



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**WILSON HASTALARINDA PLAZMA TİYOL/DİSÜLFİT
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Emine Melis YÜCEL
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Buğra Tolga KONDUK**

Ekim - 2020

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

WILSON HASTALARINDA PLAZMA TİYOL/DİSÜLFİT
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emine Melis YÜCEL
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Buğra Tolga KONDUK

Ekim - 2020

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi tarafından (TF.UT.19.46) proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Tezin adı: Wilson Hastalarında Plazma Tiyo/Disülfid Düzeylerinin Araştırılması

Dr. Emine Melis YÜCEL

27.10.2020

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....

Prof. Dr. Can DEMİREL

Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....

Prof. Dr. Murat Taner GÜLŞEN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak yeterli bulunmuştur.

(İmza).....

Tez Danışmanı

Doc.Dr.Buğra Tolga KONDUK

TEZ JÜRİSİ:

Prof.Dr. Murat Taner GÜLŞEN

Doc.Dr.Buğra Tolga KONDUK

Dr.Öğr. Üyesi Nimet YILMAZ

Doc.Dr.Handan HAYDAROĞLU ŞAHİN

Prof. Dr. Zeynel Abidin ÖZTÜRK

I. ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bizimle paylaşan, ilgisini her daim bizlerden esirgemeyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat Taner GÜLŞEN'e teşekkürü borç bilirim.

Tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimimdeki katkılarından ötürü, tez danışman hocam Doç. Dr. Buğra Tolga KONDUK'a teşekkürlerimi sunarım.

Titiz gayreti ve yönlendirmesi ile tezime olan katkılarından ötürü hocam Prof.Dr.Tuncay DEMİRYÜREK'e teşekkürlerimi sunarım.

İhtisas süresince beraber çalışmaktan onur duyduğum ve sayelerinde birçok bilgi ve tecrübe edindiğim tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her koşulda yanımda olan sevgili eşim Hakan YÜCEL'e teşekkür eder, oğlum Mehmet ve kızım Zeynep'in gözlerinden öperim.

Hayatım boyunca yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Dr. Emine Melis YÜCEL

Gaziantep - 2020

II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. ÖZET	IV
IV. ABSTRACT	V
V. KISALTMALAR	VI
VI. TABLOLAR LİSTESİ	VII
VII. ŞEKİL LİSTESİ	VIII
VIII. RESİM LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Wilson hastalığı	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Bakır metabolizması	3
2.1.2.1. Genel bakış	3
2.1.2.2. Bakır transportu	3
2.1.3. Wilson hastalığında genetik defekt	4
2.1.4. Patogenezi	5
2.1.4.1. Hepatosit hasar mekanizması	6
2.1.4.2. Hastalığın doğal seyri	7
2.1.5. Klinik bulgular	7
2.1.5.1. Hepatik bulgular	8
2.1.5.2. Nörolojik bulguları	9
2.1.5.3. Davranışsal ve psikiyatrik belirtiler	10
2.1.5.4. Oküler bulgular	11
2.1.5.5. Diğer belirtiler	11
2.1.6. Tanı	12
2.1.6.1. Serum serüloplazmin konsantrasyonu	13
2.1.6.2. Serum Bakır Konsantrasyonu	13
2.1.6.3. Oküler Slit-Lamba İncelemesi	14

2.1.6.4. Üriner Bakır Atılımı	14
2.1.6.5. D-Penisilamin yükleme testi	15
2.1.6.6. Karaciğer biyopsisi	15
2.1.6.7. Genetik test	16
2.1.6.8. Beyin görüntüleme testleri	17
2.1.7. Tedavi	17
2.1.7.1. Farmakolojik tedavi	17
2.1.7.2. Diyet önerileri	18
2.1.7.3. Akut karaciğer yetmezliği	18
2.1.7.4. Karaciğer nakli	19
2.1.8. Prognoz	19
2.2. Tiyo-disülfid homeostazı	19
2.3. Nitrojen stres	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Çalışma popülasyonları	21
3.2. Kan örnekleri	22
3.2.1. Tiyo-Disülfid Parametrelerinin Ölçümü	22
3.2.2. NO analizi	23
3.4. 3-Nitrotirozin ölçümü	24
3.5. Diğer biyokimyasal analizler	24
3.6. İstatistik	25
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR	36

III. ÖZET

Wilson hastalarında plazma tiyol/disülfid düzeylerinin araştırılması

Dr. Emine Melis YÜCEL

Tıpta Uzmanlık Tezi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Buğra Tolga KONDUK

Ekim 2020, 44 sayfa

GİRİŞ VE AMAÇ. Wilson hastalığı (WH), bakır birikimi sonucu karaciğerde ve sonunda beyinde toksisiteye neden olan, otozomal resesif geçişli bakır metabolizması bozukluğudur. Oksidatif stres, WH'nın patogeneğinde rol oynayabilir, ancak dinamik tiyol/disülfid homeostazının ve nitrozatif stresin rolleri bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, Wilson hastalarında tiyol/disülfid homeostazında ve nitrozatif strese değişiklik olup olmadığını değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM. WH'lı olan toplam 50 hasta (42'si ilaç tedavisi altında ve 8 yeni teşhis edilmiş ve ilaç tedavisi görmemiş hasta) ve yaş ve cinsiyet uyumlu 50 sağlıklı kontrol bu çalışmaya dahil edildi. Serum toplam tiyol ve doğal tiyol seviyeleri spektrofotometrik bir yöntemle ölçüldü. Dinamik disülfür bağlarının miktarı ve ilgili oranlar bu değerlerden hesaplandı. Serum nitrik oksit (NO) ve 3-nitrotirozin (3-NT) seviyeleri sırasıyla kemilüminesans ve ELISA testleri kullanılarak tespit edildi.

BULGULAR. Tedavi altında olan WH grubunda ortalama doğal tiyol seviyeleri, kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$). Gruplar arasında toplam tiyol, disülfid, disülfid/toplam tiyol, disülfid/doğal tiyol veya doğal tiyol/toplam tiyol oranlarında belirgin bir değişiklik tespit edilmedi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yeni tanı WH grubunda NO düzeylerinde ve yeni tanı ve tedavi altında olan WH gruplarında 3-NT düzeylerinde belirgin yükselmeler bulundu (sırasıyla, $p < 0.05$, $p < 0.01$).

SONUÇ. Sonuçlarımız tiyol/disülfid homeostazının ve nitrozatif stresin WH patogeneğinde rolü olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Tiyol, disülfid, nitrik oksit, nitrotirozin, Wilson hastalığı

IV. ABSTRACT

Investigation of dynamic thiol/disulfide homeostasis and nitrosative stress in patients with Wilson disease

Emine Melis YÜCEL, M.D

Residency Thesis, Department of Internal Medicine

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bugra Tolga KONDUK

October 2020, 44 pages

INTRODUCTION AND AIM. Wilson disease (WD) is an autosomal recessive inherited disorder of copper metabolism, resulting in copper accumulation, toxicity in the liver, and eventually in the brain. Oxidative stress may play a role in the pathogenesis of WD, but the roles of dynamic thiol/disulfide homeostasis and nitrosative stress have not been studied. The objective of this study was to assess whether there is a change in thiol/disulfide homeostasis and nitrosative stress in patients with WD.

MATERIAL AND METHOD. A total of 50 patients with WD (42 under drug treatment and 8 newly diagnosed patients with no drug treatment) and 50 healthy age- and sex-matched controls included to this study. Serum total thiol and native thiol levels have been measured with a spectrophotometric method. The amount of dynamic disulphide bonds and related ratios were calculated from these values. Serum nitric oxide (NO) and 3-nitrotyrosine (3-NT) levels were detected using a chemiluminescence and ELISA assays, respectively.

RESULTS. The average native thiol levels of the patient group after drug treatment were found to be significantly higher than those levels of controls ($P<0.05$). We detected no marked changes in total thiol, disulfide, disulfide/total thiol, disulfide/native thiol, or native thiol/total thiol ratios between groups. We found marked elevations in NO levels in newly diagnosed WD group, and 3-NT levels in newly diagnosed and under drug treatment WD groups when compared to controls (respectively, $p<0.05$, $p<0.01$).

CONCLUSION. These results are suspected that thiol/disulfide homeostasis and nitrosative stress can play a role in the pathogenesis of WD.

Key words: Thiol, disulfide, nitric oxide, nitrotyrosine, Wilson disease

V. KISALTMALAR

ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alaninaminotransferaz
AST	: Aspartataminotransferaz
ATPaz	: P-tipi Adenozin trifosfataz
BT	: Bilgisayarlı tomografi
Cu	: Bakır
CuZn-SOD	: CuZn-bağımlı süperoksit dismutaz
ER	: Endoplazmik retikulum
GGT	: Gama glutamil transferaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
MDA	: Malondialdehid
MnSOD	: Manganez süperoksit dismutaz
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSS	: Santral sinir sistemi
TAC	: Toplam serum antioksidan kapasitesi
WH	: Wilson hastalığı

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kontrol grubunun ve WH gruplarının demografik ve laboratuvar verileri27

Tablo 2. WH ve kontrol gruplarındaki hastaların dinamik tiyol/disülfid parametreleri28



VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: ATP7B geninin ve karşılık gelen insan ATP7B proteininin Şematik temsili.	5
Şekil 2: İntraselüler bakır trafiği.....	6
Şekil 3. Çalışma grupları arasında doğal tiyol (A), toplam tiyol (B) ve disülfıt seviyelerinin (C) kutu grafikleri.....	29
Şekil 4. Çalışma grupları arasında disülfıt/doğal tiyol (A), disülfıt/toplam tiyol (B) ve doğal tiyol/toplam tiyol oranlarının (C) kutu grafikleri.....	29
Şekil 5. Çalışma grupları arasında nitrik oksit (NO) (A) ve 3-nitrotirozin (3-NT) seviyelerinin (B) kutu grafikleri.....	30

VIII. RESİM LİSTESİ

Resim 1 : Kayser-Fleischer halkası	11
Resim 2. Portal fibrozis,yağlı infiltrasyon	16
Resim 3. Spektrofotometr.....	22
Resim 4. Total tiyol-native tiyol assay	23
Resim 5. NO tayini.....	24



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Wilson hastalığı (WH), ATP7B geninin 13q14.3 kromozomundaki mutasyonların neden olduğu, bakır taşınmasının bozulması ile karakterize olan ve nadir görülen otozomal resessif bir metabolik hastalıktır (1,2). P-tipi Adenozin trifosfataz (ATPaz) bakır taşıyıcısının fonksiyon kaybı, karaciğerde ve daha sonra merkezi sinir sisteminde kronik bakır birikimine neden olur (3). Hastalık dünya çapında 1/30.000-1/50.000 canlı doğum sıklığına sahiptir, ancak bazı popülasyon tabanlı çalışmalarda genetik yaygınlık klinik tabanlı tahminlerden 3-4 kat daha yüksektir (4). WH'nın klinik prezentasyonu oldukça değişkendir ve her yaşta ortaya çıkabilir (5). Aşırı serbest (seruloplazmine bağlı olmayan) bakır birikimi, çoğunlukla hepatik ve santral sinir sistemi (SSS) dokularında sitotoksik etkileri tetikler ve hepatik, nörolojik veya psikiyatrik semptomları içeren tipik klinik fenotiplere yol açar (6). Bununla birlikte, semptomların bazen hastalığın ileri dönemlerinde ortaya çıkması, tanının gecikmesine neden olur (3). Erken ve doğru bir şekilde teşhis konulursa WH başarıyla yönetilebilir; bununla birlikte, tedavi edilmezse, hastalık progressif ve ölümcüldür (4,5). Günümüzde WH tedavisinin temel amacı, bakır aşırı birikiminin azaltılmasına odaklanan ömür boyu farmakolojik tedavidir. Bakır şelasyonu veya bakırın bağırsaktan Emilimi çinko ile engellenebilir (6). WH geri dönüşümsüz karaciğer hasarına ve nöropsikiyatrik semptomlara neden olabileceğinden tedaviye uyum ve rutin takip çok önemlidir (7).

Normalde serbest bakır, seruloplazmin, metallotionin, süperoksit dismutaz (SOD), sitokrom oksidaz, tirozinaz ve dopamin beta-hidroksilaz enzimlerinin içeriğinde yer alır. Fazla serbest bakır glutatyon (GSH), küçük moleküller ve amino asitler tarafından nötralize edilir. Aşırı miktarda serbest bakır toksiktir ve mitokondriyal toksisite, oksidatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi, hücre zarı hasarı, DNA'nın çapraz bağlanması ve enzimlerin inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla hücre hasarına ve inflamasyona neden olabilir (8-10). Bakır aracılı serbest radikal oluşumu, yüksek malondialdehid (MDA) seviyesi ile sonuçlanan lipid peroksidasyonu ve takiben hepatosit mitokondrisinin oksidatif hasarı WH patogenezinde rol oynar (11,12).

WH'nın hepatik prezentasyonu olan hastalarda farklı antioksidan düzeylerinde azalma ve artmış oksidatif stres tanımlanmıştır (13-15). Serbest bakırın kan beyin bariyerini geçmesi sonucu beyin hasarına neden olduğu bilinmektedir (16). Beyin, oksidatif strese karşı daha hassastır ve bu da bilişsel ve motor fonksiyonların bozulması ile sonuçlanır.

Oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres durumunda oluşan oksidan maddeler birçok biyolojik moleküle zarar verir (17). Tiyol grubu içeren bileşikler indirgeyici özellikleri ile oksidatif strese karşı savunmada rol alan önemli organik maddelerdir. Organizmada oluşan reaktif oksijen türleri gibi oksidatif ürünler fazla elektronlarını tiyol içeren bileşiklere aktararak indirgenirken tiyol grupları okside olur (18). Tiyol gruplarının okside olması disülfid bağlarının oluşmasına neden olur. Ancak bu, geri dönüşümlü bir reaksiyondur ve oluşan disülfid bağları tekrar tiyol gruplarına indirgenebilir. Böylece, dinamik tiyol-disülfid homeostazi sağlanmış olur.

Dinamik tiyol-disülfid homeostazi antioksidan savunma, detoksifikasyon, apoptozis, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi ve hücrel sinyal iletiminde kritik rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tiyol-disülfid homeostazının bozulmasının diyabet, diyabetik nefropati, kalp damar hastalıkları, kanser, romatizmal hastalıklar ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir (19-24). Bildiğimiz kadarıyla, WH olan hastalarda dinamik tiyol/disülfid homeostazi ve nitroaktif stresin rolünü gösteren bir çalışma yoktur. Bu nedenle çalışmamızda, tiyol/disülfid homeostazi ve nitroaktif stresin WH'nın patofizyolojisine olası katkılarını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Wilson hastalığı

2.1.1. Epidemiyoloji

Wilson hastalığı (hepatolentikuler dejenerasyon), hepatosellüler bakır taşınmasındaki bir kusurdan kaynaklanır ve karaciğer, beyin de dahil olmak üzere diğer dokularda bakır birikmesine neden olur. Zamanla, bakır birikiminden kaynaklanan hasar Wilson hastalığının hepatik, nörolojik ve psikiyatrik belirtilerine neden olur. Dünya genelinde hastalığın prevalansı 1/30.000, taşıyıcı sıklığı 1/90'dır (25). Wilson hastalığından ATP7B'deki gen mutasyonu sorumludur. Gen sıklığı toplumda %0.3-0.7 arasında değişmektedir (26). ATP7B'deki mutasyonlar, bakırın hücre dışına transportunu düzenleyen membran proteinin fonksiyonunu bozar. Bunun sonucunda bakırın biliyer sisteme atılımı ve seruloplazmin sentezi azalır. Bakır safra ile atılamaz ve karaciğer başta olmak üzere diğer organlarda (beyin, kornea, böbrek) birikir.

2.1.2. Bakır metabolizması

2.1.2.1. Genel bakış

Bakır esansiyel bir element olup, özel kuproproteinler içinde yer alarak elektron transferi reaksiyonlarını kolaylaştırır ve melanin biyosentezi, dopamin metabolizması, mitokondrial respirasyon, demir homeostazi, antioksidan sistemi, bağ dokusu oluşumu ve peptid amidasyonu gibi birçok süreçte kullanılır (27).

Diyetle bakır alımı günlük yaklaşık 1-2 mg arasındadır (28). Bakır, mide ve duodenumdan emilir, esas olarak dolaşımdaki albümine bağlanır ve çeşitli dokular tarafından alınır (29). Bakırın diyetle alınan besin kaynakları karaciğer, böbrek, kabuklu deniz hayvanları, çikolata, kuru fasulye, bezelye, işlenmemiş buğdaydır. Bakır için günlük gereksinim yaklaşık 0.75 mg'dır. Günlük fazla alınan bakır çoğunlukla safra ile barsaklardan atılır, %5-15 kadarı ise böbreklerden atılır (30).

2.1.2.2. Bakır transportu

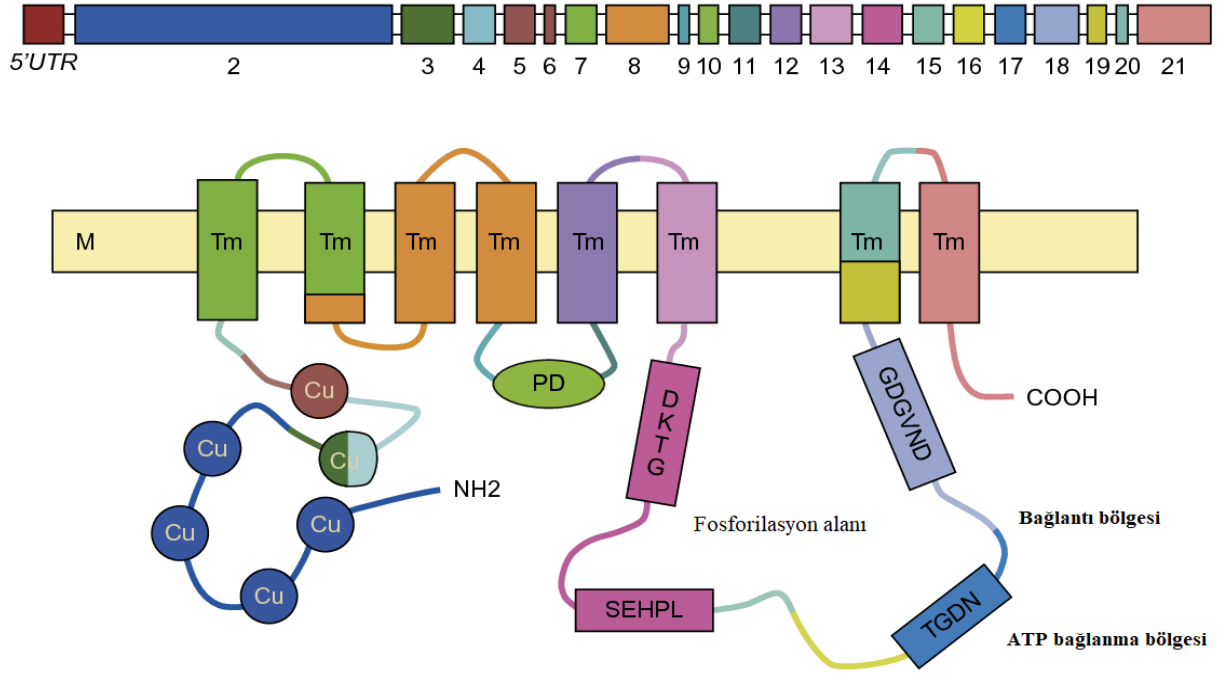
Bakırı hücre içinde taşıyan protein Wilson hastalığında mutasyona uğrayan ATP7B geni tarafından düzenlenir. ATP7b geni esas olarak hepatositler tarafından eksprese edilir ve normal olarak iki alt hücre bölgesinde bulunur: trans-Golgi ağı ve sitoplazmik veziküller (31).

Trans-Golgi ağında ATP7B, altı bakır atomunun aposeruloplazminin (bakır içermeyen seruloplazmin peptidi) içine katılması ve seruloplazmin (bakır içeren holoseruloplazmin) oluşturulması için bakırın taşınmasına aracılık eder. Seruloplazmin daha sonra kan dolaşımına salgılanır. Seruloplazmin içindeki bakır, fizyolojik koşullar altında değiştirilemez (bu moleküldeki bakır, bir "ferroksidaz" olarak demir metabolizmasında çalışması için gereklidir) ve dolaşımdaki bakırın yaklaşık %90'ını oluşturur. Plazmada bulunan bakırın %95'i bir ferroksidaz olan seruloplazmine yerleşir ancak bu enzimin bakır transportunda esansiyel bir görevi yoktur. Sitoplazmik veziküllerde, ATP7B aracılı bakır transporterleri tarafından fazla bakır biriktirilir ve bunlar daha sonra hepatosit apikal kanaliküler membran boyunca ekzositoz yoluyla safraya atılır. Wilson hastalığında, bakırın aposeruloplazmin içine dahil edilmesi ve bakırın karaciğerden safraya taşınması azalmıştır, bu da dolaşımdaki düşük seruloplazmin seviyelerine rağmen dokuda bakır fazlalığına yol açar (32).

2.1.3. Wilson hastalığında genetik defekt

Wilson hastalığı otozomal resessif bir hastalıktır ve bakır taşıma proteinini kodlayan gen olan ATP7B 13. kromozomunda mutasyonun sonucu oluşur. ATP7B, esas olarak karaciğerde eksprese edilen, P-tipi ATPaz'dır, ancak bazı diğer dokularda daha düşük miktarlarda bulunur. ATP7B bakırı N-terminal bölgesinde bağlar ve bir enerji kaynağı olarak ATP kullanarak bakırın transmembran taşınmasından sorumludur (Şekil 1).

ATP7B birçok farklı bölgedeki mutasyonlardan etkilenebilir. Wilson hastalığı olan hastalarda ATP7B geninde 500'den fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır (25). H1069Q mutasyonu, yüzde 10 ila 40'lık bir allel sıklığı ile (Kafkasyalılarda yüzde 30 ila 70 arası) en yaygın mutasyonlardan biridir (33).



Şekil 1: ATP7B geninin ve karşılık gelen insan ATP7B proteininin şematik temsili. Üstteki diyagram 5'UTR promotor bölgesini ve intronlarla ayrılmış ekzonları gösterir. Altteki şema, insan bakır ATPaz'ın alan organizasyonunu göstermektedir. Korunmuş amino asit motifleri, her bir fonksiyonel alanın çekirdek yapısında mevcuttur, yani, A alanında TGDN ve GDGVND, P alanında DKTG ve N alanında SEHPL. M, zarın fosfolipid tabakası; Cu, transmembran katyon kanalının metal bağlama alanları; Tm, transmembran alanları; PD, fosfataz bölgesi.

2.1.4. Patogenez

Bakırın aposeruloplazmin'e dahil edilmesi, bakır komplemanı ile holoproteinden farklı şekilde katlanmasına neden olur. Farklı katlanmış protein, hepatositler tarafından salgılanır, dolaşımda daha kısa bir yarı ömre sahiptir, bu nedenle bu proteinin kararlı hal dolaşım seviyeleri azalır. ATP7b gen mutasyonu olan hastalarda bakır aposeruloplazmin'e dahil edilemez ve hepatositler içerisinde aşırı bakır birikmesine neden olur. Fazla bakır başlangıçta metalotiyonine bağlanır ve sitoplazma boyunca eşit olarak dağıtılır. Progresif bakır birikimi ile metalotiyoninin kapasitesi aşılar ve hepatosit hasarı oluşur (34) (Şekil 2).

2.1.4.2. Hastalığın doğal seyri

Doğumsal bir hastalık olmasına rağmen major organ sistemlerinde bakır birikiminin neden daha geç hastalık tablosuna yol açtığının araştırılmasıyla WH’de ilerlemenin 5 evrede olduğu gösterilmiştir (37):

Evre I’de hepatosit sitozollerinde ilerleyici bakır birikimi oluşmaktadır. Bakır birikimi hepatosit bağlanma noktalarının hepsi doyanadek sürer. Bu süreçte hasta asemptomatiktir ve genellikle 5 yaşın altındadır.

Evre II’de bakır hepatosit içinde sitozollerden lizozomlara dağılır ve aynı zamanda karaciğerden dışarı atılır. Bakırın atılması yavaş olursa hasta yine asemptomatik kalır ancak hızlı olursa karaciğer nekrozu oluşmasıyla hasta karaciğer hastalığı semptomlarını gösterir.

Evre III’de, bakırın lizozomlarda depolanmasına bağlı olarak değişen derecede fibrozis veya siroz gelişir. Bu aşamada bakır; beyin, kornea, böbrek veya iskelet gibi diğer dokularda birikir.

Evre IV’de karaciğer ve beyin gibi organlarda birikim yavaş gerçekleşirse, hasta yıllarca asemptomatik kalabilir. Eğer bakır birikimi hızlı olursa kısa sürede karaciğer hasarı, SSS hastalığı veya ikisi birden oluşur.

Evre V’de; karaciğer yetmezliği veya dönüşümsüz beyin hasarı görülür.

2.1.5. Klinik bulgular

Wilson hastalığının klinik belirtileri ağırlıklı olarak hepatik, nörolojik ve psikiyatriktir, birçok hasta semptom kombinasyonuna sahiptir (38). Hemoliz, akut karaciğer yetmezliği olan hastalarda da yaygın bir bulgudur, ancak bazen karaciğer yetmezliğinden bağımsız olarak epizodik olarak ortaya çıkabilir.

Özellikle nörolojik olmak üzere hastalar çok çeşitli belirtiler ile gelebilir (30). Belirli bir ailede bile hastalık sıklıkla farklı semptomlarla ortaya çıkar (39). Hastaların %18 ila 84’ü karaciğer tutulumu ile, %18 ila 73’ü nörolojik semptomlarla, %10 ile 100’ü psikiyatrik belirtiler ile başvurur. Başlangıçta başvuru klinik belirtiden bağımsız olarak hastalık ilerledikçe diğer belirtiler de ortaya çıkar.

Wilson Hastalığında bakır birikimi doğumdan itibaren başlar ve yaşam boyu devam eder (40). Bakır birikimi bir süre sonra semptom vermeye başlar. Genellikle 5-35 yaş arasında (ortalama 13) tanı konulur (41). Fakat daha erken yaşta yada 70 yaşlarında da tanı konulmuş vakalar bildirilmiştir (42).

2.1.5.1. Hepatik bulgular

Karaciğer, Wilson hastalığı olan hastalarda ilk bakır birikim bölgesidir ve hepatik bakır birikiminin birkaç farklı klinik belirtisi vardır (43). Hepatik bulgular çok çeşitlidir. Asemptomatik biyokimyasal anormallikler ve steatozun yanısıra akut hepatit ve akut karaciğer yetmezliği (Coombs-negatif hemolitik anemi ile ilişkili), kronik hepatit ve sirozu içerir (44).

Hepatik Wilson hastalığı olan hastalarda semptomlar, laboratuvar bulguları ve görüntüleme bulguları karaciğer hasarının derecesine göre değişir (25,38,39). Hepatik Wilson hastalığının belirtileri ve semptomları aşağıdakilerdir:

- Kayser-Fleischer halkaları, hepatik hastalığı olan hastaların %50'sinde görülür (her türlü karaciğer tutulumunda görülür)
- Asemptomatik (steatoz, kronik hepatit, kompanse siroz)
- Karın ağrısı (akut hepatit, akut karaciğer yetmezliği)
- Sarılık (akut hepatit, akut karaciğer yetmezliği, siroz)
- Hepatomegali (akut ve kronik hepatit, akut karaciğer yetmezliği)
- Splenomegali (siroz)
- Asit (siroz)
- Üst gastrointestinal kanama (varisli siroz veya portal hipertansif gastropati)
- Kronik karaciğer hastalığının periferik stigmaları (siroz)
- Hepatik ensefalopati nedeniyle zihinsel durum değişiklikleri (akut karaciğer yetmezliği, siroz)

Hepatik Wilson hastalığının laboratuvar test bulguları:

- Düşük serum seruloplazmin seviyesi (akut karaciğer yetmezliği ile tutarlı olmasa da, her türlü karaciğer tutulumunda görülür)
- Yüksek aminotransferazlar (her türlü karaciğer tutulumu)
- Trombositopeni (splenomegali ile siroz)

- Koagülopati (siroz veya akut karaciğer yetmezliği)
- Coombs-negatif hemolitik anemi (genellikle akut karaciğer yetmezliği ile birlikte görülür, ancak karaciğer yetmezliği olmadan epizodik hemoliz olarak ortaya çıkabilir)

Abdominal görüntüleme bulguları:

- Hepatik steatoz (kronik hepatit)
- Küçük, nodüler bir karaciğer (siroz)
- Splenomegali (siroz)

2.1.5.2. Nörolojik bulguları

Nörolojik Wilson hastalığının teşhisi zordur çünkü hastalar çok çeşitli şekillerde ortaya çıkarlar. Nörolojik bulgulara sahip Wilson hastalığı olan hastaların hemen hemen hepsinde (%98) Kayser-Fleischer halkaları vardır. Nörolojik semptomlar çok hafif olabilir veya hızlı ilerleyici olabilir, bu da aylar içinde ciddi komorbiditelere yol açar (38). Bilinen sirozu olan hastalarda nörolojik bulgular hepatik ensefalopati ile karıştırılabilir.

Sık görülen nörolojik bulguların görülme yüzdeleri:

- Dizartri: nörolojik Wilson hastalığı olan hastalarda %85-97
- Yürüyüş anormallikleri/ataksi: %30-75
- Distoni - %11-69
- Tremor: %22-55
- Parkinsonizm: %19-62

Diğer nörolojik bulgular şunlardır:

- Risus sardonicus
- Kore
- Atetoz
- Bilişsel bozukluk/demans
- Nöbetler
- Hiperrefleksi
- Miyokloni
- İdrar kaçırma
- Otonom işlev bozukluğu

Beynin manyetik rezonans görüntüleme (MRG) veya bilgisayarlı tomografik (BT) taraması, nörolojik Wilson hastalığı olan hastalarda bazal ganglionlarda yapısal anormallikleri gösterebilir (45). Bazal ganglion bölgelerinde sık rastlanan bulgular, BT taramasında dansite artışı ve MRG görüntülerinde T2 ağırlıklı hiperintensitedir. Diğer bulgular, tektal-plak ve santral ponstaki hiperintensiteleri içerir. Bazal ganglionlar, talamus ve beyin sapının eşzamanlı tutulumu Wilson hastalığını akla getirmelidir (46).

Nörolojik Wilson hastalığı olan hastalarda beyin omurilik sıvısı (BOS) bakır konsantrasyonları, Wilson hastalığı olmayan veya nörolojik belirtileri olmayan WH olan hastalara göre üç ila dört kat artmıştır (47). Bu değerler tedaviyle düşer, ancak Kayser-Fleischer halkalarının kademeli olarak ortadan kalkması, merkezi sinir sistemindeki bakırın dağılımını gösterdiğinden, klinik amaçlar için tipik olarak izlenmez (48).

2.1.5.3. Davranışsal ve psikiyatrik belirtiler

Davranışsal ve psikiyatrik belirtiler, nörolojik tutulumlu hastalarda hepatik tutulumlu hastalardan daha yaygındır (49,50). Bununla birlikte, psikiyatrik belirtiler hepatik veya nörolojik Wilson hastalığının semptomlarının tanınmasından önce de görülebilir. En sık görülen davranışsal ve psikiyatrik belirtiler depresyon (%20-30) kişilik değişikliği, uyumsuz davranış ve sinirliliktir (50). Bununla birlikte, Wilson hastalığına bağlı davranışsal ve psikiyatrik belirtiler sıklıkla yanlış teşhis edilebilir (örn. ergenliğe atfedilebilir). Sonuç olarak, tek belirtiler davranışsal veya psikiyatrik olduğunda Wilson hastalığı tanısı konan hastalar için nadirdir ve bu kişilerde tanı önemli ölçüde gecikebilir.

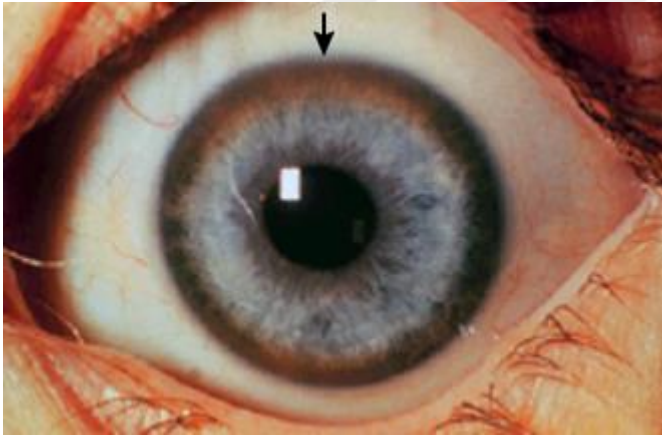
Wilson hastalığının davranışsal ve psikiyatrik belirtileri arasında (51):

- Depresyon
- Okul performansında düşüş
- Kişilik değişiklikleri (hafif olabilir)
- Sinirlilik
- Dürtüsellik
- Değişken ruh hali
- Cinsel teşhircilik
- Uygunsuz davranış
- Distimi

- Bipolar afektif bozukluk
- Psikoz

2.1.5.4. Oküler bulgular

Kayser-Fleischer halkaları, korneadaki descement membranında ince, pigmentli, granül bakır birikintilerine bağlı kahverengi halkalardır (Resim 1). Kayser-Fleischer halkalarının, SSS içindeki bakırı yansıttığı düşünülür. Kayser-Fleischer halkaları, Wilson hastalığının karakteristik bir özelliğidir ve nörolojik belirtileri olan hastaların yaklaşık %98'inde ve hepatik belirtileri olan hastaların yaklaşık %50'sinde görülür. Genellikle sadece slit lamba muayenesi ile tespit edilmekle birlikte, özellikle oldukça açık renkli irisi olanlarda, oldukça büyük olduklarında, slit lamba muayenesi olmadan bazen görülebilir. Ancak, Kayser-Fleischer halkaları nadiren Wilson hastalığı olan bir hastada ilk bulgudur.



Resim 1 : Kayser-Fleischer halkası

2.1.5.5. Diğer belirtiler

Wilson hastalığı, diğer organlarda bakır birikimi ile ilgili anormalliklere neden olabilir. Wilson hastalığının az görülen diğer belirtileri arasında (52-54):

- Proksimal renal tübüler disfonksiyonun glukozüri, aminoasidüri, hipoürisemi ve proksimal renal tübüler asidoza yol açtığı Fanconi sendromu
- Distal renal tübüler asidozise sekonder nefrolitiazis
- Erken artrit ve bazen de kondokalsinozis özelliklerine sahip artropati (genellikle dizde)
- Gigantizm

- Kardiyomiyopati
- Miyopati
- Hipoparatiroidizm
- Pankreatit
- Eretil disfonksiyon
- İnfertilite ve tekrarlayan düşükler
- Çeşitli dermatolojik bozukluklar (lunulae ceruleae, akontozis nigrigans, pretibial hiperpigmentasyon vb.)

2.1.6. Tanı

Almanya'nın Leipzig şehrinde düzenlenen uluslararası bir toplantıda Wilson hastalığı teşhisi için tanı kriterleri geliştirilmiştir (55). Bu puanlama sistemine göre aşağıdakilerden herhangi biri mevcutsa hastalara puan verilir:

- Kayser-Fleischer halkası (2 puan)
- Wilson hastalığını düşündüren nöropsikiatrik belirtiler (2 puan)
- Yüksek serum bakır düzeyi ile beraber Coombs-negatif hemolitik anemi (1 puan)
- Rodanin pozitif hepatositler (1 puan)
- Mutasyon analizi:
 - Her iki kromozomda hastalığa neden olan mutasyonlar (4 puan)
 - Tek kromozomda hastalığa neden olan mutasyonlar (1 puan)
 - Hastalığa neden olan mutasyonun olmaması (0 puan)
- Serum seruloplazmin:
 - Normal (0 puan)
 - 10-20 mg/dL (1 puan)
 - <10 mg/dL (2 puan)
- Üriner bakır düzeyi:
 - normalin üst sınırının (NÜS) bir ile iki katı (1 puan)
 - NÜS'nin 2 katından yüksek (2 puan)
 - normal, ancak 2 doz 0.5 mg d-penisilamin sonrası NÜS'nin 5 katından yüksek olursa (2 puan)
- Karaciğer bakırının kantitatif değerlendirilmesi:
 - normal: (-1 puan)

- NÜS'nin 5 katına kadar (1 puan)
- NÜS'nin 5 katından yüksek (2 puan)

Skorun ≥ 4 olması Wilson hastalığını düşündürür, skorun 3 olması ancak daha fazla araştırma yapılması gerektirir, skorun ≤ 2 olması ise, Wilson hastalığını dışlar.

2.1.6.1. Serum serüloplazmin konsantrasyonu

Wilson hastalığı olan hastaların yaklaşık %85 ila 90'ında serum serüloplazmin düzeyi düşüktür (<20 mg/dL veya 200 mg/L). Kayser-Fleischer halkaları da olan bir hastada normal laboratuvar değerinin alt sınırından daha düşük bir serum serüloplazmin konsantrasyonu, Wilson hastalığı için tanısal olarak kabul edilir (56). Bununla birlikte, Wilson hastalığı olmayan hastalarda düşük serüloplazmin seviyeleri görülebilir ve Wilson hastalığı olan hastalarda normal veya yüksek serüloplazmin düzeyleri görülebilir.

Serum serüloplazmininin normal değerleri yaşa göre değişmektedir. Erken bebeklik döneminde yaklaşık altı ay boyunca çok düşüktür, daha sonra erken çocukluk döneminde en yüksek seviyeye ulaşır (yaklaşık 30 ila 50 mg/dL) ve daha sonra yetişkin aralığına düşebilir (20 ila 35 mg/dL). Serüloplazmin östrojen duyarlıdır ve hamilelikte ve hormonal takviye alan hastalarda seviyeler yüksek olur. Aynı zamanda serüloplazmin bir akut faz reaktanıdır ve inflamatuvar durumlar sonucu bazal seviyelerin üzerine çıkabilir.

Serum serüloplazmin, WH olmayan hastalarda düşük olabilir ve WH olan hastalarda normal veya yüksek olabilir (43). Sonuç olarak, düşük bir serüloplazmin seviyesi, Wilson hastalığının teşhisi için yeterli değildir ve normal bir seviye, Wilson hastalığını ekarte etmez. Tek başına serum serüloplazmin, karaciğer hastalığı için değerlendirme yapılan hastalarda düşük pozitif prediktif değere sahiptir.

2.1.6.2. Serum Bakır Konsantrasyonu

Wilson hastalığında, serum bakır konsantrasyonu, bakır yükselmesine rağmen serum serüloplazminindeki azalma ile doğru orantılı olarak azalır. İstisna olarak Wilson hastalığına bağlı akut karaciğer yetmezliğinde serum bakır konsantrasyonları artar. Serum non-serüloplazmin bağlı bakır konsantrasyonunun belirlenmesi Wilson hastalığı için tanısal bir test olarak önerilmiş fakat duyarlılığı ve özgüllüğü henüz kanıtlanamamıştır (57).

Non-serüloplazmin bakırını belirlemek için doğrudan bir yöntem ticari olarak temin edilebilir, ancak büyük popülasyon çalışmalarında doğrulanmamıştır (58).

2.1.6.3. Oküler Slit-Lamba İncelemesi

Wilson hastalığından şüphelenilen hastalara, Kayser-Fleischer halkalarının ve Wilson hastalığına ilişkin diğer oküler bulguların tesbiti için oküler slit-lamba muayenesi yapılmalıdır.

Kayser-Fleischer halkaları - Kayser-Fleischer halkaları, izole hepatik Wilson hastalığı olan hastaların %50 ila 60'ında ve klinik nörolojik tutulumu olan hastaların %90'ında görülür (59). Akut karaciğer yetmezliği ile başvuru esnasında Kayser-Fleischer halkaları hastaların yaklaşık yarısında bulunur. Kayser-Fleischer halkaları, desement membranın endotel yüzeyine yakın korneadaki ince pigmentli granül bakır birikintilerinden kaynaklanan kahverengimsi veya gri-yeşil halkalardır. Bakır, öncelikle halkaya rengini veren, kükürt içeren granül bir kompleks içinde biriktirilir. Genellikle, en çok korneanın alt ve üst kutuplarında belirgindirler. Kayser-Fleischer halkaları Wilson hastalığını yüksek oranda düşündürürken, Wilson hastalığına özgü değildir. Primer biliyer siroz gibi diğer kronik kolestatik hastalıklarda ve neonatal kolestazlı çocuklarda nadir olarak bildirilmiştir (60).

Kayser-Fleischer halkaları, WH için etkili tıbbi tedavi ile veya karaciğer nakli sonrası yavaş yavaş kaybolur. Yeniden ortaya çıkması, tedaviye uyumsuzluğa işaret eder.

Ayçiçeği kataraktları - Ayçiçeği kataraktları (lensteki bakır birikimlerini temsil eder) Wilson hastalığı olan hastalarda oküler slit-lamba incelemesi ile de görülebilir. Wilson hastalığında prevelansı bilinmemekle birlikte Kayser-Fleischer halkası gibi etkili tedavi ile kaybolur (61,62).

2.1.6.4. Üriner Bakır Atılımı

İdrar bakır atılımı, Wilson hastalığının teşhisi ve tedavinin izlenmesi için kullanılır. Wilson hastalığında tipik olarak 24 saatlik idrar bakır atılımı 100 mcg (>1.6 mikromol) üzerindedir, ancak asemptomatik tanı konulmuş Wilson hastalarının %25'inde daha düşük değerler de bulunabilir (63).

İdrar bakır atılımı için normal değerler laboratuvarlar arasında değişmekle birlikte, 30 ila 40 mcg/gün (0.48-0.64 mikromol/gün) arasındadır (64). 40 mcg/gün (0.64 mikromol/gün) üzeri değer daha fazla araştırma yapılmasını gerektirir (65).

İdrar toplama kaplarına bakır bulaşmasını önlemek için özen gösterilmelidir. Kap, damıtılmış suyla durulanmalı veya yeni, tek kullanımlık bir kap kullanılmalıdır. Analizden önce, bazı laboratuvarlar, idrar alkali olduğunda ve yanlılıkla düşük idrar bakır konsantrasyonları ile sonuçlanabilecek olan bakır hidroksitin çökmesini önlemek için idrara az miktarda hidroklorik asit (30 mL 6N çözeltisi) ekler. Nötr pH veya asidik idrar bulunan çoğu hastada, bu gerekli değildir.

Toplamanın bütünlüğünü değerlendirmek için idrar kreatinin atılımı ölçülebilir. 24 saatlik idrar kreatinin atılımı, 15 ila 20 mg/kg arasında olmalıdır. Bu tahminin esas olarak üstünde veya altında olan değerler, sırasıyla, fazla ve az toplama yapıldığını gösterir. Test böbrek yetmezliği olan hastalarda kullanılmamalıdır. Ek olarak, spot idrar koleksiyonları oldukça değişkendir ve Wilson hastalığının teşhisi için güvenilir değildir.

2.1.6.5. D-Penisilamin yükleme testi

Çeşitli karaciğer hastalıklarında da idrar bakır atılımının artmasından kaynaklı 24 saatlik üriner bakır ölçümü için idrar toplama esnasında üriner bakır ölçüm testinin duyarlılığını ve özgüllüğünü arttırmak için penisilamin yükleme testi yapılabilir. Penisilamin yükleme testi nadiren kullanılır çünkü asemptomatik kardeşlerde Wilson hastalığını dışlamak için güvenilir değildir ve yetişkinlerde iyi bir şekilde standartize edilmemiştir (66,67)

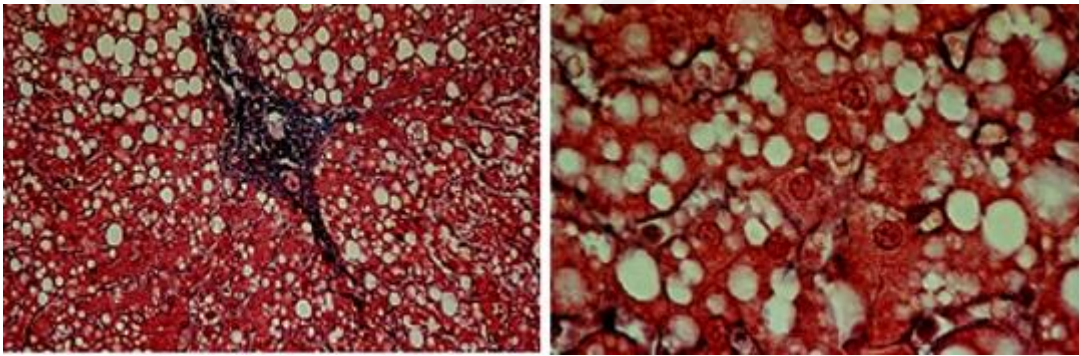
Penisilamin idrar toplamaya başlamadan önce 500 mg dozunda verilir ve 12 saat sonra tekrarlanır. Toplanan 24 saatlik idrar bakırı 1600 mcg'dan fazla ise Wilson hastalığı lehinedir.

2.1.6.6. Karaciğer biyopsisi

Serum seruloplazmin düzeyleri, Kayser-Fleischer halkaları ve yüksek idrar bakır atılımına sahip hastalarda Wilson hastalığı teşhisi konulurken, belirsiz sonuçlara sahip hastalarda ek testler gerekir. Tipik olarak, bir sonraki aşama, anormal karaciğer fonksiyon testleri olan ve Wilson Hastalığından şüphelenilen hastalarda hepatik bakır konsantrasyonunu belirlemek ve WH düşündüren histolojik değişiklikleri aramak için karaciğer biyopsisidir. WH olduğundan şüphelenilen hastalarda karaciğer biyopsisi, histoloji için bir biyopsi örneği ve en az 1 cm

uzunluğunda bakır ölçümü için bir biyopsi örneği içermelidir. Bakır miktar tayini için numune kuru, bakır içermeyen bir kaba yerleştirilmelidir (38).

Hepatik bakır konsantrasyonunun kuru ağırlığın gram gramı başına 250 mcg'den (4 mikromol) fazla olması Wilson hastalığını düşündürür, <50 mcg (0.8 mikromol) olması ise hastalığı ekarte eder. Karaciğer bakır konsantrasyonu 50 ila 250 mcg/g kuru ağırlık arasında ise ve özellikle histoloji aktif karaciğer hastalığını gösteriyorsa tanı için ATP7B mutasyonları açısından moleküler genetik test gereklidir (69,70). Histolojik değerlendirmede, Wilson hastalığının erken dönemlerinde hepatositlerde yağlı infiltrasyon, nükleusta glikojen depoları ve portal alanda fibrozis görülebilir (Resim 2).



Resim 2. Portal fibrozis,yağlı infiltrasyon

2.1.6.7. Genetik test

Wilson hastalığı için genetik test, teşhis testi olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Kapsamlı testlere rağmen, karaciğer biyopsisi mümkün olmadığında ve probanddaki mutasyonlar bilindiğinde aile üyelerinin taranması için tanı özellikle yararlıdır. Ek olarak, genetik testler Wilson hastalığı olan hastaların kardeşlerinin taranması için ilk test olarak kullanılabilir.

Baskın mutasyon sıklığının daha yüksek olduğu popülasyonlarda, ATP7B'deki spesifik mutasyonlar allele özgü proplar kullanılarak Wilson hastalığının teşhisi için bir seçenek olabilir. Çoğu hasta bileşik heterozigot olduğundan, bir mutasyonun tanımlanması tanıyı destekler ve iki mutasyonun tanımlanması tanıyı doğrular. Baskın mutasyonlar, Sardunya, İzlanda, Kore, Japonya, Kanarya Adaları ve bazı Doğu Avrupa popülasyonları gibi çeşitli coğrafi bölgelerde tanımlanmıştır (70,71). Tam gen dizilimi ile yapılan mutasyon

analizi, ATP7B'deki mutasyonları tanımlamak için başka bir seçenektir ve ticari olarak temin edilebilir (72).

2.1.6.8. Beyin görüntüleme testleri

MRG sıklıkla nöropsikiyatrik tutulumlu hastalarda anormallikleri gösterir, ancak yalnızca hepatik tutulumlu hastalığı olanlarda normal olabilir. Wilson hastalığı için beyin MRG bulguları bazal ganglionlarda, beyin sapında ve beyaz maddede anormal T-2 sinyal artışıdır.

2.1.7. Tedavi

2.1.7.1. Farmakolojik tedavi

Wilson hastalığı olan hastalarda öncelikle aşırı bakır yükünü tedavi etmeyi amaçlayan yaşam boyu tedavi gereklidir ve tedavi iki aşamada düşünülmelidir: dokularda bakır birikiminin azaltılması veya detoksifikasyonu ve birikimin önlenmesi. Bakır birikiminin azaltılması ve önlenmesi güçlü ekstratörlerin uygulanması ile sağlanır. Genellikle ilk tercih edilen ajan D-penisilamindir. Bununla birlikte, hastaların yaklaşık %30'u yan etkiler nedeniyle bu tedaviyi tolere edemez, ayrıca nörolojik semptomları olan hastalarda semptomları arttırabilir. Trientin geleneksel olarak D-penisilamin intoleransı olanlar için ikinci basamak bir ajan olarak kullanılmıştır, ancak primer tedavi için de makul bir seçenektir ve düşük yan etki insidansı nedeniyle tercih edilebilir. Bu ajanları birbirleriyle karşılaştıran kontrollü bir çalışma yoktur ve bu nedenle kullanım önerileri esas olarak gözlemsel verilere ve klinik deneyime dayanmaktadır (73).

Bakırın yeniden birikmesinin önlenmesi için ekstratörler ile birlikte çinko tuzları kullanılabilir. Oral çinko, enterik hücrelerde endojen ekstratör olan metallothioneini arttırarak bakır emilimini engeller (74).

Yeni bir ekstratör ajan olan amonyum tetratiyomolibdat, yemeklerle birlikte verildiğinde bakır emilimini engeller ve plazma bakırını bağlar (75). Nörolojik hastalığı olan hastalar için daha etkili bir tedavi olarak önerilmiştir (76). Trientin ile karşılaştırıldığı kontrollü bir çalışmada, nörolojik tutulum riskini azaltabileceği öne sürülmüştür (76). Henüz ticari olarak mevcut değildir, ancak yeni tanı konmuş hastalar için stabilize bir tetratiyomolibdat formu kullanılan yeni bir faz 2 klinik çalışma başlatılmıştır (77).

Gastrointestinal sistemde bakırı bağlayan potasyum sülfid ve karbakrilamin reçineleri gibi diğer ilaçlar önerilmez. Wilson hastalığını başarıyla tedavi eden ilk ilaç olan dimerkaprol, ağrılı ve lokal steril apselere yol açan 2 ila 3 mL'lik kas içi enjeksiyon gerektirdiğinden nadiren kullanılır (74).

İyi tedavi edilmiş ancak tedaviyi bırakmış olan hastalarda yeni nörolojik anormallikler veya tedaviye dirençli ve karaciğer transplantasyonu gerektiren hızla ilerleyen hepatik dekompanseasyon gelişebilir. Tedavinin izlenmesi, tıbbi tedavinin uyumsuzluğunu veya başarısızlığını tespit etmek için önemlidir (78).

Wilson hastalığı olan hastalar için tedavinin diğer yönleri, portal hipertansiyon komplikasyonlarının farmakolojik veya girişimsel tedavisini ve varsa hepatik ensefalopati tedavisini içerir. Titreme veya parkinsonizm gibi nörolojik semptomların ve psikiyatrik semptomların ek tedavisi, hastaların yaşam kalitesini artırabilir ve dikkate alınmalıdır (79).

2.1.7.2. Diyet önerileri

Tedavinin ilk aşamasında, hastalar, özellikle kabuklu deniz ürünleri, fındık, çikolata, mantar ve organ etleri olmak üzere yüksek bakır içeriğine sahip yiyecekleri tüketmekten kaçınılmalıdır (80). Tedavi devam ettikten ve hastalar iyi olduktan sonra, ılımlı bakır alımı kabul edilebilir. Wilson hastalığı için tek tedavi olarak diyet kısıtlaması yetersizdir. Kuyulardan elde edilen içme suyunun bakır içeriği açısından test edilmesi veya eser elementleri kaldıran uygun filtrelerin kullanılması akıllıca olabilir. Evde bakır boru bulunan hastalara, pişirme veya tüketim için su kullanmadan önce sistemi yıkaması tavsiye edilmelidir.

2.1.7.3. Akut karaciğer yetmezliği

Wilson hastalığına bağlı akut karaciğer yetmezliği olan hastalarda, diğer nedenler ekarte edilmelidir, çünkü Wilson hastalığı olan hastalarda terapötik yaklaşım farklıdır. Akut karaciğer yetmezliğinin Wilson hastalığına bağlı olduğunu gösteren laboratuvar testleri şunlardır: (81)

- Aspartat aminotransferaz (AST) / Alanin aminotransferaz (ALT) oranı > 2.2
- Alkalen fosfataz (ALP) / bilirubin oranı <4
- Coombs negatif hemolitik anemi
- Yüksek serum bakır düzeyi (>200 mcg/dL)

Bu durumda acil karaciğer nakli erken düşünölmeli ve hastalar acil olarak nakil merkezine yönlendirilmelidir.

İlk olarak, bakırın hızlı bir şekilde uzaklaştırılması amaçlamalıdır. Bakır uzaklaştırmak için hemodiyaliz, periton diyalizi ve hemofiltrasyon kullanılmıştır (82). Ek olarak, plazmaferez veya taze donmuş plazma replasmanı ile plazma değişimi bir seçenektir, çünkü kısa sürede nispeten büyük miktarlarda bakır uzaklaştırılabilir (83). Bu hastaların çoğunda hemolitik anemi de vardır. Bakır iyonları nekrotik hepatositlerden dolaşıma sızar ve kırmızı kan hücrelerinin parçalanmasına neden olur (83).

2.1.7.4. Karaciğer nakli

Akut karaciğer yetmezliği olan ve ilaç tedavisine yanıt vermeyen dekompanse karaciğer hastalığı olan hastalarda karaciğer nakli tek seçenek olabilir (84). İleri karaciğer hastalığı olanlar prognostik skora sistemi Kings College'da bir grup tarafından önerilmiş ve daha sonra gözden geçirilmiştir (85). Gözden geçirilmiş sistem (serum bilirubin düzeyine, protrombin zamanı uluslararası normalize oranına (INR), AST seviyesi ve beyaz kan hücresi sayımına dayanarak) karaciğer transplantasyonu ihtiyacını belirlemek için bir duyarlılık, özgüllük ve pozitif prediktif değere sahiptir. Sırasıyla %93, 98 ve 88'dir (85). Bu puanlama sistemi pediatrik ve yetişkin hastalarda onaylanmıştır.

2.1.8. Prognoz

Wilson hastalığı olan hastalarda, ilerlemiş hastalığı olan ve hızla ilerleyen karaciğer yetmezliği ve hemolizle başvuranlar dışında prognoz mükemmeldir. Nörolojik, psikiyatrik ve hepatik anormallikler tedavi ile yavaş yavaş iyileşir ve karaciğer biyokimyasal testleri genellikle normale döner (86).

2.2. Tiyol-disülfid homeostazı

Plazma tiyolleri, bir sülfhidril grubu içeren organosülfür bileşikleri sınıfıdır. Plazma tiyol havuzu esas olarak albümin tiyolleri ve protein tiyolleri tarafından oluşturulur (87). Oksidatif koşullar altında, tiyoller, disülfidleri oluşturmak üzere oksidasyona uğrarlar. Bu reaksiyon, oksidatif strese karşı en önemli birincil savunma mekanizmalarından biridir. Bu şekilde oluşan disülfür bağları tekrar tiyol gruplarına indirgenebilir. Bu tiyol-disülfür dönüşüm, in vitro olarak sıkı bir şekilde kontrol edilir ve dinamik tiyol-disülfid homeostazını korur. Aslında, tiyol-disülfid homeostazının hücre içi redoks homeostazının birincil regülatörü

olduğu düşünülmektedir ve bu reaksiyonlar antioksidan savunma, hücre sinyalizasyonunun redoks regülasyonu ve apoptoz için özel önem taşımaktadır (88,89).

2.3. Nitrozatif stres

Nitrozatif stres terimi, adını biyomoleküllerin uğradığı nitrozasyon tepkimelerinden alır. Nitrozasyon, reaktif nitrojen oksit türleri tarafından nükleofil bir gruba nitrozonyum (NO^+) grubunun aktarılmasıyla nitrozil türevinin oluşturulmasıdır (90). NO, oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamlarda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur. NO L-arginin'den NOS enzimi aracılığı ile üretilen endojen bir gazdır. NOS enziminin vücudumuzda 3 farklı izoformu bulunmaktadır:

- nöronal NOS (nNOS veya Tip 1)
- indüklenebilen NOS (iNOS veya tip 2)
- endotelial NOS (eNOS veya tip 3)

Beynin farklı bölgelerinden olmak üzere bu NOS'un 3 izoformu da eksprese edilir (91). NO'nun rol aldığı biyokimyasal reaksiyonların fizyolojik önemi vardır. NO beyinde nörotransmitter görevi yanı sıra, nöronların gelişimi, sinaptik plastisite, gen ekspresyonunun modülasyonunda, seksüel ve agresif davranışlarda, öğrenmede, ağrı algısında ve depresyonda görev almaktadır (92).

Nitrik oksidin süperoksit ile tepkimesi sonucu oluşan peroksinitrit (OONO^-) önemli bir biyolojik oksidandır. Peroksinitrit oluşumu NO ve süperoksitin konsantrasyonları arttığında veya süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin düşük olduğu durumlarda ortaya çıkar. Peroksinitrit (ONOO^-) nitrik oksite göre oksidatif olarak daha fazla aktiftir ve DNA kırıklarına, lipid oksidasyonuna, aminoasitlerin nitrozilasyonuna neden olur. NO toksisitesinin başlıca sorumlusu olan peroksinitrit proteinlere doğrudan zarar verir ve azot dioksit, hidroksil radikali gibi toksik ürünlere dönüşür (93).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma popülasyonları

Hepatoloji polikliniğimizde takipli 3592 hasta arasında 79 Wilson hastası bulunmaktadır. Bu prospektif çalışmaya, Nisan 2019-Nisan 2020 yılları arasında, Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Bölümünde takip edilen, ilaç tedavisi altında olan veya yeni tanı alan toplam 50 WH hastaları dahil edildi. Bu hastalardan 42'si ilaç tedavisi altında olan WH grubuna, 8'i ise yeni tanı WH grubuna dahildi. Kontrol grubuna ise yaş ve cinsiyet uyumlu olan, ailede WH öyküsü olmayan ve karaciğer, nörolojik, psikiyatrik, kronik inflamatuvar, genetik veya enfeksiyöz hastalık tanısı olmayan 50 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Kontrol grubu hastane personelinden ve ailelerinden alınmıştır.

WH tanısı Leipzig tanı kriterlerine dayanarak konuldu. Bu puanlama sistemine göre skoru 4 ve üzerinde olan hastalar WH olarak kabul edildi. Tanıda ön planda karaciğer fonksiyon testleri yüksekliği ve serum seruloplazmin konsantrasyonu düşüklüğü olan hastalardan 24 saatlik idrarda bakır atılımı testi istendi. Hastalar Kayser-Fleischer halkasının varlığı açısından Göz hastalıkları bölümüne konsülte edildi. Tüm hastalar Leipzig tanı kriterlerini karşılıyordu ve hepsi semptomatikti. Hastalar WH'nin nörolojik veya hepatik formuna sahip olarak sınıflandırıldı. Nöropsikiyatrik form tanı anında nörolojik ve/veya psikiyatrik semptomların varlığı ile tanımlandı. Hepatik form, karaciğer hastalığının varlığı ve teşhis sırasında ayrıntılı bir nörolojik muayene sırasında herhangi bir nörolojik semptomun olmaması olarak tanımlandı. WH'nin nöropsikiyatrik belirtisi olan tüm hastalara nörolojik ve beyin MRG muayeneleri yapıldı. Beyin MRG, 1.5-TMR GE tarayıcı (Philips, Gyroscan Intera, Best, Hollanda) kullanılarak yapıldı ve T1, T2 ve FLAIR görüntüleri elde edildi. Anormal sinyal yoğunluğu ve konumları not edildi. Tüm deneklere Kayser-Fleischer halkasının varlığı için bir lamba incelemesi yapıldı. Konjenital anomaliler, enfeksiyon, metabolik veya genetik hastalık öyküsü olan, vitamin içeren ilaçlar alan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Çalışma Gaziantep Üniversitesi Etik Kurulu (referans no: 2019/121) tarafından gözden geçirilmiş ve onaylanmış olup, Helsinki Bildirgesi'nde yer alan yönergelere uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm yetişkin hastalar ve gönüllülerden bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Çocuklarda ebeveynlerinden onam alınmıştır.

WH hastalarımız üç farklı tedavi altındaydı; D-penisilamin, çinko ve trientin. Günde 900-1500 mg D-penisilamin ile tedavi altında olan hastalar. Çinko günde 3 kez 50 mg çinko sülfat formunda (150 mg/gün) verilenler. Trientin günde 3 kez 250 mg (750 mg/gün) alan hastalar.

3.2. Kan örnekleri

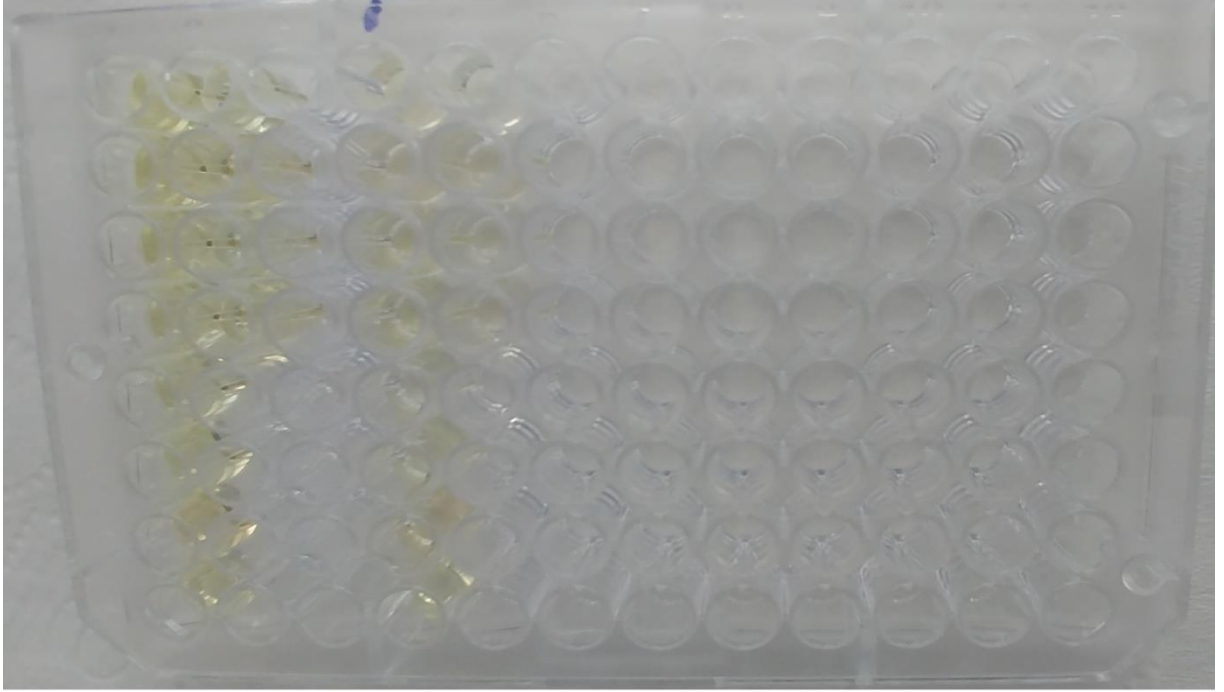
Hastalardan ve kontrollerden sabah aç karnına kan örnekleri alındı. Laboratuvar analizleri kan alındıktan sonraki 30 dakika içinde yapıldı. Tiyol/disülfid, nitrik oksit (NO), 3-nitrotirozin analizleri için venöz kan örnekleri EDTA içeren tüplere çekildi, pıhtılaşma için 20 dakika süreyle saklandı ve serumları 10 dakika 1500 devirde soğuk 4°C'de santrifüj ile ayrıldı, düz tüpler içine yerleştirildi ve daha sonra analize kadar -80°C'de saklandı.

3.2.1. Tiyol-Disülfid Parametrelerinin Ölçümü

Serum doğal tiyol ($-SH$) ve toplam tiyol ($-SH + -S - S-$) seviyeleri, piyasada bulunan kitler (Rel Assay Diagnostics, Mega Tip Ltd, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Erel ve Neselioğlu tarafından geliştirilen bu spektrofotometrik yöntemler, bir mikropate okuyucuda (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Winooski, VT, ABD) analiz edilmiştir (94) (Resim 3,4). İndirgenabilir disülfür bağları ilk önce serbest biçimli fonksiyonel tiyol gruplarına indirgendi. Kullanılmayan indirgeyici sodyum borohidrit formaldehit ile çıkarıldı ve indirgenmiş ve doğal tiyoller dahil olmak üzere tüm tiyol grupları, 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzoik) asit ile reaksiyona sokulduktan sonra ölçüldü. Toplam ve doğal tiyoller arasındaki farkın yarısı, dinamik disülfid ($-S - S-$) içeriğini verdi.



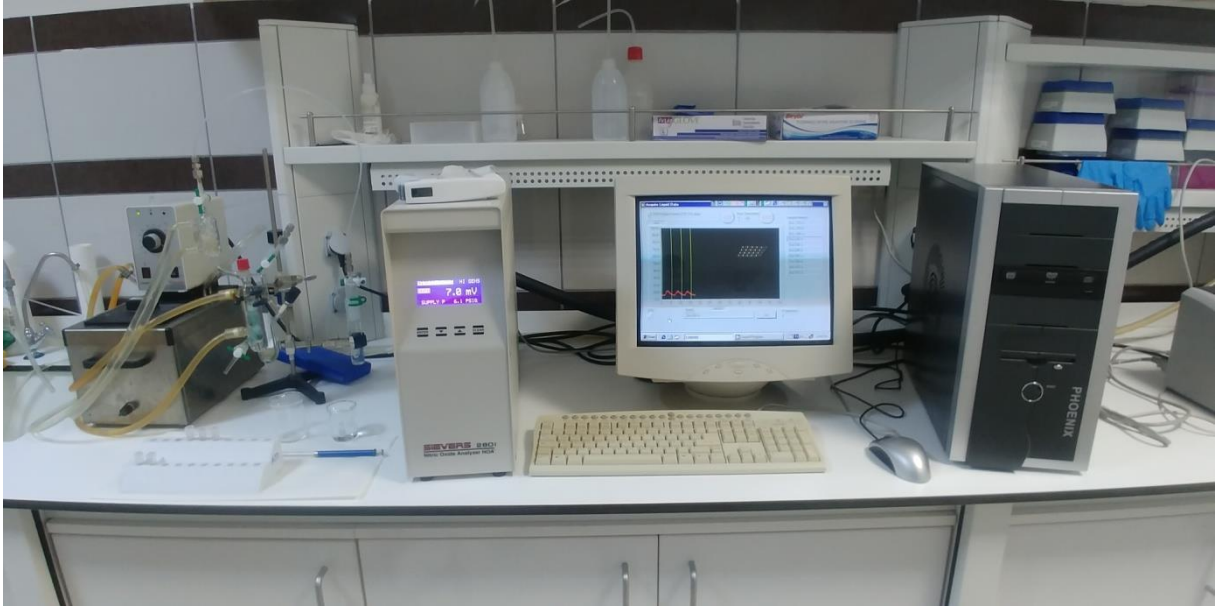
Resim 3. Spektrofotometre



Resim 4. Total tiyol-native tiyol assay

3.2.2. NO analizi

Serum NO daha önce tarif edildiği gibi ölçüldü (95). Çalışmamızda kullanılan teknik (NO/ozon kemilüminesans), nitrat/nitriti NO'ya geri dönüştürür ve NO seviyesini gaz formunda ölçer. Serum numuneleri 1: 2 v/v karışımında 0°C'de mutlak etanol ile deproteinize edildi, 0°C'de 30 dakika inkübe edildi, ardından 5 dakika 14,000 rpm'de santrifüjlendi. Peletler atıldı ve süpernatant, NO/ozon kemilüminesans tekniği (Model 280i NOA, Sievers Instruments, Boulder, CO, ABD) ile NO seviyelerini ölçmek için kullanıldı. Numuneler ve standartlar, nitrit, nitrat ve S-nitrozo bileşiklerini NO'ya dönüştüren indirgeyici ajan (95°C'de 1 M HCl içerisinde çözündürülmüş vanadyum III klorür) ile reaksiyona sokmak için temizleme kabına enjekte edildi. Reaksiyon kabından elde edilen NO, saf azot altında ölçüldü. Numunenin NO konsantrasyonu, standart eğri (sodyum nitrat ile elde edilmiştir) ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Veriler NOAnalysis™ yazılımı (sürüm 3.21, Sievers, Boulder, CO, ABD) ile değerlendirildi (Resim 5).



Resim 5. NO tayini

3.4. 3-Nitrotirozin ölçümü

Serum 3-NT seviyeleri, üretici tarafından belirtilen prosedüre göre ticari olarak temin edilebilen bir ELISA kiti (Kat.No. CK-bio-10045, Coon Koon Biotech Co. Ltd., Şangay, Çin) kullanılarak ölçüldü. Plate, bir mikropate okuyucu (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Winooski, VT, ABD) kullanılarak 450 nm'lik bir absorbansta okundu.

3.5. Diğer biyokimyasal analizler

Diğer tüm biyokimyasal testler ticari kitler kullanılarak bir otoanalizörde (Roche Hitachi Modular DP Systems, Mannheim, Almanya) gerçekleştirildi. Hematolojik indeksler, otomatik bir hematoloji analiz sistemi (Beckman Coulter LH 780 Hematoloji Analiz Cihazı, Beckman Coulter, Brea, CA, ABD) kullanılarak ölçüldü. Bakır ölçümleri atomik absorpsiyon spektrofotometre (Shimadzu AA-680, Kyoto, Japonya) kullanılarak yapıldı.

3.6. İstatistik

Grupların standart sapmalarının eşit olup olmadığını belirlemek için Bartlett testi kullanıldı. Ayrıca, analiz edilen sürekli değişkenlerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak belirlendi. Veriler normal olarak dağıtıldığında ortalama $\pm$ standart sapma veya değişkenler normal olarak dağıtılmadıysa medyan ve çeyrekler arası aralık olarak sunuldu. Nitel veriler, yüzdelik oranlar olarak gösterilmiştir. Anormal dağılım gösteren veriler için Mann-Whitney U testi kullanıldı veya Bartlett varsayım testi anlamlı bulundu. Aksi takdirde, normal olarak dağıtılan iki veri grubunu karşılaştırmak için eşleştirilmemiş Student t testi kullanıldı. Normallik ve varyans homojenliği varsayımları karşılandığında, ikiden fazla grubu karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. Daha sonra çoklu karşılaştırmalar için post hoc Student-Newman-Keuls testi kullanıldı. Bu varsayımlar karşılanmadığında, ikiden fazla grubun karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi uygulandı ve post hoc testi olarak Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Kategorik veriler Fishers tam veya Ki-kare testleri kullanılarak analiz edildi. GraphPad InStat (sürüm 3.05, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) istatistik yazılımı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

Tablo 1'de hem kontrol hem de hasta gruplarının demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri gösterilmiştir. Kontrol grubundaki hastaların yaş ortalaması 28.9 ± 3.3 yıl, yeni tanı WH grubundaki hastaların yaş ortalaması 27.1 ± 3.8 yıl, tedavi altında olan WH grubundaki hastaların ise yaş ortalaması 30.8 ± 1.9 yıl idi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda ortalama yaş, cinsiyet, albümin, hemoglobin, beyaz kan hücreleri, trombosit sayısı, alanin aminotransferaz düzeyi, AST/ALT oranı ve açlık kan şekeri düzeyi benzerdi ($p > 0.05$). WH'nın klinik formu, siroz ve Kayser-Fleischer halkalarının varlığı ve idrardaki bakır seviyeleri, ilaç tedavisi öncesi ve sonrası WH grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p > 0.05$). Serum AST enzim seviyesi, yeni tanı WH grubunda, tedavi altında olan WH ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla, 102.3 ± 18.3 vs 38.3 ± 7.7 , 102.3 ± 18.3 vs 32.7 ± 4.2 , $p < 0.001$). Serum gama glutamil transferaz (GGT) enzim seviyesi, yeni tanı WH grubunda, tedavi altında olan WH ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla, 156.5 ± 48.2 vs 39.8 ± 6.1 , 156.5 ± 48.2 vs 21.2 ± 3.7 , $p < 0.001$). Serum ALP seviyesi, tedavi altında olan WH grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı olarak düşük saptanmıştır (103.2 ± 6.0 vs 127.8 ± 4.1 , $p < 0.01$). 24 saatlik idrar bakır atılımı, yeni tanı ve tedavi altında olan WH gruplarında kontrollere göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (sırasıyla, 257.3 ± 102.3 vs 26.8 ± 4.2 , 362.8 ± 61.9 vs 26.8 ± 4.2 , $p < 0.001$). Yeni tanı ve tedavi altında olan WH gruplarında serum seruloplazmin düzeyleri kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük saptanmıştır (sırasıyla, 78.7 ± 13.6 vs 213.8 ± 9.7 , $p < 0.01$; 106.3 ± 19.8 vs 213.8 ± 9.7 , $p < 0.001$) (Tablo 1).

WH'lı hastalarda tedavi sonrası takip süresi 69.8 ± 5.2 aydı. Kırk hasta D-penisilamin tedavisi alırken, bir hasta trientin, bir hasta da çinko tedavisi alıyordu. Nörolojik muayenede, nöropsikiyatrik WH grubunda en sık görülen nörolojik semptomlar disfaji, dizartri, tremor, distoni, parkinsonizm ve ataksi gibi hareket bozukluklarıydı. Yedi hastada (% 14) depresyon, kişilik değişiklikleri ve psikoz gibi psikiyatrik belirtiler görüldü. MRG incelemede tüm nöropsikiyatrik WH hastalarında talamus, bazal ganglionlar ve beyin sapı gibi subkortikal yapılarda T2 sinyal yoğunluğunda artış gözlemlendi. Ayrıca, hepatik WH hastalarında asemptomatik hepatomegali (2 hasta), izole splenomegali (1 hasta), yağlı karaciğer (3 hasta), akut hepatit (2 hasta), otoimmün hepatit (1 hasta) ve akut karaciğer yetmezliği (1 hasta) tespit edildi.

Tablo 1. WH gruplarının ve kontrol grubunun demografik ve laboratuvar verileri

	Yeni tanı WH (n=8)	Tedavi altında WH (n=42)	Kontrol (n=50)	
Yaş (yıl)	27.1±3.8	30.8±1.9	28.9±3.3	0.8240
Cinsiyet				0.5804
Erkek (n %)	3 (37.5)	24 (57.1)	28 (56.0)	
Kadın (n %)	5 (62.5)	18 (42.9)	22 (44.0)	
WH'nın klinik formu				0.6933
Hepatik (n %)	6 (75.0)	25 (59.5)	-	
Nöropsikiyatrik (n %)	2 (25.0)	17 (40.5)	-	
Sirozis (n %)	2 (25.0)	18 (42.9)	-	0.4501
Kayser–Fleischer halkası pozitifliği (n%)	3 (37.5)	23 (54.8)	-	0.4561
Albumin (g/L)	39.0±2.1	40.0±1.2	45.1±1.9	0.0583
Hemoglobin (g/dl)	12.7±0.8	14.0±0.3	13.9±0.7	0.6674
Beyaz kan hücreleri (x 10 ³ /mm ³)	6.6±0.7	6.7±0.3	7.1±0.9	0.9064
Trombosit sayısı (x 10 ³ /mm ³)	224.3±32.5	200.5±13.9	214.9±15.4	0.7200
AST (IU/L)	102.3±18.3	38.3±7.7	32.7±4.2	<0.001* ⁺
ALT (IU/L)	40.1±6.5	31.1±4.3	30.1±6.2	0.7702
AST/ALT oranı	2.8±0.5	1.4±0.2	1.1±0.7	0.4717
Alkalen fosfataz (IU/L)	109.6±7.9	103.2±6.0	127.8±4.1	<0.01 [‡]
Gamma glutamil transferaz (IU/L)	156.5±48.2	39.8±6.1	21.2±3.7	<0.001* ⁺
Açlık kan şekeri (mg/dl)	86.4±2.3	86.8±3.6	88.2±3.7	0.9539
Idrarda bakır (µg/24 h)	257.3±102.3	362.8±61.9	26.8±4.2	<0.001* [‡]
Serum seruloplazmin (mg/L)	78.7±13.6	106.3±19.8	213.8±9.7	<0.01* <0.001 [‡]

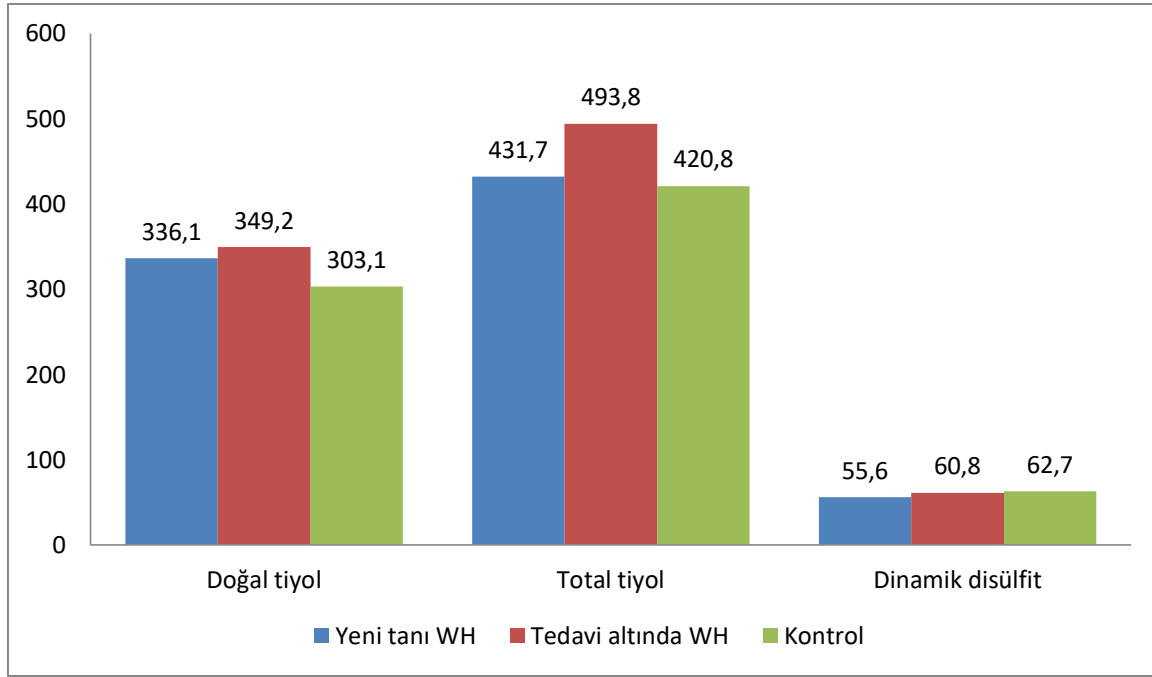
Ortalama ± Standart sapma veriler. ALT, alanin aminotransferaz; AST, aspartat aminotransferaz; WH, Wilson hastalığı; * Kontrol grubu vs yeni tanı WH; ⁺ yeni tanı WH vs tedavi altında WH; [‡] Kontrol grubu vs tedavi altında WH; p<0.05

Tablo 2, Şekil 3 ve 4’de, çalışma grupları arasında doğal tiyol, toplam tiyol ve disülfid seviyelerinin dağılımı gösterilmektedir. Tedavi altında olan WH grubunda doğal tiyol düzeylerinde kontrollere kıyasla istatistiksel anlamlı olarak artış vardı (348.8 ± 16.7 vs 294.9 ± 7.9 , $p < 0.05$) (Tablo 2, Şekil 3A). Gruplar arasında toplam tiyol, disülfid, disülfid/doğal tiyol oranı, disülfid/toplam tiyol oranı veya doğal tiyol/toplam tiyol oranında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Tablo 2, Şekil 3 ve 4).

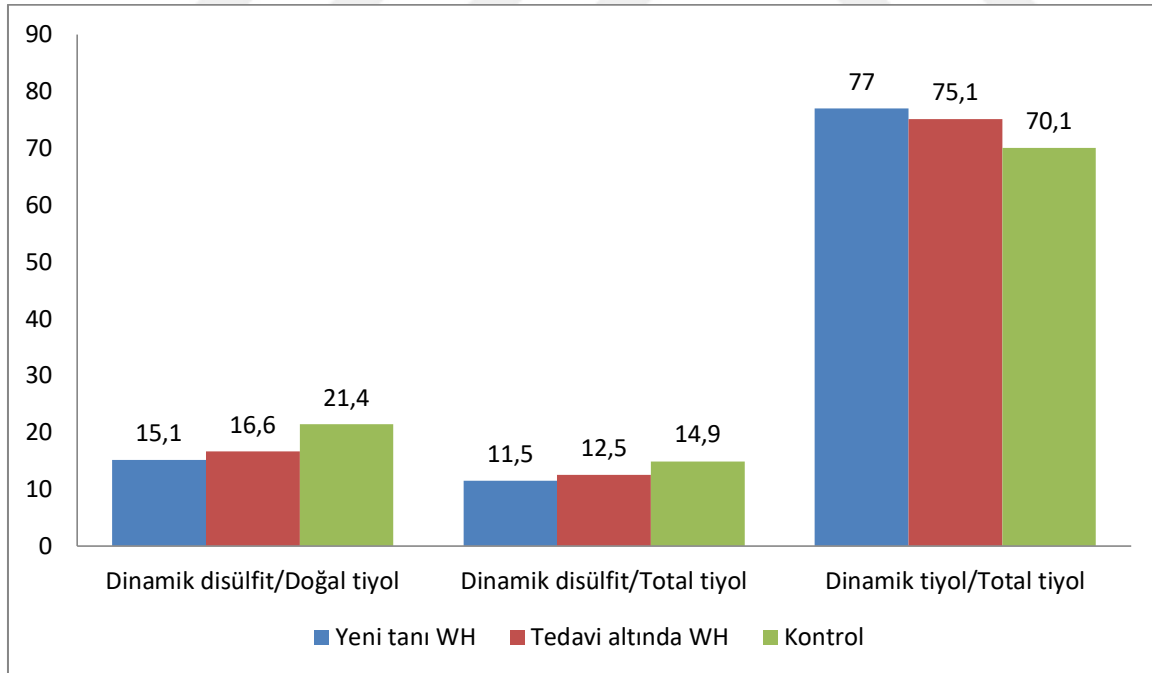
Tablo 2. WH ve kontrol gruplarındaki hastaların dinamik tiyol/disülfid parametreleri

	Yeni tanı WH (n=8)	Tedavi altında WH (n=42)	Kontrol (n=50)	
Doğal tiyol ($\mu\text{mol/L}$)	339.7 ± 44.5	348.8 ± 16.7	294.9 ± 7.9	<0.05*
Toplam tiyol ($\mu\text{mol/L}$)	460.5 ± 66.8	486.4 ± 20.4	426.8 ± 7.3	>0.05
Disülfid ($\mu\text{mol/L}$)	60.4 ± 15.4	68.8 ± 5.7	66.0 ± 4.6	>0.05
Disülfid/Doğal tiyol (%)	18.3 ± 4.0	22.4 ± 2.4	24.9 ± 2.3	>0.05
Disülfid/Toplam tiyol (%)	12.5 ± 2.1	14.1 ± 1.0	15.2 ± 1.0	>0.05
Doğal tiyol/Toplam tiyol (%)	75.0 ± 4.3	71.8 ± 2.1	69.6 ± 2.0	>0.05

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma değerlerini göstermektedir. WH, Wilson hastalığı; * Kontrol grubu ve tedavi altında olan WH ; $p < 0,05$

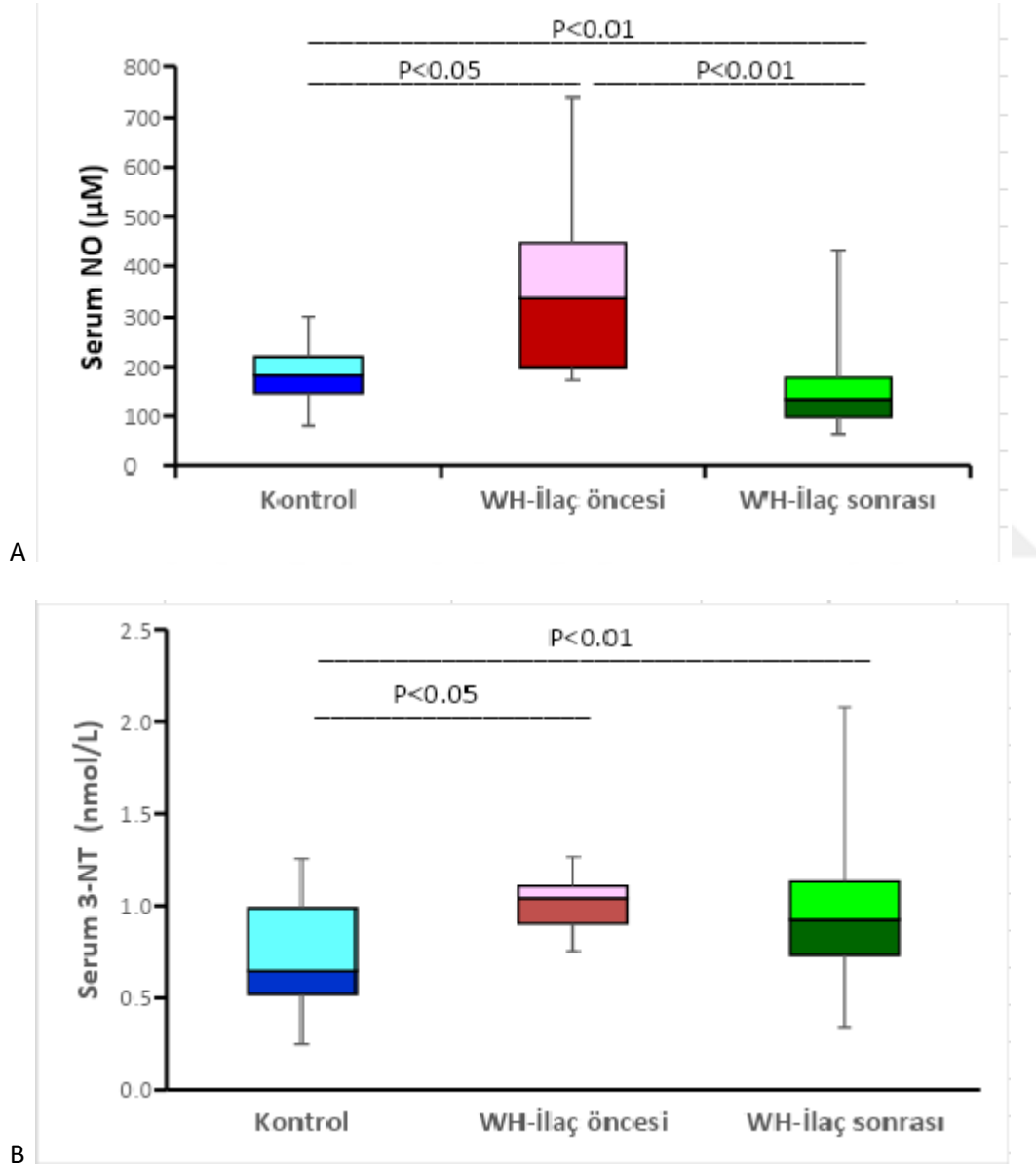


Şekil 3. Çalışma grupları arasında doğal tiyol ($\mu\text{mol/L}$), toplam tiyol ($\mu\text{mol/L}$), ve disülfid ($\mu\text{mol/L}$) seviyelerinin karşılaştırılması. Grafikte belirtilen değerler parametrelerin medyan değerlerini göstermektedir. WH, Wilson hastalığı



Şekil 4. Çalışma grupları arasında disülfid/doğal tiyol (%), disülfid/toplam tiyol (%) ve doğal tiyol/toplam tiyol (%) oranlarının karşılaştırılması. Grafikte belirtilen değerler parametrelerin medyan değerlerini göstermektedir. WH, Wilson hastalığı

Şekil 5, çalışma gruplarındaki serum NO ve 3-NT seviyelerini göstermektedir. Kontrol grubu ($p<0.05$) ve tedavi altında olan WH grubu ($p<0.001$) ile karşılaştırıldığında yeni tanı WH grubunda NO düzeylerinde istatistiksel anlamlı olarak artış saptandı. Ayrıca, kontrollere kıyasla tedavi altında olan WH grubunda istatistiksel anlamlı olarak düşük NO seviyeleri izlendi ($p<0.01$) (Şekil 5A). Serum 3-NT seviyeleri, yeni tanı ve tedavi altında olan WH gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla, $p<0.05$, $p<0.01$) (Şekil 5B).



Şekil 5. Çalışma grupları arasında nitrik oksit (NO) (A) ve 3-nitrotirozin (3-NT) seviyelerinin (B) kutu grafikleri. Her kutunun alt ve üst kenar boşluğu 25. ve 75. yüzdelik dilimleri, kutuların ortasındaki yatay çizgiler medyan değeri ve ince çizgiler en düşük ve en yüksek değerleri temsil eder. WH, Wilson hastalığı

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçları ilk kez WH'da dinamik tiyol/disülfid homeostazı ve nitrozatif stresin rol oynadığını göstermektedir. Verilerimiz, ilaç tedavisi altında olan WH hastalarında doğal tiyol düzeylerinin yüksek olduğunu gösterdi. Ayrıca, yeni tanı WH grubunda serum NO düzeyinin ve yeni tanı ve tedavi altında olan WH gruplarında serum 3-NT düzeylerinin arttığını gözlemledik.

Daha önce yapılan çalışmalarda, oksidatif stresin WH'daki doku hasarının patogeneğinde önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (14,96). Bakır redoks aktif bir metal olduğundan süperoksit oluşturan redoks döngüsü ve oksidatif hasar için uygun koşullar yaratabilir. Fenton veya Haber–Weiss reaksiyonları ve lipid peroksidasyonu, demir ve bakırın reaktif hidroksil ve lipid radikallerinin oluşumunu katalize ettiği ana yollardır (97,98). Metal iyonları ve reaktif oksijen ve nitrojen türleri, hücrel makromoleküler hedeflerde hasara neden olabilir. Fazla miktarda hücrel bakır, protein sistein kalıntılarını oksidize ederek disülfid bağı oluşumuna yol açabilir (99) ve sonuçta protein aktivitesinin değişmesine neden olur (100). Protein disülfid bağı oluşumu, bakırın neden olduğu oksidatif stresin bir sonucudur (101). Bakır tarafından üretilen serbest radikaller, hepatosit organeller lipidlerde ve tiyol içeren proteinlerde oksidatif değişikliklere neden olarak hepatosit disfonksiyonuna veya hasara neden olur (11,102-103). Ek olarak, WH hastalarında ani fulminan karaciğer yetmezliği başlangıcının, olağanüstü yoğun oksidan stres yüklerine bağlı masif hepatosit apoptozundan kaynaklandığı gösterilmiştir (103). WH'daki aşırı bakır yükünden oksijen/nitrojen türevlerinin oluşumu, p53 tümör baskılayıcı geninde mutasyonlara neden olur (104). Aşırı bakırın sadece oksidatif strese değil, aynı zamanda hepatositlerde anormal protein birikimi yoluyla endoplazmik retikulum stresine neden olduğu ve WH'da hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (9). WH hastalarının karaciğerlerinde lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı gözlenmiştir (105). Tüm bu bulgular, WH etiyolojisinde oksidatif stresin rol oynadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda, GSH seviyesini ve ayrı ayrı redoks çiftlerini (indirgenmiş/oksidlenmiş glutatyon, GSH/GSSG ve sistein/sistin, Cys/CySS) ölçmek için bir avantaj sağlayan tüm dinamik SH gruplarını belirlememize izin veren dinamik serum tiyol-disülfid homeostazını ölçtük. İlaç tedavisi alan WH grubunda doğal tiyol düzeylerinde belirgin artış tespit ettik. Hasta grubumuzun büyük çoğunluğu bakır şelasyonu için D-penisilamin almıştır ve bu ilacın

serbest bir tiyol grubu vardır. Bu, çalışmamızda görülen artan doğal tiyol seviyelerine katkıda bulunabilir. Verilerimiz, Gromadzka ve arkadaşlarının (106) yaptığı, bakır ekstratörleri (D-penisilamin veya çinko sülfat) ile tedavi edilen WH hastalarının, ilaç almayan WH hastalarına göre önemli ölçüde daha yüksek glutatyon seviyelerine sahip olduğunu gösteren çalışmanın bulguları ile benzerdir. Bu çalışmada aynı zamanda bakır şelatörleri tedavi edilen WH hastalarının, ilaçla tedavi edilmeyen WH hastalarına göre önemli ölçüde daha düşük bakır metabolizması parametrelerine ve daha yüksek toplam antioksidan potansiyeline sahip olduğu saptandı, ancak her iki grupta da kontrollere göre serum manganez süperoksit dismutaz (MnSOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz ve katalaz aktivitelerinin azaldığı izlendi (106). Gromadzka ve arkadaşları ayrıca, WH hastalarında bakır şelasyon tedavisinin bakır metabolizmasını etkilediği ve doğal antioksidan kapasitesini iyileştirdiği, ancak normalleştirmediği sonucuna varmışlardır. Nagasaka ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Mn-SOD, CuZn-bağımlı süperoksit dismutaz (CuZn-SOD) ve katalazın protein ekspresyonlarının ve aktivitelerinin tüm WH hastalarında azaldığı bulunmuştur (14). Özellikle, mitokondride lokalize olan ve oksidan stresi önleyen Mn-SOD'in azalmış aktivitesi, hücre apoptozuna yol açan mitokondriyal hasara neden olabilir. Bu çalışmada ise GPx aktivitesi sadece fulminan karaciğer yetmezliği olan WH hastalarında azalmıştır (14). Bruha ve Kalitanın yaptığı çalışmalarda, WH hastalarında kontrollere göre glutatyon ve toplam serum antioksidan kapasitesi (TAC) azalmış ve MDA seviyeleri artmıştır (95,107). Dalgic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TAC seviyelerinin kontroller ve WH hastalarında benzer olduğu bildirilmiştir (108). WH olan hastalar, muhtemelen reaktif oksijen türlerinin oluşumunun artması nedeniyle, kontrollere kıyasla daha düşük E vitamini seviyelerine sahiptir (109-111). Bu, farklı antioksidan seviyelerinin azalması (107,111) ve WH'da artan oksidatif stres (13,15) ile tutarlıdır.

Artmış oksidatif stresin WH'nın klinik prezentasyonuna önemli ölçüde katkıda bulunduğu öne sürülmüştür; Bruha ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, düşük TAC düzeyinin WH hastalarında nörolojik semptomlar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (95). Kalita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, D-penisilamin veya çinko tedavilerine C ve E vitamini eklenmesinin, oksidatif stresi azalttığını ve nörolojik bulgu ile birlikte WH'da klinik sonucu iyileştirdiğini bildirilmiştir (112). Bu nedenle, azalmış antioksidan enzim aktiviteleri ve artmış oksidatif stresin, WH'nın patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır.

Wilson hastalığında karaciğer fonksiyon testleri yüksek saptanabilir. En yaygın prezentasyon şekli serum transaminazlarının genellikle normalin üst sınırın 2-5 katı kadar

yüksek olmasıdır (113). Çalışmamızda, yeni tanı Wilson hastalarında, tedavi altında olan hasta grubuna kıyasla AST ve GGT seviyeleri daha yüksek saptandı. WH olan hepatosit hasarı AST yüksekliğine sebep olmuş olabilir.

Çalışmamızda, yeni tanı WH grubundaki hastalarda NO düzeylerinde belirgin bir artış gözlemledik. WH'da nitrozatif stres ile ilgili yalnızca sınırlı sayıda yayınlanmış çalışma vardır. Hussain ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada WH vakalarının %60'ının karaciğerde daha yüksek bir indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonu gösterdiğini bildirmiştir, bu da artan nitrozatif stres kaynağı olarak NO'yu işaret etmektedir (104). WH olan çocuklarda yapılan bir çalışmada da artmış NO seviyeleri bulunmuştur (108). Özetle, bu sonuçlar WH'da yüksek seviyelerde NO üretildiğini göstermektedir. İnflamatuar mikroortamda, süperoksit radikali NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO-) ve diğer reaktif nitrojen türleri oluşturur (114). Bu radikallerin her biri, lipid peroksidatif hücresel hasarı başlatabilir (115). Son çalışmalarda, mitokondri, bakır toksisitesinin potansiyel bir erken hedefi olarak tanımlanmıştır (99). NO tek başına mitokondriyal solunumun geçici olarak engellenmesine neden olur. Peroksinitrit aynı zamanda, mitokondriyal nitrik oksit sentaz (mtNOS) aktivasyonuna bağlı NO oluşumu ile birlikte kompleks I süperoksit yapımının artmasıyla da üretilebilir (116). Peroksinitrit, mitokondriyal geçirgenlik artışına neden olabilir (117). Bakırın neden olduğu oksidatif stresin, kültürlenmiş astrositlerde mitokondriyal geçirgenlik artışına neden olduğu gösterilmiştir (118). Peroksinitrit tirozin rezidüleriyle nitrotirozin oluşturmak üzere etkileşir ve nitrotirozin in vivo peroksinitrit oluşumunun göstergesi olarak yaygın olarak kullanılır (114). WH'da serum 3-NT seviyelerinin anlamlı derecede yükseldiğini ilk kez gösterdik.

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları vardır. Bunlardan biri, yeni tanı WH grubundaki hasta sayısının nispeten az olmasıdır. WH, nadir görülen, otozomal resesif geçişli bir hastalık olduğundan ve teşhis edilmesi zor olduğundan, ilaç tedavisi öncesi WH grubumuz küçüktü. Bu nedenle, daha geniş bir hasta grubunu içeren daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmada genetik bir analiz yapmadık. ATP7B geninde 700'den fazla farklı mutasyon tanımlandığından (5), WH'da doğrudan moleküler/genetik tanı zordur. Dahası, ATP7B gen mutasyonlarını fenotipik sunumla ilişkilendirme girişimleri büyük ölçüde başarısız olmuş ve araştırmacıları WH'nın heterojen fenotipleri için diğer açıklamaları araştırmaya yöneltmiştir (119,120).

Sonuç olarak, çalışmamızda yüksek nitrik oksit ve 3-nitrotirozin düzeylerinin WH patogenezinde rolü olabileceği saptanmıştır. Artmış oksidatif/nitrozatif stres, WH'nın patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, daha fazla tedavi naif Wilson hastası içeren bir çalışma yapılabilirse, bu hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrasında nitrik oksit, 3-nitrotirozin ve plazma tiyol-disülfid düzeylerinin karşılaştırılması patogenez ve sebep-sonuç ilişkisi açısından faydalı olacaktır.

6. SONUÇLAR

Çalışmaya, 50 WH hastaları (bu hastalardan 42'si tedavi altında olan WH grubuna, 8'i ise yeni tanı WH grubuna dahildi) ve 50 kontrol grubu dahil edilmiştir. Kontrol grubundaki hastaların yaş ortalaması 28.9 ± 3.3 yıl, yeni tanı WH grubundaki hastaların yaş ortalaması 27.1 ± 3.8 yıl, tedavi altında olan WH grubundaki hastaların ise yaş ortalaması 30.8 ± 1.9 yıldır. WH'lı hastalarda tedavi sonrası takip süresi 69.8 ± 5.2 aydı. 40 hasta D-penisilamin tedavisi alırken, bir hasta trientin, bir hasta da çinko tedavisi alıyordu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda ortalama yaş, cinsiyet, albümin, hemoglobin, beyaz kan hücreleri, trombosit sayısı, alanin aminotransferaz düzeyi, AST/ALT oranı ve açlık kan şekeri düzeyi benzerdir ($p > 0.05$). Serum AST ve GGT enzim seviyeleri, yeni tanı WH grubunda, tedavi altında olan WH grubuna ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p < 0.001$). Serum ALP seviyesi, tedavi altında olan WH grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p < 0.01$). 24 saatlik idrar bakır atılımı, WH gruplarında kontrollere göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır ($p < 0.001$). WH gruplarında serum seruloplazmin düzeyleri kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p < 0.001$). Tedavi altında olan WH grubunda doğal tiyol düzeylerinde kontrollere kıyasla istatistiksel anlamlı olarak artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Gruplar arasında toplam tiyol, disülfid, disülfid/doğal tiyol oranı, disülfid/toplam tiyol oranı veya doğal tiyol/toplam tiyol oranında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Kontrol grubu ($p < 0.05$) ve tedavi altında olan WH grubu ($p < 0.001$) ile karşılaştırıldığında yeni tanı WH grubunda NO düzeylerinde istatistiksel anlamlı olarak artış saptanmıştır. Kontrollere kıyasla tedavi altında olan WH grubunda istatistiksel anlamlı olarak düşük NO seviyeleri izlenmiştir ($p < 0.01$). Serum 3-NT seviyeleri, WH gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı olarak yüksektir (sırasıyla, $p < 0.05$, $p < 0.01$).

Sonuçlarımız yüksek nitrik oksit ve 3-nitrotirozin düzeylerinin WH patogenezinde rolü olabileceğini göstermiştir. Artmış oksidatif/nitrozatif stres, WH'nın patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. Bizim çalışmamızda süre kısıtlılığından dolayı naif Wilson hasta sayısı fazla değildi. Daha uzun süreli çalışma yapılabilirse, daha çok naif WH bulunabilir ve bu hastalardan tedavi öncesi ve sonrasında nitrik oksit, 3-nitrotirozin ve plazma tiyol-disülfid düzeylerinin karşılaştırılması yapılabilir. Ayrıca, oksidatif ve nitrozatif stresi azaltmaya yönelik tedavilerin WH'a etkisi araştırılabilir. Antioksidan tedavi öncesi ve sonrası WH seyri izlenebilir ve bu tedavinin sistemik tutulum üzerine etkisi araştırılabilir.

Oksidatif/nitrozatif stres diğer kronik hepatitler , NASH , otoimmün hepatit gibi diğer kronik karaciğer hastalıklarına sebep olan hastalıklarda araştırılıp WH ile karşılaştırılabilir. Böylelikle yüksek nitrik oksit ve 3-nitrotirozin düzeylerinin bu hastalıkların patogenezinde de rolü var mı yoksa sadece WH için özgün bir durum olup olmadığı araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet.* 1993;5:327-37.
2. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet.* 1993;5:344-50.
3. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut.* 2007;56:115-20.
4. Sandahl TD, Laursen TL, Munk DE, Vilstrup H, Weiss KH, Ott P. The Prevalence of Wilson's Disease: An Update. *Hepatology.* 2020;71:722-732.
5. Członkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, Rybakowski JK, Weiss KH, Schilsky ML. Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;6:4:21.
6. Hedera P. Wilson's disease: A master of disguise. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019;59:140-145.
7. Cleymaet S, Nagayoshi K, Gettings E, Faden J. A review and update on the diagnosis and treatment of neuropsychiatric Wilson disease. *Expert Rev Neurother.* 2019;19:1117-1126.
8. Letelier ME, Lepe AM, Faúndez M, Salazar J, Marín R, Aracena P, Speisky H. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem Biol Interact.* 2005 15;151:71-82.
9. Oe S, Miyagawa K, Honma Y, Harada M. Copper induces hepatocyte injury due to the endoplasmic reticulum stress in cultured cells and patients with Wilson disease. *Exp Cell Res.* 2016 10;347:192-200.
10. Scheiber IF, Brůha R, Dušek P. Pathogenesis of Wilson disease. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:43-55.
11. 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;107:1788-98.
12. Videla LA, Fernández V, Tapia G, Varela P. Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. *Biometals.* 2003;16:103-11.
13. Ogihara H, Ogihara T, Miki M, Yasuda H, Mino M. Plasma copper and antioxidant status in Wilson's disease. *Pediatr Res.* 1995;37:219-26.

14. Nagasaka H, Inoue I, Inui A, Komatsu H, Sogo T, Murayama K, Murakami T, Yorifuji T, Asayama K, Katayama S, Uemoto S, Kobayashi K, Takayanagi M, Fujisawa T, Tsukahara H. Relationship between oxidative stress and antioxidant systems in the liver of patients with Wilson disease: hepatic manifestation in Wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress. *Pediatr Res*. 2006;60:472-7.
15. Nagasaka H, Takayanagi M, Tsukahara H. Children's toxicology from bench to bed--Liver Injury (3): Oxidative stress and anti-oxidant systems in liver of patients with Wilson disease. *J Toxicol Sci*. 2009;34 Suppl 2:SP229-36.
16. Choi BS, Zheng W. Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF barrier. *Brain Res*. 2009;12;1248:14-21.
17. Esra B, Umit MS, Cansin S, Serpil E, Omer K. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal* 2012; 5: 9–19
18. Gumusyayla S, Vural G, Bektas H, Deniz O, Neselioglu S, Erel O. A novel oxidative stress marker in patients with Alzheimer's disease: dynamic thiol–disulphide homeostasis. *Acta Neuropsychiatr* 2016; 4: 1-6
19. Percillia V S Oliveira, Francisco R M Laurindo. Implications of plasma thiol redox in disease. *Clin Sci (Lond)*. 2018; 21;132:1257-1280.
20. Eren MA, Koyuncu I, Incebiyik H, Karakaş H, Erel Ö, Sabuncu T. The evaluation of thiol/disulphide homeostasis in diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;148:249-253.
21. Ateş İ, Kaplan M, Yüksel M, Meşe D, Alışık M et al. Determination of thiol/disulphide homeostasis in type 1 diabetes mellitus and the factors associated with thiol oxidation. *Endocrine*. 2016;5147-51.
22. Hacı Caliskan M, Sivri S, Sokmen E, Celik M, Ilanbey B et al. Prognostic value of thiol/disulfide homeostasis in symptomatic patients with heart failure. *Arch Physiol Biochem*. 2020;4;1-6.
23. Acoglu EA, Erel O, Yazilitas F, Bulbul M, Oguz MM et al. Changes in thiol/disulfide homeostasis in juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Int*. 2018;60:593-596.
24. Yıkılmaz AŞ, Bakanay ŞM, Akinci A, Alisik M, Erel Ö. Thiol-disulphide Homeostasis in Essential Thrombocythemia Patients. *J Med Biochem*. 2019;30;38:475-480.
25. Huster D. Wilson disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24:531.
26. Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet* 2006; 120: 151-159.
27. Tao TY, Gitlin JD. Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease. *Hepatology* 2003; 37: 1241-1247.

28. Ma J, Betts NM. Zinc and copper intakes and their major food sources for older adults in the 1994-96 continuing survey of food intakes by individuals (CSFII). *J Nutr* 2000; 130:2838.
29. Cox DW. Genes of the copper pathway. *Am J Hum Genet* 1995; 56:828.
30. Lorincz MT. Neurologic Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1184:173.
31. Cater MA, La Fontaine S, Shield K, et al. ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: insight into biliary copper excretion. *Gastroenterology* 2006; 130:493.
32. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet* 1995; 9:210.
33. Riordan SM, Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity. *J Hepatol* 2001; 34:165.
34. Litwin T, Gromadzka G, Członkowska A. Gender differences in Wilson's disease. *J Neurol Sci* 2012; 312:31.
35. Gu M, Cooper JM, Butler P, et al. Oxidative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet* 2000; 356:469.
36. Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, et al. Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 2007; 13:164.
37. Shimuzu N. Wilson disease. *Nippon Rinsho* 2002; 60 Suppl 4: 433-436.
38. European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol* 2012; 56:671.
39. Takeshita Y, Shimizu N, Yamaguchi Y, et al. Two families with Wilson disease in which siblings showed different phenotypes. *J Hum Genet* 2002; 47:543.
40. Manolaki N, Nikolopoulou G, Daikos GL, et al. Wilson disease in children: analysis of 57 cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48:72.
41. Lin LJ, Wang DX, Ding NN, et al. Comprehensive analysis on clinical features of Wilson's disease: an experience over 28 years with 133 cases. *Neurol Res* 2014; 36:157.
42. Wiernicka A, Dądański M, Jańczyk W, et al. Early Onset of Wilson Disease: Diagnostic Challenges. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017; 65:555.
43. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, et al. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* 1997; 113:212.
44. Ferenci P. Pathophysiology and clinical features of Wilson disease. *Metab Brain Dis* 2004; 19:229.
45. van Wassenaeer-van Hall HN, van den Heuvel AG, Algra A, et al. Wilson disease: findings at MR imaging and CT of the brain with clinical correlation. *Radiology* 1996; 198:531.

46. Prashanth LK, Sinha S, Taly AB, Vasudev MK. Do MRI features distinguish Wilson's disease from other early onset extrapyramidal disorders? An analysis of 100 cases. *Mov Disord* 2010; 25:672.
47. Kodama H, Okabe I, Yanagisawa M, et al. Does CSF copper level in Wilson disease reflect copper accumulation in the brain? *Pediatr Neurol* 1988; 4:35.
48. Hartard C, Weisner B, Dieu C, Kunze K. Wilson's disease with cerebral manifestation: monitoring therapy by CSF copper concentration. *J Neurol* 1993; 241:101.
49. Denning TR, Berrios GE. Wilson's disease. Psychiatric symptoms in 195 cases. *Arch Gen Psychiatry* 1989; 46:1126.
50. Denning TR, Berrios GE. Wilson's disease: a longitudinal study of psychiatric symptoms. *Biol Psychiatry* 1990; 28:255.
51. Shanmugiah A, Sinha S, Taly AB, et al. Psychiatric manifestations in Wilson's disease: a cross-sectional analysis. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2008; 20:81.
52. Morgan HG, Stewart WK, Lowe KG, et al. Wilson's disease and the Fanconi syndrome. *Q J Med* 1962; 31:361.
53. Wiebers DO, Wilson DM, McLeod RA, Goldstein NP. Renal stones in Wilson's disease. *Am J Med* 1979; 67:249.
54. Menerey KA, Eider W, Brewer GJ, et al. The arthropathy of Wilson's disease: clinical and pathologic features. *J Rheumatol* 1988; 15:331.
55. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int* 2003; 23:139.
56. Stremmel W, Meyerrose KW, Niederau C, et al. Wilson disease: clinical presentation, treatment, and survival. *Ann Intern Med* 1991; 115:720.
57. Roberts EA, Cox DW. Wilson disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1998; 12:237.
58. McMillin GA, Travis JJ, Hunt JW. Direct measurement of free copper in serum or plasma ultrafiltrate. *Am J Clin Pathol* 2009; 131:160.
59. Demirkiran M, Jankovic J, Lewis RA, Cox DW. Neurologic presentation of Wilson disease without Kayser-Fleischer rings. *Neurology* 1996; 46:1040.
60. Dunn LL, Annable WL, Kliegman RM. Pigmented corneal rings in neonates with liver disease. *J Pediatr* 1987; 110:771.
61. Stevens AC, Glaser J. Image of the month. Sunflower cataract. *Gastroenterology* 1997; 112:6, 317.

62. Giacchino R, Marazzi MG, Barabino A, et al. Syndromic variability of Wilson's disease in children. Clinical study of 44 cases. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997; 29:155.
63. Frommer DJ. Urinary copper excretion and hepatic copper concentrations in liver disease. *Digestion* 1981; 21:169.
64. Sánchez-Albisua I, Garde T, Hierro L, et al. A high index of suspicion: the key to an early diagnosis of Wilson's disease in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28:186.
65. Nicastro E, Ranucci G, Vajro P, et al. Re-evaluation of the diagnostic criteria for Wilson disease in children with mild liver disease. *Hepatology* 2010; 52:1948.
66. Kim EK, Yoo OJ, Song KY, et al. Identification of three novel mutations and a high frequency of the Arg778Leu mutation in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat* 1998; 11:275.
67. Müller T, Koppikar S, Taylor RM, et al. Re-evaluation of the penicillamine challenge test in the diagnosis of Wilson's disease in children. *J Hepatol* 2007; 47:270.
68. Smallwood RA, Williams HA, Rosenoer VM, Sherlock S. Liver-copper levels in liver disease: studies using neutron activation analysis. *Lancet* 1968; 2:1310.
69. Yang X, Tang XP, Zhang YH, et al. Prospective evaluation of the diagnostic accuracy of hepatic copper content, as determined using the entire core of a liver biopsy sample. *Hepatology* 2015; 62:1731.
70. Wu ZY, Wang N, Lin MT, et al. Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in chinese patients with Wilson disease. *Arch Neurol* 2001; 58:971
71. 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. *Hepatology* 2000; 32:1329.
72. Schilsky ML, Ala A. Genetic testing for Wilson disease: availability and utility. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12:57.
73. Wiggelinkhuizen M, Tilanus ME, Bollen CW, Houwen RH. Systematic review: clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29:947.
74. Weiss KH, Thurik F, Gotthardt DN, et al. Efficacy and safety of oral chelators in treatment of patients with Wilson disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:1028.
75. Brewer GJ, Hedera P, Kluin KJ, et al. Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate: III. Initial therapy in a total of 55 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy. *Arch Neurol* 2003; 60:379.

76. Brewer GJ, Askari F, Lorincz MT, et al. Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate: IV. Comparison of tetrathiomolybdate and trientine in a double-blind study of treatment of the neurologic presentation of Wilson disease. *Arch Neurol* 2006; 63:521.
77. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02273596?term=WTx101&rank=1%20or%20https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2014-001703-41/DE#G>.
78. Walshe JM, Dixon AK. Dangers of non-compliance in Wilson's disease. *Lancet* 1986; 1:845.
79. Lau JY, Lai CL, Wu PC, et al. Wilson's disease: 35 years' experience. *Q J Med* 1990; 75:597.
80. Kylie Russell 1, Lyn K Gillanders 2, David W Orr 3, Lindsay D Plank. Dietary copper restriction in Wilson's disease. *Eur J Clin Nutr*. 2018;72:326-331.
81. Korman JD, Volenberg I, Balko J, et al. Screening for Wilson disease in acute liver failure: a comparison of currently available diagnostic tests. *Hepatology* 2008; 48:1167.
82. Hamlyn AN, Gollan JL, Douglas AP, Sherlock S. Fulminant Wilson's disease with haemolysis and renal failure: copper studies and assessment of dialysis regimens. *Br Med J* 1977; 2:660.
83. Kiss JE, Berman D, Van Thiel D. Effective removal of copper by plasma exchange in fulminant Wilson's disease. *Transfusion* 1998; 38:327.
84. Bellary S, Hassanein T, Van Thiel DH. Liver transplantation for Wilson's disease. *J Hepatol* 1995; 23:373.
85. Dhawan A, Taylor RM, Cheeseman P, et al. Wilson's disease in children: 37-year experience and revised King's score for liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11:441.
86. Gollan JL, Gollan TJ. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects. *J Hepatol* 1998; 28 Suppl 1:28.
87. Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med* 2013;65:244–53.
88. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* 2008;45:549–61.
89. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010;48:749–62.
90. Kılınç, A., Kılınç, K., 2000. Nitrik Oksit "Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri". Palme Yayıncılık, 158s, Ankara.

91. McLeod T, Lopez-Figueroa A, Lopez-Figueroa M. Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacology bulletin*. 2001; 35:24-41.
92. Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *British journal of pharmacology*. 2002; 135:1079-1095.
93. Karayağmurlu E: Elektrokonvulsif tedavinin depresif bozukluk tanılı hastalarda nitrozatif stres ve DNA hasarı ile ilişkisi. *Tıpta Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi Psikiatri Anabilim Dalı, Gaziantep* 2019, s. 23.
94. Erel O, Neselioglu S: A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem*, 47 : 326-332, 2014. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2014.09.026
95. Temel MT, Demiryürek S, Saracaloglu A, Ozer CH, Kahraman HN, Coskun ME, Başpınar O, Demiryürek AT. Determination of dynamic thiol/disulphide homeostasis in children with tetralogy of Fallot and ventricular septal defect. *Cardiol Young*. 2019;29(4):499-504.
96. Bruha R, Vitek L, Marecek Z, Pospisilova L, Nevsimalova S, Martasek P, Petrtyl J, Urbanek P, Jiraskova A, Malikova I, Haluzik M, Ferenci P. Decreased serum antioxidant capacity in patients with Wilson disease is associated with neurological symptoms. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35:541-8.
97. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*. 2001;1:529-39.
98. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 2003;15;189:147-63.
99. Zischka H, Lichtmannegger J. Pathological mitochondrial copper overload in livers of Wilson's disease patients and related animal models. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1315:6-15.
100. Aslund F, Beckwith J. Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell*. 1999;19;96:751-3.
101. Cabras T, Sanna M, Manconi B, Fanni D, Demelia L, Sorbello O, Iavarone F, Castagnola M, Faa G, Messina I. Proteomic investigation of whole saliva in Wilson's disease. *J Proteomics*. 2015;14;128:154-63.
102. Summer KH, Eisenburg J. Low content of hepatic reduced glutathione in patients with Wilson's disease. *Biochem Med*. 1985;34:107-11.
103. Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, Wesch H, Mariani SM, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat Med*. 1998;4:588-93.

104. Hussain SP, Raja K, Amstad PA, Sawyer M, Trudel LJ, Wogan GN, Hofseth LJ, Shields PG, Billiar TR, Trautwein C, Hohler T, Galle PR, Phillips DH, Markin R, Marrogi AJ, Harris CC. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;7;97:12770-5.
105. Huster D. Structural and metabolic changes in Atp7b-/- mouse liver and potential for new interventions in Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1315:37-44.
106. Gromadzka G, Karpińska A, Przybyłkowski A, Litwin T, Wierzchowska-Ciok A, Dzieżyc K, Chabik G, Członkowska A. Treatment with D-penicillamine or zinc sulphate affects copper metabolism and improves but not normalizes antioxidant capacity parameters in Wilson disease. *Biometals*. 2014;27:207-15.
107. Kalita J, Kumar V, Misra UK, Ranjan A, Khan H, Konwar R. A study of oxidative stress, cytokines and glutamate in Wilson disease and their asymptomatic siblings. *J Neuroimmunol*. 2014;15;274:141-8.
108. Dalgiç B, Sönmez N, Biberoğlu G, Hasanoğlu A, Erbaş D. Evaluation of oxidant stress in Wilson's disease and non-Wilsonian chronic liver disease in childhood. *Turk J Gastroenterol*. 2005;16:7-11.
109. von Herbay A, de Groot H, Hegi U, Stremmel W, Strohmeyer G, Sies H. Low vitamin E content in plasma of patients with alcoholic liver disease, hemochromatosis and Wilson's disease. *J Hepatol*. 1994;20:41-6.
110. Rodo M, Członkowska A, Pulawska M, Swiderska M, Tarnacka B, Wehr H. The level of serum lipids, vitamin E and low density lipoprotein oxidation in Wilson's disease patients. *Eur J Neurol*. 2000;7:491-4.
111. Sinha S, Christopher R, Arunodaya GR, Prashanth LK, Gopinath G, Swamy HS, Taly AB. Is low serum tocopherol in Wilson's disease a significant symptom? *J Neurol Sci*. 2005 15;228:121-3.
112. Kalita J, Kumar V, Misra UK, Parashar V, Ranjan A. Adjunctive antioxidant therapy in neurologic Wilson's disease improves the outcomes. *J Mol Neurosci*. 2020 ;70:378-385.
113. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP et al. (1997). Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* 113: 212–218.
114. Demiryürek AT, Cakici I, Kanzik I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol Toxicol*. 1998 ;82:113-7.
115. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 23;101:4003-8.
116. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 2002;1;33:1451-64.

117. Hortelano S, Dallaporta B, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Boscá L, Kroemer G. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 1997;30;410:373-7.
118. Reddy PV, Rao KV, Norenberg MD. The mitochondrial permeability transition, and oxidative and nitrosative stress in the mechanism of copper toxicity in cultured neurons and astrocytes. *Lab Invest.* 2008;88:816-30.
119. Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, Bochow B, Rodo M, Tarnacka B, Litwin T, Chabik G, Członkowska A. p.H1069Q mutation in ATP7B and biochemical parameters of copper metabolism and clinical manifestation of Wilson's disease. *Mov Disord.* 2006;21:245-8.
120. Mihaylova V, Todorov T, Jelev H, Kotsev I, Angelova L, Kosseva O, Georgiev G, Ganeva R, Cherninkova S, Tankova L, Savov A, Tournev I. Neurological symptoms, genotype-phenotype correlations and ethnic-specific differences in Bulgarian patients with Wilson disease. *Neurologist.* 2012;18:184-9.