaciğer hasarı modellerinde hepatik apoptozis ile karaciğer hasarını gösteren transaminazlarda yükselme olmaktadır. Eğer meydana gelen apoptotik süreç doku iyileşmesinden daha büyükse organ yapısında bozulma ve yetmezlik görülebilmektedir. WH da morfolojik olarak apoptozisin arttığı gösterilmiştir (38).

TNF- α nın içinde olduğu ligand ailesi TNF reseptör süper ailesi adında ki reseptör proteinleri uyarır. Bu grupta: TNF- α , *lymphotoxin- α* , TNF-B, Fas ligand, OX40L, CD40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL ve *lymphotoxin B* bulunmaktadır. TNF reseptör ailesi içinde şu ana kadar 12 değişik transmembran proteini bulunmuştur. Bu proteinlerin uyarımı ile hücre içinde bir takım yollar aktive olur. TNF reseptörlerinden TNF-R1 ve 2 hücre içinde apoptozisi indükleyen caspase aktivasyonuna yol açtıkları için önemlidir. Bu reseptörlerin ilginç bir özelliği ise hücre dışı parçasının proteolitik olarak ayrılmasından sonra serumda solubl reseptör olarak bulunurlar. Bu solubl reseptörler TNF- α ile bağlanıp yarı ömrünü ve biyolojik aktivitesini artırabileceği gibi bazen hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasını engelleyerek antagonist etkide bulunabilirler (37).

TNF- α rejenere olan karaciğerde hücre çoğalmasında önemli rol oynar. Bu aşamada meydana gelecek bir engelleme yenilenme sürecini etkiler. Karaciğerde TNF- α kaynağı safra yolu epitel hücreleri, venöz endotel hücreleri ve makrofajlardır. Çeşitli hayvan deneylerinde TNF- α nın akut karaciğer hasarında önemli olduğu görülmüştür. Verilen TNF- α antikoru bazı durumlarda karaciğer hücre hasarını engellemektedir.

TNF- α antikanser ajan olarak kullanıldığı dönemlerde karaciğer fonksiyonlarında belirgin bozulma olduğu görülmüştür. Hepatositler üzerine direkt toksik etkisi olduğu anlaşıldığı için bu tedaviler bırakılmıştır. Kronik hepatit B ve C enfeksiyonu sırasında TNF- α düzeyleri artmaktadır. Kronik B hepatitinde serokonversiyon öncesi düzeylerde aşırı bir yükselme görülmektedir. Bu hastalarda serum TNF-R1 ve R2 düzeyleri de çok yüksek bulunmaktadır. TNF-R1 düzeyleri ile karaciğerdeki inflamasyonun derecesi arasında belirgin bir ilişki vardır.

Kronik C hepatitli hastalarda interferon tedavisi sonrası virüs temizlendiğinde TNF düzeyleri de normale gerilemektedir. Ayrıca tedavi öncesinde TNF düzeyi yüksek olan hastaların tedaviye yanıtlarının daha düşük olduğu bulunmuştur (37,38).

Alkolik hepatitte de durum farklı değildir. TNF düzeyleri ile sağkalım arasında ters yönde bir ilişki olduğu görülmüştür. Bu hastaların monositlerinin lipopolisakkaritlere karşı verdiği TNF cevabı normal bireylere göre abartılıdır. Ayrıca bazı çalışmalarda TNF- α promoter bölgelerinde aşırı cevap vermeye yol açtığı düşünülen mutasyonlar bulunmuştur (38).

1.2.3. Patoloji:

Karaciğerde periportal fibrosis ten makronoduler siroza kadar değişen derecede fibrosis olduğu görülür. KC hücrelerinde balonlaşma, çoklu nukleus, glikojen kümeleri ve çekirdekte glikojen vakuolizasyonu görülür. Yağlı değişim çok sık görülür. Kuppfer hücreleri büyüktür. Bazı hastalarda alkolik hepatite benzer şekilde Mallory cisimcikleri olduğu görülür. Hepatik histoloji tanısal değildir ve kronik hepatitlerde görülebilen değişiklikler izlenir (39-42).

KC de metal dağılımı eşit olmadığı ve rejenerasyon nodüllerinde bulunmadığı için *rubeanic* asid veya *rhodamine* ile bakır boyaları yapılması tanı için yeterli değildir. Bakır çoğunlukla periportal dağılım gösterir. Beraberinde genelde atipik *lipofuscin* depolanması görülür (40).

Elektron mikroskopik incelemelerde asemptomatik kişilerde bile otofagositik vakuoller ve şişmiş, anormal mitokondriler olduğu izlenir. Yağlı değişim mitokondri değişiklikleri ile ilişkili olabilir(38-42).

1.2.4. Diğer Organlar:

Böbreklerde; *proksimal convoluted tubullerde* bakır birikimi ile birlikte yağlı ve hidropik değişiklik görülür.

Beyin, kaudat nukleus ve putamen de yüksek düzeyde bakır birikimine bağlı olarak nöropsikiyatrik bulgular ortaya çıkar. *Descement membranda* birikimi ise hastalık için tipik olan KFH'nın oluşumuna yol açar (42,43).

1.3.1. Klinik:

WH klinik belirtileri çok değişiktir. Hepatik hasar ile nörolojik bulgular arasında belirgin bir ilişki yoktur. Wilson'un orijinal makalesinde tanımladığı bütün hastalarda nörolojik hastalık ve siroz birlikteliğinden söz etse de bu, gerçeği yansıtmamaktadır. Hastalık değişik yaşlarda değişik organları daha fazla etkiliyor gibi görünmektedir. Ancak, hastaların %80'inden fazlası ilk on yıl içinde tanı alırken bu vakaların sadece %40-70'inde karaciğer tutulumu tanı anında gösterilebilir. Buna karşın takip süresinde nöropsikiyatrik ve hepatik hastalık bulguları ortaya çıkar (44,45).

Çocuklarda karaciğer etkilenen en önemli organdır. Karaciğer tutulumundan itibaren yaklaşık on yıl içinde de nörolojik tutulum görülür. 20 yaşından sonra tanı alanlarda nörolojik semptomlar ön planda olabilir. Hastalar incelendiğinde belirtilerin ortaya çıkışı veya tanı genelde 5 ila 30 yaşları arasındadır. Klinik semptomlar 5 yaş altında nadiren görülür. Bir kısım hastanın 40 – 50 yaşlarında tanı aldığı görülmektedir (44).

Wilson hastaları asemptomatik olabilir. Wilson hastalarının incelendiği büyük bir seride klinik belirtilerin sıklığı şu şekildedir: hepatik %42, nörolojik %34, psikiyatrik %10 ve hematolojik %12'dir. Daha az oranlarda olmak üzere renal, iskelet sistemi, kardiyak, oftalmolojik, endokrinolojik ve dermatolojik yakınmalarla gelen hastalara rastlanmaktadır (44).

1.3.2. Hepatik form:

Hepatik bulgular nörolojik bulgulardan daha erken ortaya çıkmaktadır (ortalama 8-12 yaşları arasında). Üç farklı şekilde görülebilmektedir: Akut karaciğer yetmezliği, kronik hepatit ve siroz (10,44).

A) Akut Karaciğer Yetmezliği:

Hastalar çoğunlukla genç ve kadındır. Klinik tablo viral aracılı masif hepatik nekroz gibidir. Altta yatan asemptomatik bir karaciğer hastalığı vardır ama her zaman siroz olması gerekli değildir. Daha önceden tanı almış olan Wilson hastalarında şelasyon tedavisine ara verildiğinde görülebilir. Herhangi bir neden olmadan da hastalar akut fulminant yetersizlikle karşımıza gelebilirler. Hastaların

çoğu kadın olduğu için hormonal faktörlerin tetikleyici rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Splenomegali ve coombs negatif hemolitik anemi bulunması ile akut karaciğer yetmezliğinin diğer nedenlerinden ayırt edilebilir. Hemolitik aneminin nedeni ise nekrotik hepatositlerden aniden dışarıya salınan çok fazla miktardaki bakırdır (10,44).

İlerleyici sarılık, asit, hepatik ve renal yetmezlik mevcuttur. Karaciğer nekrozu muhtemelen yıllardır biriken bakıra bağlıdır. KFH olmayabilir. Serum ve idrar bakırı yüksek, seruloplazmin düzeyleri çok düşüktür. Akut faz reaktanı olarak normal veya yüksek düzeylerde bulunabilir. Serum transaminazları ve alkalen fosfataz düzeyleri akut KC yetmezliğinde beklenene göre düşüktür. Belirgin bilirubin yüksekliği izlenir. Alkalen fosfataz / bilirubin oranının düşük olması fulminant WH için tanısal olmasa da yol göstericidir. KC transplantasyonu yapılmazsa ölüm kaçınılmazdır (10).

B) Kronik hepatit:

35 yaş altındaki kronik hepatitli vakaların yaklaşık %5 inin WH ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Wilson hastalarının % 5-30 unda kronik hepatit gözlenmektedir. Hastalık genelde 10-30 yaşlar arasında görülür. Yüksek transaminaz düzeyleri, sarılık ve hipergamaglobulinemi tabloya hakimdir. Tablo diğer kronik hepatit vakalarına benzemektedir ve tanı oldukça zordur. KFH %50 vakada görülmez. Nörolojik bulgular kronik hepatit tanısından 2-5 yıl sonra ortaya çıkar. Şelasyon tedavisi ile prognozu iyidir (10,44).

C) Siroz:

Hastalığın sinsi seyrine bağlı olarak hastalarda siroz gelişimi görülür. Hastalarda sirozun son dönem belirtileri splenomegali, asit, portal hipertansiyon ve spider nevi dir(10,44,45).

D) Hepatoselüler Karsinom:

WH da HCC gelişiminin çok nadir olduğu ve bakırın koruyucu rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer nedenlere bağlı gelişen sirozlarda HCC gelişimi Wilson hastaları ve normal popülasyondan yüksektir. Buna karşın WH hayvan modeli olan Long-Evans Cinnamon (LEC) farelerinde yapılan çalışmalarda yaşlanmış farelerde

HCC gelişimi görülür. Hayvan modellerinde hepatoselüler hasarın başlangıcı ve neoplastik dönüşüm penisilamin tedavisi ile geriye döndürülmüştür. Bu bulgulara dayanarak şelasyon tedavisinin HCC gelişimini insanda engellediği düşünülebilir. Ancak bu komplikasyonun penisilamin öncesi dönemde de çok nadir olduğu bilinmekteydi. Tedavi almamış ve sirozu bulunan yaşlı hastalarda HCC gelişimi gösterilmemesi ise şelasyon teorisinin aksine bir bulgudur.

1.3.3. Nörolojik form:

İkinci veya üçüncü dekad da ortaya çıkar. Puberte öncesi belirtilerin ortaya çıkması nadirdir. 20 yaşından sonra tanı alan hastaların %75 inde nöropsikiyatrik bulgular gelişir. İlk tanı sırasında hastaların %25 inde nörolojik ve hepatik bulgular birlikte dir. Nörolojik bulguları olan hastaların % 20 sinde karaciğerde çok hafif değişiklikler veya yağlanma izlenebilir. KFH çoğunlukla bulunur.

Dört ana nörolojik sendrom tanımlanmıştır: parkinsonian, psödosklerotik, distonik ve koreik tip. Nörolojik WH nin en erken bulgusu konuşmada zorluk, ağızdan salya akması ve ellerde beceriksizliktir. Kişilik değişikliği bu bulgulara eşlik edebilir. Hemen her zaman ilk semptom olarak yürüme ve duruş bozukluğu görülmez. Hastalarda gözlenen nöropsikiyatrik bulguların hepatik ensefalopatiden ayırt edilmesi gereklidir. Kronik hepatik ensefalopati hastalarında gözlenen bazal ganglionlarda ki mangan birikiminin bakıra karşı duyarlılığı arttırdığı öne sürülmüştür.

Şiddetli nörolojik bozukluk olduğu durumlarda bile hastaların bilişsel fonksiyonlarında bozulma olmaz. Nörolojik semptomlar şelasyon tedavisi ile geriler. Tam düzelme olmaması doku hasarının kalıcı olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

WH da merkez sinir sistemini incelemek için MRG kullanılabilir. MRG bulgularına göre üç gruba ayrılabilir.

1. MR da üçüncü ventrikülde dilatasyon saptanan hastalarda bradikinesi, rijidite ve bilişsel bozukluklar görülür.
2. MR da fokal talamik lezyonlar varsa; ataksi ve tremor

3. MR da putamen ve globus pallidusta fokal lezyonlar varsa; dikinesi, disartri ve kişilik değişikliği görülür.

Duyusal veya motor fonksiyonlarda kayıp olmaz. Şiddetli distonik bulguları olan hastaların prognozları daha kötüdür. EEG genelde nonspesifik değişiklikler gösterir (10,44).

1.3.4. Psikiyatrik form:

Wilson hastalarının 1/3 ünde psikiyatrik semptomlar bulunabilir. Hastalar WH tanısı almadan önce ilerleyici psikiyatrik hastalık ön tanısı ile hastanelere yatırılabilirler. Psikiyatrik semptomlar nörolojik bozukluk saptanan hastaların neredeyse tamamında görülür. Başlangıçta sadece hafif kişilik değişiklikleri görülür. İleri dönemlerde depresyon ve antisosyal davranışlar görülür. Psikiyatrik semptomlar şelasyon tedavisi ile kaybolur (16).

1.3.5. Oftalmolojik bulgular:

KFH nörolojik bulguları olan hastalarda %90-100 ünde, hepatik hastalığı olanların % 40 ında görülür. Şelasyon tedavisi ile 5 yıl içinde %80 hastada kaybolur.

Katarakt: nadiren bulunur. Görmeyi genelde engellemez ve tedavi ile hızla kaybolur.

1.3.6. Böbrek bulguları:

Proksimal renal tubuler asidoz ve fanconi sendromu (aminoasidüri, glikozüri, ürikozüri ve hiperfosfatüri) görülebilir. Distal renal tubuler asidoz ve buna bağlı böbrek taşı gelişimi olabilir.

1.3.7. Diğer değişiklikler:

Tırnak lunula bölgesinde bakır birikimine bağlı mavi renk değişikimi olabilir. Kas iskelet sisteminde demineralizasyon ve erken osteoartrit gelişimi saptanabilir. Hemolize bağlı safra taşı oluşumu, hipoparatiroidizm ve kalpte disritmilere yol açabilir.

1.4. Tanı:

1.4.1. Seruloplazmin düzeyleri:

Seruloplazmin ve serum bakır düzeyleri genelde düşüktür. Tüm wilson hastalarının %90ında ve hepatik belirtileri olanların %65-85 inde normalin altında bulunur. Wilson hastalarının %15 inden fazlasında seruloplazmin düzeyleri normal sınırlar içindedir. Bazı hastalarda seruloplazmin akut faz reaktanı olarak yükselebilir. Gebelikte veya dışarıdan östrojen hormonu verilmesi de düzeylerini yükseltir. Seruloplazminin düşük seviyelerde bulunması WH için patognomonik değildir. Aşağıdaki nedenlere bağlı olabilir:

- kronik KC hastalığının sonucunda sentez yapılamaması,
- nefrotik sendrom, protein kaybettiren enteropati ve malabsorbsiyon
- WH geni taşıyan heterozigot taşıyıcıların %10-20 sinde
- Çocuklarda 2 yaşına kadar düşük bulunabilir
- Herediter aseruloplazminemi

1.4.2. İdrar bakır atılımı:

Normal idrar bakır atılımı 40µg/24sa altındadır. WH da günlük 100µg/24sa den fazladır. WH yanında primer bilier siroz, kronik hepatit ve proteinüri olan olgularda idrar bakır atılımı artar.

WH da neden kan bakır düzeyleri çok düşük buna karşın idrar bakır atılımı çok yüksektir? KC ve dokuda ki bakır depoları dolduğu için kanda albumine bağlanmayan bakır miktarında artma olur ki bu miktar hala çok düşük olarak ölçülse de böbreklerden rahatlıkla filtre olarak atılır. Bazı zamanlarda hepatositlerde biriken fazla miktardaki bakır nedeni ile aniden hücre ölümü gerçekleşir ve dolaşıma fazla miktarda bakır salınır. Bu dönemlerde idrar bakır artar.

1.4.3. Karaciğer biyopsisi:

Daha önce de belirtildiği gibi biyopsi bulguları nonspesifiktir. Ancak kuru KC dokusunda bakır düzeyinin bakılması gereklidir. Wilson hastalarında bakır

konsantrasyonu $>250\mu\text{g}/\text{gr}$ kuru KC dokusu dur (normal:15-55 $\mu\text{g}/\text{g}$). Bakır düzeylerinin normal olması tanıdan uzaklaştırır. Bazı KC hastalıklarında bakır konsantrasyonu artabilir:

- Kolestatik hastalıklar: Primer Bilier Siroz, Primer Sklerozan Kolanjit, Çocukluğun İntrahepatik Kolestazi ve Bilier Atrezi
- *Indian Childhood* Sirozu
- İdiopatik bakır toksisitesi

Kc biyopsisi yapılamayan olgularda radyoaktif bakırın seruloplazmine birleşmesinin test edilmesi tanıda faydalı olabilir.

1.4.4. Genetik tanı:

Belirli DNA belirleyicileri kullanılarak WH tanısı kesinleştirilebilmektedir. Ancak bu tekniğinde bir takım kısıtlamaları mevcuttur. Şu anda bu teknik çok pahalı ve zaman almaktadır. WH geninde 200 den fazla mutasyonun gösterilmiş olması nedeni ile tarama testi olarak kullanılması zordur. WH tanısı almış olan hastaların ailelerinde tarama yapmak isteniyorsa sadece hastanın taşıdığı mutasyonun araştırılması yararlı olabilir. Biyokimyasal parametrelerin kesin tanıyı desteklemediği genç hastalarda tarama testi olarak kullanılabilir.

Bir toplulukta sık görülen bir mutasyon biliniyorsa (örn: His1069Gln gibi) sadece bu mutasyonun taranması tanı ve asemptomatik vakaların ortaya çıkartılmasında faydalı olabilir (48,49).

1.5. Tedavi:

Tedavinin ilk basamağı diyet ayarlamasıdır. Diyette alınan bakır miktarının azaltılması gerekmektedir. Bu yüzden bakır içeriği yüksek olduğu bilinen yiyeceklerden kaçınmak gereklidir. Bunlar: karaciğer, çikolata, fındıklar, mantar ve deniz ürünlerinden midyedir. Hastanın bulunduğu bölgedeki suyun bakır içeriği test edilmeli, eğer >0.2 ppm ise deiodinize veya distile su içmesi önerilmelidir. Mümkünse kuyu suları ve kaynağı bilinmeyen sular içilmemelidir (50, 51).

1.5.1. İlaç tedavisi:

Semptomatik nörolojik veya hepatik hastalığı olan hastalara şelasyon tedavisinin bir an önce başlanması gereklidir. Şelasyon tedavisine başlangıç ve idame tedavisinin şekli konusunda değişik görüşler mevcuttur. Başlangıç tedavisinde amaç hastalığın kontrol altına alınması ve klinik düzelmeyi sağlamaktır (10,51).



1.5.2. BAL (British Anti Lewisite)

Bu hastalıkta başarıyla denenen ilk şelatör ilaçtır. Ağrılı intramuskuler enjeksiyonlar nedeni ile terk edilmiştir. Eğer hastalar penisilamin tedavisi altında iken nörolojik semptomlarda kötüleşme görülürse penisilamin tedavisine ek olarak kullanılabilir (50).

1.5.3. D-Penisilamin:

ilk olarak Walshe tarafından kullanılmıştır ve o tarihten itibaren tedavinin en önemli basmağını oluşturmaktadır. WH da ki ilk sıra ilaçtır.

İlacın etki mekanizması: bakırın şelasyonu detoksifikasyonu ve muhtemelen selüler metallothionein yapımının indüksiyonu ile zararsız bakır metallothionein komplekslerinin oluşumunu sağlamaktır. İdrar bakır atılımını artırmaktadır. Başlangıç dozu 1.5 gr kadardır. Yemek öncelerinde 3 ila dört bölünmüş dozda alınmalıdır. Emilimi açken daha iyi olmaktadır. Antipridoksin etkisinden dolayı günlük, düşük dozlarda pridoksinin ilaç tedavisi ile birlikte verilmesi gereklidir. Hastaların %20 si tedavinin ilk ayında yan etkiler gösterir. En sık görülen; hipersensitivite reaksiyonları, deride kızarıklık ve kaşıntı, nadiren lenfadenopatidir. İlacın kesilerek düşük dozlarda tekrar başlanması ile şikayetlerde gerileme görülür. Nadiren kemik iliği baskılanması ve proteinüri görülür ki bu durumlarda ilacın kesilmesi gereklidir (50-52).

Hastalık semptomlarında düzelme oldukça yavaştır, 6 ayı bulabilir. Eğer düzelme olmazsa doz 2 gr güne çıkarılabilir. Tedavi altında KFH kaybolur, konuşmada düzelme görülür, tremor ve rijiditede azalma dikkati çeker. Karaciğer fonksiyon testlerinde düzelme görülür. Karaciğer biyopsisi gerekli olmasa da biyopsi yapıldığında inflamasyon aktivitesinde azalma ve inaktif siroz bulguları görülür. Semptomlarda gerileme olmaması geri dönüşümsüz doku hasarının tedavi öncesinde de var olduğunu veya tedaviye uyumsuzluğu düşündürür. Tedavide başarı serum serbest bakır düzeylerinin 10 µg altına düşmesi ve idrar bakır miktarının 500µg altına düşmesi ile anlaşılabilir (50-52).

İlk tedavide başarı sağlandıktan sonra penisilamin dozu 750 mg düşülebilir. Hastaların takiplerinde serum ve idrar bakır düzeylerinin belirlenmesi gereklidir. Bu

sayede tedaviye uyum değerlendirilebilir. Bilindiği gibi şelasyon tedavisine uyumsuz olan hastalarda akut fulminant seyir görülebilmektedir (3,16,44,50-52).

1.5.4. Trientine:

İlk olarak 1969 yılında penisilamine alternatif şelasyon ajanı olarak sunuldu. Bakır şelasyonu ve detoksifikasyonu ile etki etmektedir. Bakır bağlayıcı ve cupriüretik etkisi zayıftır. Buna rağmen klinik olarak etkinliği kanıtlanmıştır. İlk seçenek ilaç olarak kullanılabilir. Penisilamine bağlı yan etkileri olan hastalarda kullanılabilir. Yan etkileri arasında deride kızarıklık ve sideroblastik anemi görülebilir. Otoimmün hastalıklarla birlikte kemik iliği supresyonu, proteinüri görülebilir (50).

1.5.5. Elemental çinko:

Çinko intestinal ve hepatik metallothionein üretimini indüklemektedir. İntestinal hücrelerde bakır – metallothionein kompleksleri oluşturarak bakır emiliminin azalmasına neden olur. Bilindiği gibi karaciğerde metallothionein sentezinin artması bakır hasarından koruyucu rol oynar. Günde üç kez yemek aralarında verilmelidir. Tedavi edici etkilerinin ortaya çıkışı biraz gecikebileceği için ilk seçenek tedavide tek başına verilmemelidir. Şelasyon tedavisi sonrası idame tedavisinde yeri vardır. Etkinliği daha çok presemptomatik hastalar ve nörolojik formu olan hastalardadır. Yan etkileri çok azdır. Hafif gastrointestinal rahatsızlık ve baş ağrısı yapabilir (53 –58).

1.5.6. Tetrathiomolybdate:

İntraluminal bakırla barsaklarda birleşerek emilimini azaltır. Emilim sonrasında da serumdaki bakırla birleşerek nontoksik bakır bileşikleri meydana getirir. Bu bileşikler sayesinde bakırın dokular tarafından alımı engellenmiş olur. Bakıra olan affinitesi metallothioneinden daha yüksek olduğu için bağlı bakırı da alabilir. Bu açıdan penisilaminden daha potent bir ilaçtır. Nörolojik bulguların ağırlaştığı d-penisilamin kullanan hastalarda dokulara dağılmış olan bakırın alınmasında etkindir. Kemik iliği baskılanması ve bazı hayvanlarda bir takım kas iskelet sistemi bozukluklarına yol açtığı görülmüştür (59,60).

1.5.7. Karaciğer transplantasyonu:

Fulminant tabloda ki hastalarda, hepatoselüler rezervi azalmış genç hastalarda, bütün uyarılara rağmen ilacını kesen ve şiddetli karaciğer yetmezliği ile birlikte hemoliz olan hastalarda düşünülmalıdır (61).

1.6. Prognoz:

Tedavi edilmeyen WH ölümcüldür.

Akut nörolojik formda, bazal ganglionlarda kistik değişiklikler olan vakalarda prognoz kötüdür. Distoni aynı şekilde kötü prognoz gösterir ve şelasyon tedavisine yanıt vermez. Asemptomatik hastaların erken tedavisi ile nörolojik hastalıktan uzak tutmak mümkündür. Ayrıca nörolojik semptomu olan hastalarda şelasyon tedavisi sonucunda semptomlarda gerileme olabilir (16).

Kronik hepatit hastalarında tedaviye yanıt yetersiz olabilir. Sarılık, asit ve yüksek serum transaminazları kötü prognoz göstergeleridir (10).

Ölüm nedenleri karaciğer yetmezliği ve buna bağlı gelişen komplikasyonlardır (44).

2. BİREYLER VE YÖNTEM

2.1. Gruplar:

Çalışmanın amacı WH olan hastalarda TNF α düzeylerini saptamak olduğu için, kesitsel bir çalışma olarak planlandı. Çalışmaya bir hasta grubu ve bir sağlıklı kontrol grubu alındı. Hastalar Eylül – Kasım 2001 tarihleri arasında çalışmaya alındı. Çalışmaya katılan hastalardan bilgilendirilmiş onam formu ile onayları alındı.

2.1.1. Wilson hastaları:

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji bölümünde takip edilmekte olan Wilson Hastaları çalışma öncesinde tanı doğruluğu açısından değerlendirildi. Hastalar aşağıdaki kriterler doğrultusunda değerlendirildi.

Wilson Hastaları (İlk tanı sırasında):

- Serum ve idrar Cu düzeyleri yüksek
- Serum seruloplazmin düzeyleri düşük
- Kayser-Fleischer halkası pozitif
- KC biyopsisinde WH ile uyumlu bulgular
- Kuru KC dokusunda >250 μ cg bakır saptanması
- Uzun süren kolestaz bulguları olmaması

Bölümümüzce izlenmekte olan 29 hasta belirlendi. Bu bulgularla WH tanısının doğruluğuna karar verilen 28 hasta saptandı. Bir hastanın KC biyopsisi ve biyokimyasal parametreleri WH'ni desteklemediği için araştırma protokolünden çıkartıldı.

Kayıtlı hastalarımızın 24 üne telefonla ulaşıldı ve bölümümüze kontrole çağrıldı.

2.1.2. Sağlıklı kontrol grubu:

Bölümümüze viral veya metabolik hepatit dışı nedenlerle başvuran ve ileri tetkikleri yapılmış olan hastalardan oluşmaktadır. Bu hastaların herhangi bir karaciğer hastalığı olmadığı sadece fonksiyonel dispepsi veya irritabl barsak sendromu gibi tanıları olduğu bilinmekteydi. Bu gruptaki bireylerde TNF α düzeylerini değiştirebilecek kronik inflamatuvar hastalıklar veya malignansi olmamasına dikkat edildi.

Sağlıklı kontrol grubu için çalışmaya alınma kriterleri:

- Yakın dönemde viral bir infeksiyon geçirmeyen
- KCFT normal
- Hepatit belirleyiciler negatif
- Normal serum bakır düzeyleri
- Normal seruloplazmin düzeyleri

2.2. Ölçümler:

Tüm bireylerde, kontrolleri sırasında sadece yapılması gereken tetkikler istendi. Tüm bireylerden alınan kan örnekleri normal biyokimya tüpleri içerisine konuldu ve bekletilmeden santrifüjle plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazma örnekleri yine bekletilmeden -20°C de saklanmaya alındı. Çalışma için saklanan bütün plazma örnekleri alındı. Daha sonra +4°C de saklanan insan TNF- α için hazırlanmış olan monoklonal antikorlarla (*Biosource International Human TNF- α Immunoassay Kit*) “sandwich” Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle çalışma gerçekleştirildi.

2.2.1. Serum TNF- α Düzeylerinin Ölçüm İşlemi:

Kullanılan metod kantitatif “*sandwich immunoassay*” tekniğidir. Kitlerde bulunan kuyucuklar insan TNF- α için spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Bu kuyucuklara ilave edilen örneklerde bulunan TNF- α molekülleri işlem sırasında kuyucuklardaki immobil antikorlara bağlanır. Yıkama sonrasında insan TNF- α için spesifik monoklonal antikorlar eklenir. Tekrar yıkama işlemi yapılarak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılır. Üçüncü inkübasyondan sonra ölçüm için substrat ilavesi yapılır. Substrat eklendikten sonra renk değişimi gözlenir. Oluşan renk yoğunluğu

başlangıçtaki örnekte bulunan TNF- α düzeyi ile orantılıdır. Örnek optik okuyucuya alınarak sonuç fotometrik olarak değerlendirilir.

A) Reaktiflerin hazırlanması:

1. Yıkama tamponu hazırlanması : 1 hacim yıkama tamponu üzerine 24 hacim deiodinize su eklenerek elde edilen konsantre oda sıcaklığına erişinceye kadar bekletilir, içinde çözünmemiş tuzların kalmaması gereklidir. (100 ml yıkama tamponu konsantresinden 2,5 litre yıkama tamponu elde edildi)

2. Standartların hazırlanması: Önceden hazırlanmış donmuş standart örneği oda ısısında 0.300 ml deiyodinize su ile muamele edildive tüm kristaller çözülünceye kadar 10 dk beklendi.

3. Streptavidin-HRP konjugatlarının hazırlanması: 10 μ L konsantre solüsyon alınarak 1mL Streptavidin-HRP dilüentine konarak kullanıma hazır hale getirildi ve oda sıcaklığında bekletildi.

4. Kullanılacak diğer reaktifler (microtiter plate, substrat: tetramethylbenzidine, stop solusyonu, dilüsyon örneği) ve malzemeler (data kartları, pipetler, otomatikmicrotiter plate yıkayıcısı, optik dansite okuyucu, deiyodinize su) kullanıma hazır halde hazırlanmıştır.

B) Deneyin yapılışı

1. İnkübasyon tamponundan 50 μ L kuyucuklara eklenir.
2. her kuyucuğa 100 μ L standart, örnek veya kontroller eklenir.
3. kit kapatılarak oda sıcaklığında iki saat inkübasyon için bekletilir.
4. kuyucuklardaki kalan solüsyon aspire edildikten sonra yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.
5. 100 μ L antiTNF- α alınarak her bir kuyucuğa eklenir ve karışması beklenir.
6. kit kapatılarak oda sıcaklığında bir saat inkübe olması beklenir.
7. kuyucuklarda kalan solüsyon alındıktan sonra 4 kez yıkanır.
8. 100 μ L Streptavidin-HRP solüsyonu kuyucuklara eklenir.
9. otuz dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
10. yüzeyde kalan solüsyon aspire edilip 4 kez yıkanır.

11. 100µL stabilize kromojen solusyonu her bir kuyucuğa eklenir. Kuyucuklardaki sıvının rengi maviye dönmeye başlar.
12. otuz dakika oda sıcaklığında ve karanlık bir yerde inkubasyon yapılır.
13. her bir kuyucuğa 100µL stop solusyon eklenir. Kuyucuklardaki sıvının rengi maviden sarıya dönmeye başlar. 450nm de absorbans değerleri belirlenir.
14. standart solusyonların absorbans değerleri konsantrasyonlarına göre bir kağıt üzerine çizilir.
15. Bir önceki aşamada çizilen grafik üzerinden örneklerin ve kontrollerin hTNF-α değerleri okunur.



3. İstatistiksel Çalışma

Veriler elde kodlandıktan sonra IBM uyumlu bir bilgisayara girildi. Verilerin değerlendirilmesinde “SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) for Windows Release 10.0.1” ve “Statview for Windows v 5.0” programları kullanıldı.

Hastaların demografik özellikleri (Yaş, Cinsiyet) ve ortalama AST, ALT değerleri için tanımlayıcı istatistikler yapıldı. Bunlar ortalama, standart sapma olarak belirtildi. Grupların ortalamalarını karşılaştırmak için; öncelikle Levene testi ile varyansların homojenliği gösterildi. Daha sonra independent samples t testi uygulandı. AST, ALT değerleri ile TNF- α düzeylerinin açısından gruplar arasında fark aramak için tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) yapıldı. $P<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR:

4.1. Tanımlayıcı istatistikler

4.1.1. Wilson hastaları:

Serum örnekleri alınan 24 hastanın değerlendirilmesinde 22 tanesinin sonuçları değerlendirmeye alındı. 2 hastada ise TNF- α düzeyleri belirlenemediği için çalışma dışı bırakıldı.

22 hastanın 9 tanesi erkek, 13 tanesi kadındı. Ortalama yaş: $28,8 \pm 11,3$ (min.:17 - max.:56) idi. Hastalığın tanı yaşı $8 \pm 10,1$ (min.: 8 – max.: 39) olarak bulundu. ancak hastaların dosyaları detaylı olarak incelendiğinde hastalık belirtilerinin 3 yaşında bile çıktığı vakalar olduğu görüldü.

Hastaların transaminaz değerleri ise:

ALT: $52,5 \pm 61,1$ U/L (min.: 13 – max.:271)

AST: $38,1 \pm 24,3$ U/L (min.: 15 – max.: 109) olarak bulundu. Şekil 4.1.

Bu gruptaki hastaların ortalama serum TNF- α düzeyleri: $9,914 \pm 7,932$ (min.: 0 – max.: 22,6) olarak belirlendi. Şekil 4.2.

4.1.2. Sağlıklı kontroller:

Serum örnekleri alınan 30 bireyden değerlendirmeye alınan sonuç sayısı 28.

Bu grupta kadın ve erkek denek sayısı birbirine eşitti. Erkek:14, Kadın 14. ortalama yaş: $30,9 \pm 11,4$ (min.: 14 – max.: 65) arasında değişmekteydi.

transaminaz değerleri ise:

ALT: $32 \pm 21,1$ U/L (min.: 8 – max.:32)

AST: $30 \pm 16,8$ U/L (min.: 8 – max.: 30) olarak bulundu. Şekil 4.1.

Ortalama serum TNF- α düzeyleri: $8,274 \pm 8,784$ (min.: 0 – max.: 34,3) olarak belirlendi. Şekil 4.2.

4.2. Gruplar arası karşılaştırmalar

Wilson hastaları ile kontrol grubu arasında yaş ve cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel anlamlı bir fark olmadığı görüldü. $P>0,05$. Yaş ve cinsiyet dağılımı açısından hastaların birbirine benzer olduğunu söyleyebiliriz. Serum TNF- α düzeyleri açısından herhangi bir farklılık ortaya çıkarsa bunun yaş veya cinsiyet farkından kaynaklanmadığı açısından önemli bir bulgudur.

Serum transaminaz düzeyleri hastalık aktivitesini göstermesi açısından önemlidir. WH grubunda değerlerin yüksek olmasını şu anda karaciğerde devam eden, kronik bir olaya bağlı olarak açıklayabiliriz.

Tablo 4.1. ALT ve AST Değerleri Açısından Hastaların Karşılaştırılması

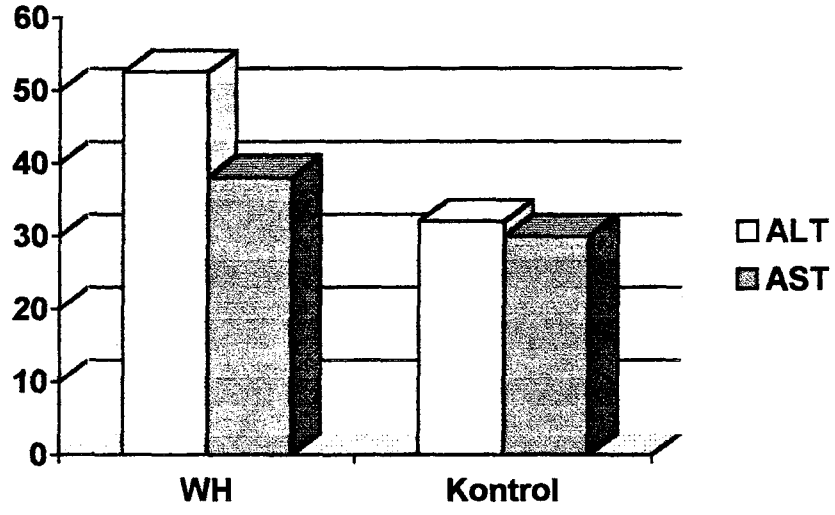
	<i>Wilson Hastaları</i>				<i>Normal Kontroller</i>			
	Ortalama	SD	Min	Max	Ortalama	SD	Min	Max
ALT	52.5	61.1	13	271	32	21.1	8	2
AST	38,1	24.3	16	109	30	16.8	8	32
Sayı	22				28			

ALT ve AST değerleri açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu görüldü $p<0.01$

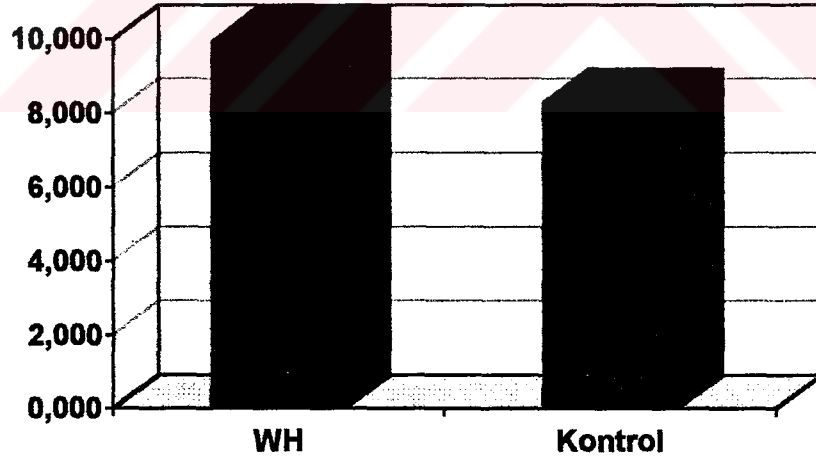
Tablo 4.2. Grupların Ortalama TNF- α Düzeyleri Açısından Karşılaştırılması

	Sayı	%	ortalama	SD	Min. -Max.
Wilson Hastaları	22	44	9.914	7.932	0 – 22.6
Normal Kontroller	28	56	8.274	8.784	0 – 34.3
Sayı	50	100	$p>0.05$		

Serum transaminazları açısından önemli farklılık saptanan iki grup arasında serum TNF- α düzeyleri açısından fark araştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. $P>0.05$



Şekil 4.1. WH ve Kontrol Grubunda Serum ALT ve AST Düzeyleri ($p < 0.01$)



Şekil 4.2. WH ve Kontrol Grubunda TNF- α Düzeyleri ($p > 0.05$)

5. TARTIŞMA:

WH da genotip ve hastalığın seyri arasında belirgin bir ilişki gösterilememiştir. Çok değişik sayıda mutasyonların gösterilmiş olması nedeni ile hastalık tablosu ile allelik heterojenite arasında ilişki aramak zordur. Değişik mutasyonların bakırı algılama, taşınma veya bakır atılımı ile ilgili fonksiyonları bozduğunu düşünülmektedir. Fonksiyon bozukluğunun derecesi veya hangi aşamada olduğu hastalığın ortaya çıkış şeklini veya seyrini değiştiriyor mu? Bu soruya şu ana kadar kesin bir cevap vermek mümkün olmamıştır (48,49,62).

Yakın dönemde yapılan bir çalışmada semptomatik Wilson hastalarından aynı mutasyona sahip olan ve değişik etnik kökene mensup kişilerde hastalığın ortaya çıkış yaşı ve seyri gibi değişik parametreler incelenmiş. Çalışma sonucunda bu hastaların fenotipik görünümündeki farklılığın etnik kökene bağlı olabileceği belirtilmiştir. Benzer şekilde kuzey Amerika dan yapılan bir çalışmada His1069Gln mutasyonu için homozigot olan hastalarda ortalama hastalığın ortaya çıkış yaşı 20 iken heterozigot olanlarda 15 tir (16,48,49).

Yukarıdaki mutasyon için hastalığın başlama şeklide değişmektedir. Homozigotlarda nörolojik başlangıç ön planda iken heterozigot olanlarda hepatik başlangıç daha sık görülmektedir.

Asn1270Ser mutasyonu taşıyan hastalarda fulminant başlangıcın sık görüldüğü bildirilmiş olsa da bazı hastalarda seyrinin kötü olmadığı görülmüştür. Heterozigot mutasyonu olan hastalarda genotip fenotip ilişkisi aramak güçtür. Ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde heterozigot mutasyonlara çok sık rastlanılmaktadır (11).

Bazı çevresel faktörler hastalığın ortaya çıkış şekli ve seyrini etkileyebilmektedir. Diyetteki bakır miktarı ülkelere ve kültürlere bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Daha az miktarda alınması hastalık semptomlarının geç çıkmasından sorumlu faktörlerden birisi olabilir. İntestinal metallothionein düzeyleri ve indüklenbilme derecesi bakır alımının azalması açısından önemlidir. Bir diğer faktör bakırın yarattığı oksidatif stressle başa çıkabilme yeteneğinin farklı olmasıdır. Bu nedenlerden dolayı fenotipik görünümde farklılıklar görülebilir (10,11,16,44,63).

Apolipoprotein E genotipinin WH üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Özellikle H1069G mutasyonu olan hastalarda ApoE ε3/3 genotipine sahip olanlarda

hastalığın başlama yaşı bu genotipe sahip olmayanlardan 5 –10 yıl sonra olmaktadır. Buna karşın hastalık belirlendiği sıradaki tablo açısından karşılaştırıldığında genotipler arasında bir fark yoktur. ApoE3 proteinin membran stabilize edici ve antioksidan özelliklerinin etkili olduğu öne sürülmüştür (65).

Moleküler patogeneze bahsedilen bakır taşıyıcı “*chaperone*” ların intraselüler algılama ve proteinin yer değiştirme üzerine etkileri bilinmektedir. Bu proteinlerden atox1 (HAH1) fonksiyonlarındaki kişiler arası farklılık hastalık tablosunu değiştirebilir mi? Bu konu araştırmaya açıktır.

İnflamasyon birçok hastalığın etiopatogenezinde rol oynayan önemli bir süreçtir. Proinflamatuvar mediatörlerin kronik hastalıklarda, ki bunlar; ateroskleroz, koroner arter hastalığı ve kollajen doku hastalığı gibi, rolü araştırılmaktadır.

Sitokinler neredeyse bütün çekirdekli hücreler tarafından üretilen peptidlerdir. Karaciğerde ve diğer dokularda sürekli bir sitokin üretimi yoktur. Artık bazı sitokinlerin hepatik inflamasyon, apoptozis ve nekrozda rol oynadığını biliyoruz. Aynı zamanda ilginçtir ki bu mediatörler karaciğer dokusunun rejenerasyonunda da rol almaktadır. Bu sitokinlerin arasında tümör necrosis faktör alfa anahtar rol oynamaktadır. Bu yüzden TNF blokajının bazı karaciğer hastalıklarında tedavi edici rolü araştırılmaya başlanmıştır. (66-70)

TNF alfa üretiminin genetik kontrol altında olduğu bilinmektedir. Son yıllarda kalp hastalıklarından spondiloartropatlilere kadar değişik hastalıkta rolleri araştırılmaktadır. Bu hastalıklarda hastalık seyrinin farklı olması üzerine etkileri belirlenmiştir. (66-70)

TNF alfanın karaciğer hastalıkları üzerine etkileri ise daha çok viral hepatitler ve alkolik karaciğer hastalıklarında araştırılmıştır. Özellikle WH da araştırılmamış olup hastalığıdaki düzeyleri literatürde ilk olarak bizim araştırmamızda belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu yüzden TNF alfa ve karaciğer üzerine etkileri konusundaki bilgilerimiz viral hepatitli vakalarda yapılan çalışmalardan elde edilmiştir

TNF- α nın karaciğer üzerine etkileri ilk olarak antitümör ajan olarak denendiği dönemlerde görülmüştür. Sistemik kullanım sırasında serum transaminazlarda ve bilirubin düzeylerinde artma olduğu görülmüştür. Direkt hepatotoksik bir ajan olduğu düşünülmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalarda viral

hepatitlerin, alkolik karaciğer hastalığı ve fulminant hepatit seyri sırasında düzeylerinin arttığı görülmüştür. Ayrıca ölen hastalarda ölçülen düzeylerin sağ kalanlardan daha yüksek olduğu dikkati çekmiştir. (70)

Kronik B ve C hepatitinin patogeneğinde rol oynadığı öne sürülmüştür. İnsan hepatoma hücre serilerinde her iki virüsün TNF yapımını artırdığı görüldü. Hepatit B hastalarında yapılan çalışmalarda yüksek TNF düzeyleri ile viral temizlenme arasında bir ilişki olduğu görüldü. TNF reseptörlerinin değişik fonksiyonları olduğu bilinmektedir. TNF-R2 hepatik inflamasyon ve hepatosit ölümü ile ilişkilidir. (66,71-73)

Kronik hepatit C hastalarında yapılan çalışmalarda TNF- α düzeylerinin interferon tedavisi sonrasında normal düzeylere gerilediği görülmüştür. Ayrıca tedavi öncesinde TNF- α düzeyleri yüksek olanlarda tedaviye başarısızlık oranı daha yüksek oranda görülmektedir. (71-73)

Alkolik hepatitte TNF- α düzeylerinin yüksek olduğu görülür. Kişilerin alkole karşı verdiği cevabın farklı olmasının alkolik hepatit gelişiminde önemli olduğu belirtilmektedir. Ayrıca viral hepatit ve alkolik hepatit birlikteliğinde hasarı artıran sinerjistik etkilerin TNF reseptörleri üzerinden olduğu bulunmuştur. (74)

Bütün bunlara dayanarak karaciğer hastalığının prognozunu tedavi öncesinde bilmek mümkündür. Özellikle tedavi öncesinde sitokin düzeylerinin ve özellikle TNF- α düzeylerinin belirlenmesi tedaviye yanıt alıp alamayacağımızı gösterebilir.(71-76)

Apoptozis toksik hepatitlerde etkili ilk olaydır ve doku inflamasyonu ile fibrosis oluşumundaki rolü aydınlatılmıştır. Deneysel karaciğer hasarı modellerinde hepatik apoptozis ile karaciğer hasarını gösteren transaminazlarda yükselme olmaktadır. Eğer meydana gelen apoptotik süreç doku iyileşmesinden daha büyükse organ yapısında bozulma ve yetmezlik görülebilmektedir. WH da morfolojik olarak apoptozisin arttığı gösterilmiştir (38).

TNF- α rejenere olan karaciğerde hücre çoğalmasında önemli rol oynar. Bu aşamada meydana gelecek bir engelleme yenilenme sürecini etkiler. Karaciğerde TNF- α kaynağı safra yolu epitel hücreleri, venöz endotel hücreleri ve makrofajlardır. Çeşitli hayvan deneylerinde TNF- α nın akut karaciğer hasarında önemli olduğu

görülmüştür. Verilen TNF- α antikoru bazı durumlarda karaciğer hücre hasarını engellemektedir.

Özet olarak; karaciğer hücre hasarını çok değişik nedenler başlatabilir. Bunlar arasında viral, toksik ve metabolik nedenler ön planda gelmektedir. Virüsler içinde en çok bilinenleri hepatotrop virüslerdir. Ancak her türlü virüs karaciğeri etkileyebilmektedir. WH ise hem toksik hemde metabolik nedenler içerisinde yer alan bir hastalıktır. Bakır metabolizmasındaki genetik bozukluk nedeni ile biriken bakır toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. Yapılan çalışmalarda yüksek miktarda bakır içeren diyetle beslenen deney hayvanlarında mitokondrial hasar ve WH benzeri tablo gelişebilmektedir.

Karaciğer de hangi nedene bağlı olarak hasarın ortaya çıktığı özellikle tedavi açısından önemlidir. Ama ortaya çıkan bu hasarı telafi etmede organizmanın kullandığı mekanizmalar etkenden bağımsızdır. Yani viral veya toksik etkenlere verilen inflamatuvar cevap aynıdır. Bazı hastalıklarda tedavi öncesinde inflamatuvar araçların bilinmesi, tedaviye yanıtın öngörülmesinde faydalı olmaktadır. WH belirtildiği üzere bakır toksisitesi nedeniyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalıkta benzer süreçlerin iş başında olduğunu düşünülmektedir. Ancak hastalığın çok nadir görülmesi, kliniği birbirine benzemeyen hastaların çok görülmesi ve tanı anında hastalığın hemen her zaman ileri dönemde bulunması benzer çalışmaların yapılmasını zorlaştırmaktadır.

Çalışmamız WH da inflamatuvar sitokinlerin araştırılması açısından literatürde ki ilk çalışmadır. Ancak sitokin düzeylerinin WH da ki yeri belirsizdir. Bu çalışmayı daha çok bir ön çalışma olarak ele almakta fayda vardır. TNF- α düzeylerinin normal kontrollerden farkı olmaması bazı soru işaretleri yaratmaktadır.

- WH da TNF- α aracılı inflamasyonun yeri çok azdır
- Hastaların şelasyon tedavisi almaları bu hastalarda oksidatif stresin ve hepatosit ölümünün azalmasına ve sonuç olarak ta inflamatuvar cevabın yatışmasına yol açmıştır diye düşünülebilir.
- Bu çıkarımları yapabilmek için hasta sayısı yeterli değildir.
- TNF- α ve şelasyon tedavisinin etkisi üzerine prospektif bir çalışma yapılması ile bu soruların büyük bir bölümüne cevap bulunabilir.

- TNF- α düzeyleri çok değişik faktörlere bağlı olarak etkilendiği için bu hastalarda TNF- α geni allelleri çalışılabilir. Ayrıca alleller arası farklılıklar ve hastalığın seyri üzerine etkilerinin araştırılması daha doğru olacaktır.

- Viral hepatitlerde inflamasyonla aktivite arasında ilişki olduğunu gösteren solubl TNF- α reseptörlerinin düzeyleri araştırılmalıdır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER:

WH bakır metabolizmasında bozulma sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalığa ait bilgiler özellikle son 20 yıl içinde elde edilmiştir. Hastalık geninin 13. kromozomda olduğu bilinmektedir. Gelişen teknoloji ile hastalığın genetik tanısı mümkün olabilmektedir. Gen üzerinde çok sayıda mutasyon bildirilmiştir. Hastalık genin büyük olması nedeni ile gelecek yıllarda en az şu an bildiğimiz kadar yeni mutasyonların ekleneceği düşünülmektedir. Çok sayıda ki mutasyon hastalık tanısında genetik çalışmaları zahmetli ve zaman alır hale getirmiştir. Sık görülmeyen bir hastalık olduğu için toplum taramalarından çok etkilenmiş bireylerin erken tanısı üzerine odaklanılmalıdır.

Belirtileri 8 ila 30 yaşları arasında ortaya çıkabilir. Hastalarda hepatik veya nörolojik belirtiler ön planda olabilir. Hastalığın değişik formlarda görülmesinde ATP7B mutasyonu ile birlikte bir takım çevresel ve genetik faktörler de etkili olur. Bunlardan şu anda en çok üzerinde durulan konular antioksidan savunma ve apolipoprotein E genotipidir. Çeşitli çalışmalarda alfa tokoferol verilmesinin bakır aracılı KC hasarını hafiflettiği görülmüştür. Apolipoprotein E özellikle antioksidan savunmada görevli bir proteindir. Aynı mutasyonu taşıyan Wilson Hastalarında klinik seyrinin farklı olmasında bu proteinin rol alabileceğine dair görüşler mevcuttur.

Kişiler arası farklılıklara yol açabilecek etkenlerden birisi inflamatuvar cevap ta ki farklılık mıdır? Bilindiği üzere inflamasyona karşı yanıt kişiden kişiye farklılıklar gösterir. İnflamatuvar yanıtta önemli mediatörlerden birisi TNF- α dır. TNF- α düzeyleri değişik karaciğer hastalıklarında artar. TNF- α düzeyleri ve hepatik inflamasyon ve tedaviye cevap arasında ilişki mevcuttur. TNF- α düzeylerinin etnik köken, yaş ve cinsiyete göre farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Karaciğer dışı hastalıklarda da bu genetik farklılığın hastalık seyrini değiştirdiği görülmüştür.

Wilson hastalarında serum TNF- α düzeylerini araştırdığımız bu çalışmamızda serum TNF- α düzeylerinin sağlıklı normal kontrollerden farklı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Gruplar arasında hepatik inflamasyon açısından farklılık olduğunu ALT/AST düzeylerine bakarak söylemek mümkündür. ($p<0.01$) Aktif inflamasyonun sürdüğünü varsayarsak düzeyler yüksek bulunmalıydı.

WH patogenezinde inflamatuvar araçların yerinin olmadığını söylemek güçtür. Burada en önemli sorun hastaların başlangıç durumları ile şu anki durumları

arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya konamayacak olmasıdır. Şelasyon tedavisi sonrasında yatışmış hepatik inflamasyon nedeni ile TNF- α düzeylerinde yükselme olmadığını düşünülebilir.

WH da inflamatuvar araçların yerini belirlemek için yeni tanı alan hastalarda bu moleküllerin çalışılması daha doğru sonuçlar verebilir.



KAYNAKLAR:

1. Cuthbert JA. Wilson's disease: Update on a systemic disorder with protean manifestations. *Gastroent Clin North Amer* 1998;27: 655-682
2. Schilsky M. Wilson disease: Genetic basis of copper toxicity and natural history. *Semin Liver Dis* 1996;16:83-95
3. Gitlin N. Wilson's disease: the scourge of copper. *J Hepatol* 1998 Apr;28(4):734-9
4. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: A familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912;34:295-507
5. Cummings JN. The copper and iron content of the liver and brain in the normal and hepatolenticular degeneration. *Brain* 1948;71:410-415
6. Scheinberg IH, Gitlin D. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration. *Science* 1952;116:484-485
7. Bearn A. A genetical analysis of 30 families with Wilson's disease. *Ann Hum Genet* 1960;24:33-43
8. Frydman M, Bonne-Tamir B, Farrer LA et al. Assignment of the gene for Wilson's disease to chromosome 13: Linkage to the esterase D locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1819-1821
9. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, et al. The Wilson's disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993;5:327-337
10. Scherlock S, Dooley J. Wilson's Disease. In: *Diseases of the Liver and Biliary System*. Blackwell Publishing, 2002, 413-23
11. Riordan MS, Williams R. The Wilson Disease Gene and Phenotypic Diversity. *J. Hepatol*, 2001, 34 : 165-71
12. Maier-Dobersberger T et al. Detection of the His1069Gln Mutation in Wilson Disease by Rapid Polymerase Chain Reaction. *Ann Int Med*, 1997, 127:21-26
13. Czlonkowska A, Very High Frequency of the His1069Gln Mutations in Polish Wilson Disease Patients. *J Neurol* 1997; 32:591-599
14. Shah AB, Chernov I, Zhang HT, et al: Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): Population frequencies,

genotype-phenotype correlation and functional analysis. *Am J Hum Genet* 61:317, 1997

15. Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson's dis-ease. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:271-277
16. Loudianos G, Gitlin JD. Wilson's Disease. *Sem Liver Disease*. 2000, 20(3), 1-13
17. Camakaris J, Voskoboinik I, Mercer J. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261: 225-232
18. Pena MM, Lee J, Thiele DJ. A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 1999;129: 1251-1260
19. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996 May;63(5):797S-811S
20. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson's disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993;5:344-350
21. Dancis A, Yuan DS, Halle D, et al. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 1994;76:393-402
22. Zhou B, Gitschier J. hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7481-7486
23. Schaefer M, Hopkins R, Failla M, et al. Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's dis-ease protein in the liver. *Am J Physiol* 1999;276:G639-G646
24. Schaefer M, Roelofsen H, Wolters H, et al. Localization of the Wilson's disease protein in human liver. *Gastroenterology* 1999; 117:1380-1385
25. Sato M, Gitlin JD. Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 1991;266:5128-5134
26. Schaefer M, Gitlin JD. Genetic disorders of membrane transport.IV. Wilson's disease and Menkes disease. *Am J Physiol* 1999; 276:G311-G314
27. Payne AS, Kelly EJ, Gitlin JD. Functional expression of the Wilson's disease protein reveals mislocalization and impaired copper-dependent trafficking of

the common H1069Q mutation. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:10854-10859

28. Wu J, Forbes JR, Chen HS, et al. The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson's disease gene. Nat Genet 1994;7:541-545
29. Lin SJ, Culotta VC. The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:3784-3788
30. Rae T, Schmidt P, Pufahl R, et al. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. Science 1999;284:805-808
31. Hung IH, Casareno RL, Labesse G, et al. HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. J Biol Chem 1998;273:1749-1754
32. Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, et al. Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor, Atx1. Science 1997;278:853-856
33. Lutsenko S, Cooper MJ. Localization of the Wilson's disease protein product to mitochondria. Proc Natl Acad Sci 1998; 95:6004,
34. Larin D, Mekios C, Das K, et al. Characterization of the interaction between the Wilson's and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p. J Biol Chem 1999;274: 28497-28504
35. Hamza I, Schaefer M, Klomp LW, et al. Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson's disease protein is essential for copper homeostasis. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96: 13363-13368
36. Mansouri A, Gaon I, Froment B, et al. Premature oxidative aging of hepatic mitochondrial DNA in Wilson's disease. Gastroenterol , 1997,113:599
37. Bradham CA, Plümbe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. Mechanisms of Hepatic Toxicity. I. TNF-induced Liver Injury. Am J Physiol, 1998, 275: G387-G392
38. Natori S. Et.al. hepatocyte Apoptosis is a Pathologic Feature of Human Alcoholic Hepatitis. J Hepatol, 2001, 34: 248-253

39. Goldfischer S, Popper H, Sternlieb I: The significance of variations of copper in liver disease. *Am J Pathol* , 1980, 99:715.
40. Ludwig J, Moyer TP, Rakela J: The liver biopsy diagnosis of Wilson's disease. *Am J Clin Pathol*, 1994, 102:443
41. Mullins JE, Fuentealba IC Immunohistochemical detection of metallothionein in liver, duodenum and kidney after dietary copper-overload in rats. *Histol Histopathol* 1998 Jul;13(3):627-33
42. Immunohistochemical determination of the Wilson Copper-transporting P-type ATPase in the brain tissues of the rat. *Neurosci Lett* 1999 Apr 30;266(1):13-6
43. Esmaeli B, Burnstine MA, Martonyi CL, Sugar A, Johnson V, Brewer GJ. Regression of Kayser-Fleischer rings during oral zinc therapy: correlation with systemic manifestations of Wilson's disease. *Cornea* 1996 Nov;15(6):582-8
44. Zakko WF, Gollan JL. Wilson's Disease and Related Disorders. In: *Handbook of Liver Disease*. Friedman LS, Keefe EB. (eds.) Churchill Livingstone Press, 1998, s:239-255
45. Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, et al. Diagnosis of Wilson's disease: An experience over three decades. *Gut* 2000;46:415-419
46. Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N. Copper transport. *Am J Clin Nutr* 1998 May;67(5 Suppl):965S-971S .
47. Roche-Sicot J, Benhamou J: Acute intravascular hemolysis and acute liver failure associated as a first manifestation of Wilson's disease. *Ann Intern Med* 86:301, 1977
48. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, et al. Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson's disease: Identification of 19 novel mutations. *J Med Genet* 1999;36:833-836
49. Curtis D, Durkie M, Balac P, et al. A study of Wilson's disease mutations in Britain. *Hum Mutat* 1999;14:304-311
50. Walshe JM, Munro NA: Zinc-induced deterioration in Wilson's disease aborted by treatment with penicillamine, dimercaprol, and a novel zero copper diet. *Arch Neurol* 54:20, 1995

51. Brewer GJ Practical recommendations and new therapies for Wilson's disease. *Drugs* 1995 Aug;50(2):240-9
52. Chan C-Y, Baker AL: Penicillamine hypersensitivity: Successful desensitization of a patient with severe hepatic Wilson's disease. *Am J Gastroenterol* 1:442, 1994
53. Brewer GJ, Dick RD, Johnson VD, et al: Treatment of Wilson's disease with zinc: XV. Long-term follow-up studies. *J Lab Clin Med* 132:264, 1998
54. Schilsky ML, Blank RR, Czaja MJ, et al: Hepatocellular copper toxicity and its attenuation by zinc. *J Clin Invest* 84:1562, 1989
55. Sokol RJ, Devereaux M, Mierau GW, et al: Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. Modification of vitamin E deficiency. *Gastroenterology* 99:1061, 1990
56. Walshe JM: Wilson's disease. New oral therapy. *Lancet* 1:25, 1956
57. Yuzbasiyan-Gurkan V, Grider A, Nostrant T, et al: Treatment of Wilson's disease with zinc: X. Intestinal metallothionein induction. *J Lab Clin Med* 120:380, 1992
58. Evering WE, Haywood S, Bremner I, Trafford J The protective role of metallothionein in copper overload: I. Differential distribution of immunoreactive metallothionein in copper-loaded rat liver and kidney. *Chem Biol Interact* 1991;78(3):283-95 .
59. Ogra Y, Ohmichi M, Suzuki KT Mechanisms of selective copper removal by tetrathiomolybdate from metallothionein in LEC rats. *Toxicology* 1996 Jan 8;106(1-3):75-83
60. Komatsu Y, Sadakata I, Ogra Y, Suzuki KT. Excretion of copper complexed with thiomolybdate into the bile and blood in LEC rats. *Chem Biol Interact* 2000 Feb 1;124(3):217-31
61. Schilsky ML, Scheinberg IH, Sternlieb I. Liver transplantation for Wilson's disease: Indications and outcome. *Hepatology* 1994;19:583-587
62. Pyeritz RE. Genetic heterogeneity in Wilson's disease: Lessons from rare alleles. *Ann Intern Med* 1997;127:70-72

63. Gu M, Cooper JM, Butler P, Walker AP, Mistry PK, Dooley JS, Schapira AH
Oxidative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease.
Lancet 2000 Aug 5;356(9228):469-74
64. Sokol RJ, Twedt D, McKim JM Jr, Devereaux MW, Karrer FM, Kam I, von
Steigman G, Narkewicz MR, Bacon BR, Britton RS, et al Oxidant injury to
hepatic mitochondria in patients with Wilson's disease and Bedlington terriers
with copper toxicosis. *Gastroenterology* 1994 Dec;107(6):1788-98
65. Schiefermer M. Et.al. " The impact of apolipoprotein E genotypes on age at
onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease." *Brain*,
2000;123:585-590.
66. Spanakis NE, Garinis GA, Alexopoulos EC, Patrinos GP, Menounos PG,
Sklavounou A, Manolis EN, Gorgoulis VG, Valis D. Cytokine serum levels
in patients with chronic HCV infection. *J Clin Lab Anal* 2002;16(1):40-6
67. Kanzler S, Galle PR. Apoptosis and the liver. *Semin Cancer Biol* 2000
Jun;10(3):173-84.
68. Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G. Transforming growth factor beta
and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of
activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999 Jul;30(1):196-202.
69. Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology.
Hepatology 1999 Jan;29(1):1-4
70. Tilg H. Cytokines and liver diseases. *Can J Gastroenterol* 2001
Oct;15(10):661-8
71. Kimball P, Elswick RK, Shiffman M. Ethnicity and cytokine production
gauge response of patients with hepatitis C to interferon-alpha therapy. *J Med
Virol* 2001 Nov;65(3):510-6
72. Tai DI, Tsai SL, Chen TC, Lo SK, Chang YH, Liaw YF. Modulation of
tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in chronic hepatitis B and C: the
differences and implications in pathogenesis. *J Biomed Sci* 2001 Jul-
Aug;8(4):321-7
73. Neuman MG, Benhamou JP, Malkiewicz IM, et.al. Cytokines as predictors
for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with
chronic hepatitis C. *Clin Biochem* 2001 May;34(3):173-82

74. Neuman MG, Brenner DA, Rehermann B, et.al. Mechanisms of alcoholic liver disease: cytokines. *Alcohol Clin Exp Res* 2001 May;25(5 Suppl ISBRA):251S-253S
75. Gershon AS, Margulies M, Gorczynski RM, Heathcote EJ. Serum cytokine values and fatigue in chronic hepatitis C infection. *J Viral Hepat* 2000 Nov;7(6):397-402.
76. Itoh Y, Okanoue T, Ohnishi N, Sakamoto M, Nishioji K, Nakagawa Y, Minami M, Murakami Y, Kashima K. Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1999 May;94(5):1332-40

