



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

ΑΣΘΕΝΕΙΑ WILSON:

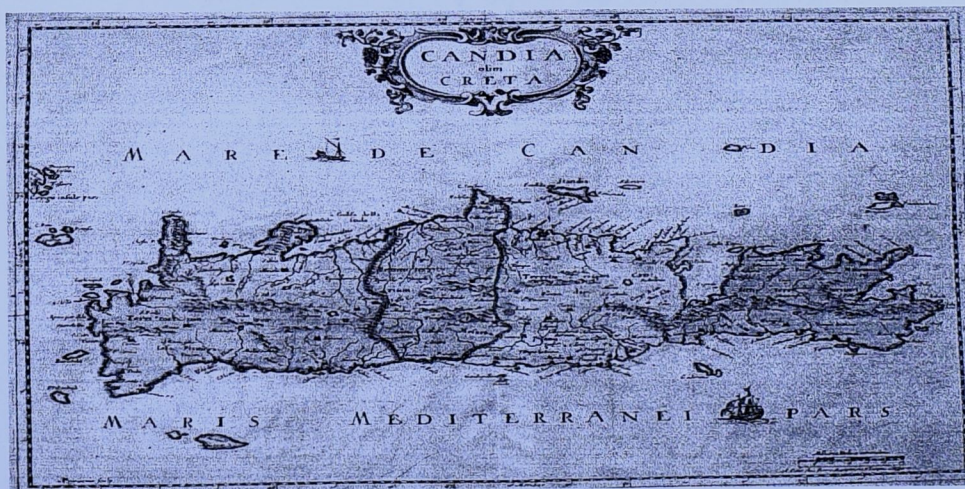
**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΝΟΣ ΟΡΕΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΝΗΣΟΥ ΚΡΗΤΗΣ**

Φοιτήτρια: Σιαλβέρα Θεοδώρα-Ειρήνη

Υπεύθυνος Καθηγητής: Γ. Δεδούσης, Λέκτορας Χαροκόπειου Πανεπιστημίου

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Α. Ζαμπέλας, Επίκουρος Χαροκόπειου Πανεπιστημίου

Γ. Μανιός, Λέκτορας Χαροκόπειου Πανεπιστημίου





ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ**

ΑΣΘΕΝΕΙΑ WILSON:

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΝΟΣ ΟΡΕΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΝΗΣΟΥ
ΚΡΗΤΗΣ**

Φοιτήτρια: Σιαλβέρα Θεοδώρα-Ειρήνη

Υπεύθυνος Καθηγητής: Γ. Δεδούσης, Λέκτορας Χαροκόπειου Πανεπιστημίου

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Α. Ζαμπέλας, Επίκουρος Χαροκόπειου Πανεπιστημίου

Γ. Μανιός, Λέκτορας Χαροκόπειου Πανεπιστημίου

ΑΘΗΝΑ 2004

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Αρ. Κτημ:

Αρ. Εισαγ:

Κωδ. Εγγραφης:

Ταξινομ. Αριθμ:

13.065

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου, κ. Δεδούση, αρχικά για την ανάθεση της παρούσας μελέτης που μου εμπιστεύτηκε και για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη κατά τα δύο έτη που απαιτήθηκαν για την διεκπεραίωσή της. Τον ευχαριστώ, ιδιαίτερα, που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματώσω το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής ανάλυσης στο εργαστήριο γενετικής, γαστρεντερολογικής κλινικής, του νοσοκομείου Charite στο Βερολίνο. Η συνεργασία του κ. Δεδούση με τον υπεύθυνο ιατρό της γαστρεντερολογικής κλινικής, Hartmut Schmidt, αποδείχτηκε σπουδαία, καθώς ο ίδιος μας παρότρυνε σε νέες κατευθύνσεις, ενώ στάθηκε βασικός αρωγός στην πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης, με την παραχώρηση του εργαστηρίου του στις δικές μας αναλύσεις. Εύχομαι στον κ. Δεδούση να επιλέγει πάντα τους καλύτερους συνεργάτες, να έχει της καλύτερη εξέλιξη στην ακαδημαϊκή του καριέρα, και να παραμείνει ο καθηγητής, δάσκαλος, που πάντα συμπαρίσταται στους φοιτητές του.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον κ. Μανιό για τη μεγάλη βοήθεια του στην πραγμάτωση της μελέτης στην περιοχή της Κρήτης. Χάρη στον κ. Μανιό έγιναν οι σωστές συνεργασίες με τις τοπικές αρχές για την έγκριση και την αποδοχή της μελέτης από τον τοπικό πληθυσμό προς διερεύνηση, καθώς και με τις ιατρικές υπηρεσίες, για τις απαραίτητες αιμοληψίες. Τον ευχαριστώ, επιπλέον, για την επίβλεψη των διατροφικών ιστορικών και την ανάλυσή τους. Εύχομαι στον κ. Μανιό να κατακτήσει τις κορυφές της ακαδημαϊκής του πορείας, με γνώμονα πάντα την προαγωγή της γνώσης των φοιτητών του.

Ευχαριστώ, ιδιαίτερα τον κ. Ζαμπέλα, για την ενεργή του υποστήριξη στην πρόοδο και εξέλιξή μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ως φοιτήτρια και ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια, καθώς και για την άριστη πάντα συνεργασία μας. Ευχαριστώ τον κ. Ζαμπέλα που με παροτρύνει πάντα για τα καλύτερα και τα υψηλότερα και του εύχομαι όχι μόνο την υψηλότερη θέση στην ακαδημαϊκή του καριέρα, αλλά και στην καρδιά και στο μυαλό των φοιτητών του.

Τέλος, αλλά όχι τελευταία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο, φίλη και αδερφή Μαρία Ραμματά, που χωρίς τη βοήθειά της δεν θα ήταν δυνατή η έγκαιρη συγγραφή και παρουσίαση της μελέτης, καθώς λόγω ατυχήματός μου λειτουργούσα με ένα μόνο χέρι. Την ευχαριστώ από την καρδιά μου για όλη τη συμπαράσταση και της εύχομαι κάθε επαγγελματική και προσωπική ευτυχία.

Ευχαριστώ τους γονείς μου, που στέκονται δίπλα μου, σε κάθε μου βήμα, σε κάθε μου ανάσα. Να τους έχει ο Θεός καλά...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Wilson είναι μια γενετική διαταραχή του μεταβολισμού του χαλκού, που κληρονομείται με τρόπο αυτοσωμικό υπολειπόμενο. Προκαλείται από μεταλλάξεις στο ATP7B γονίδιο, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13. Μέχρι τώρα περισσότερες από 250 μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί στο γονίδιο αυτό. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου παγκοσμίως είναι 1:30000.

Η ελαττωμένη απέκκριση του χαλκού στη χολή στη νόσο του Wilson, συνεπάγεται βαθμιαία συσσώρευσή του στο ήπαρ, στα βασικά γάγγλια του εγκεφάλου και στον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού. Κλινικά μπορεί να εμφανίζεται ως μια ηπατική νόσος, ως μια προοδευτική νευρολογική διαταραχή ή ως μια ψυχιατρική ασθένεια. Απαιτεί δια βίου φαρμακευτική αγωγή για την επιβίωση του ασθενή. Συνήθως, συστήνεται διατροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε χαλκό.

Ο υψηλός αριθμός της νόσου του Wilson στο νησί της Κρήτης μας οδήγησε στη διερεύνηση του εύρους των μεταλλάξεων σε ορεινά χωριά κοντά στην πόλη του Ηρακλείου. Μέχρι και τις μέρες μας καταγράφονται αρκετοί θάνατοι, τόσο ηλικιωμένων όσο και νεαρών ατόμων από αυτή την ασθένεια στην περιφέρεια της Κρήτης. Η ελλιπής ενημέρωση του εντόπιου πληθυσμού καθώς και η ομοαίματη σύζευξη συγγενών πρώτου βαθμού, πιθανότατα συντέλεσαν στο παραπάνω γεγονός. Παράλληλα με τη γενετική ανάλυση, σημαντική κρίθηκε η συμβουλευτική σε θέματα διατροφής, καθώς και η διατροφική αξιολόγηση των ασθενών και φορέων της νόσου, όπως και ομάδας ελέγχου.

ΑΣΘΕΝΕΙΑ WILSON

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΝΟΣ ΟΡΕΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΝΗΣΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ασθένεια του Wilson αναφέρεται για πρώτη φορά το 1912 από τον ιατρό Kinnear Wilson, ο οποίος στη διδακτορική του διατριβή περιέγραφε τέσσερις ασθενείς με δυσαρθρία και τρόμο. Οι ασθενείς αυτοί, σε μεταθανάτια κλινική εξέταση παρουσίασαν κοιλότητες των φακοειδών πυρήνων και κίρρωση. Στα επόμενα χρόνια άλλοι ερευνητές αναγνώρισαν την πάθηση εισάγοντας τον όρο «προοδευτική ηπατοφακοειδής εκφύλιση», μια οικογενή νευρολογική θανάσιμη πάθηση που συνοδεύεται από χρόνια ηπατική νόσο και που τελικά οδηγεί σε κίρρωση¹. Η συσχέτιση της διαταραχής με την εναπόθεση χαλκού στον κερατοειδή χιτώνα πραγματοποιήθηκε αργότερα από τους Kayser και Fleischer. Μέσα στις επόμενες δεκαετίες εδραιώθηκε ο ρόλος του χαλκού στην παθογένεια της νόσου του Wilson (WD; MIM# 277900) και ταυτόχρονα καθορίστηκε ότι η ασθένεια κληρονομείται με τρόπο αυτοσωμικό υπολειπόμενο^{2,3}.

Το 1993 οι Tanzi et al και Bull et al εντόπισαν στο χρωμόσωμα 13 (13q14.3) το παθολογικό γονίδιο ATP7B (ATP7B; MIM# 606882; GenBank L25591) που ευθύνεται για τη νόσο και μερικές φορές αναφέρεται ως γονίδιο “WND”^{4,6}. Το γονίδιο έχει 21 εξόνια και κωδικοποιεί μια 60 kDa μεταλλομεταφέρουσα Ρ-τύπου ΑΤΡάση που κυρίως εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα και μεσολαβεί στη

διαμεμβρανική μεταφορά του χαλκού⁷. Η έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται επίσης στους νεφρούς και σε μικρότερο βαθμό στον εγκέφαλο. Απουσία ή μειωμένη λειτουργία της πρωτεΐνης του ATP7B οδηγεί σε ανεπαρκή ηπατοκυτταρική απέκκριση του χαλκού στη χολή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση χαλκού στο ήπαρ και στον τραυματισμό του. Τελικά ο χαλκός απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος και εναποτίθεται σε άλλα όργανα, κυρίως στον εγκέφαλο, στους νεφρούς και στον κερατοειδή χιτώνα. Μια επιπλέον συνέπεια της μειωμένης λειτουργίας της πρωτεΐνης ATP7B αποτελεί η ανεπαρκής ενσωμάτωση του χαλκού στη σερουλοπλασμίνη (την κύρια δεσμεύουσα πρωτεΐνη του χαλκού στο πλάσμα). Η απουσία του χαλκού στην ηπατική παραγωγή και έκκριση της σερουλοπλασμίνης οδηγεί στη δημιουργία της αποσερουλοπλασμίνης. Για το λόγο αυτό στους περισσότερους ασθενείς με νόσο του Wilson παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα σερουλοπλασμίνης στο αίμα⁸.

Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου παγκοσμίως είναι 1:30000, ενώ η σχετική συχνότητα των ασυμπτωματικών φορέων του ενός γονιδίου της νόσου 1:90⁹. Κλινικά μπορεί να εμφανίζεται ως μια ηπατική νόσος, ως μια προοδευτική νευρολογική διαταραχή ή ως μια ψυχιατρική ασθένεια. Η ηπατική δυσλειτουργία είναι λιγότερο εμφανής ή συχνά απύσα. Η κλινική εκδήλωση της νόσου ως ηπατική δυσλειτουργία είναι πιο συχνή στα παιδιά και στους νεαρούς ενήλικες παρά στους μεγαλύτερους ενήλικες. Ωστόσο δεν παρατηρούνται συγκεκριμένα συμπτώματα ανά ηλικία. Γενικότερα, η νόσος εκδηλώνεται μεταξύ των 5 και 35 ετών του ανθρώπου². Ο νεαρότερος ασθενής που έχει αναφερθεί με κίρρωση εξαιτίας της νόσου του Wilson ήταν 3 χρονών και ο μεγαλύτερος ήταν 62 κατά τη διάγνωση^{10,11}. Πρόσφατα, διαγνώστηκαν δύο αδέρφια στην όγδοη δεκαετία τους και η διάγνωσή τους επιβεβαιώθηκε από μοριακές μελέτες, δείχνοντας μεταλλάξεις στην ATP7B².

Η νόσος ήταν θανατηφόρα μέχρι μισό αιώνα πριν που αναπτύχθηκαν τρόποι αντιμετώπισης της. Πρόκειται για μία από τις πρώτες παθήσεις του ήπατος για τις οποίες η φαρμακευτική αγωγή ήταν αποτελεσματική. Η πρώτη θεραπευτική αγωγή εισήχθη στη Βρετανία και αφορούσε ένα δεσμευτικό μέσο του χαλκού. Ωστόσο η επανάσταση στη θεραπεία της διαταραχής έγινε το 1956 από το John Walsh με ένα από του στόματος χορηγούμενο δεσμευτικό σκεύασμα της D-πενικιλλαμίνης¹². Εκτοτε έχουν βρεθεί και άλλοι τρόποι αντιμετώπισης της νόσου, όπως η χορήγηση αλάτων ψευδαργύρου που εμποδίζει την εντερική απορρόφηση του χαλκού και η μεταμόσχευση ήπατος η οποία συνιστά την αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση¹³.

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Το εύρος της ηπατικής νόσου που συναντάται στους ασθενείς με τη νόσο του Wilson συνοψίζεται στον Πίνακα 1. Ο τύπος της ηπατικής νόσου είναι ευμετάβλητος και κυμαίνεται από ασυμπτωματικός μόνο με βιοχημικές ανωμαλίες έως και ολική ηπατική ανεπάρκεια. Τα παιδιά μπορεί να είναι ολοκληρωτικά ασυμπτωματικά με ηπατομεγαλία ή με ανώμαλες συγκεντρώσεις αμινοτρανσφερασών ορού, που εντοπίζονται τυχαία. Ορισμένοι ασθενείς παρουσιάζουν μια σύντομη κλινική νόσο που μοιάζει με οξεία ιογενή ηπατίτιδα, ενώ σε άλλους εκδηλώνεται ως κλινική μη διακρινόμενη από την αυτοάνοση ηπατίτιδα. Κάποιοι ασθενείς εμφανίζουν μόνο βιοχημικές ανωμαλίες ή ιστολογικά ευρήματα στεάτωσης σε βιοψίες ήπατος, ενώ αρκετοί εκδηλώνουν σημεία χρόνιας ηπατικής νόσου με ενδείξεις κίρρωσης. Μερικοί ασθενείς παρουσιάζουν, επίσης, παροδικά επεισόδια ίκτερου, εξαιτίας της αιμόλυσης.

Πίνακας 1. Κλινικές εκδηλώσεις της ηπατικής, νευρολογικής και ψυχιατρικής νόσου των ασθενών με νόσου του Wilson

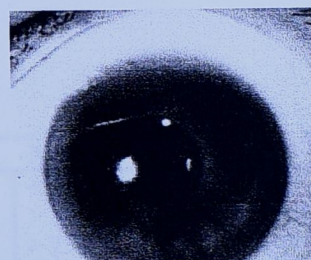
Ηπατικές	Ασυμπτωματική ηπατομεγαλία Μεμονωμένη σπληνομεγαλία Αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφερασών (AST,ALT) Λιπώδης ήπαρ Οξεία ηπατίτιδα Παρόμοιου τύπου αυτοάνοση ηπατίτιδα Κίρρωση
Νευρολογικές	Ολοκληρωτική ηπατική ανεπάρκεια Διαταραχές κίνησης (τρέμουλο, αθέλητες κινήσεις) Δυσαρθρία Δυστονία Ψευδοβολβοειδής παράλυση Ημικρανίες/ Πονοκέφαλους Αϋπνία
Ψυχιατρικές	Κατάθλιψη Νευρώσεις Αλλαγές προσωπικότητας Ψύχωση
Άλλα συστήματα	Νεφρικές ανωμαλίες Σκελετικές ανωμαλίες Καρδιομυοπάθεια, δυσαρρυθμίες Παγκρεατίτιδα Υποπαραθυρεοειδισμό Εμμηνορροϊκές ανωμαλίες

Οι νευρολογικές εκδηλώσεις στη νόσο του Wilson τυπικά παρουσιάζονται στην τρίτη δεκαετία της ζωής, μετά την έναρξη της ηπατικής νόσου, αν και μπορούν να εμφανιστούν και στην παιδική ηλικία. Οι ανωμαλίες του νευρολογικού συστήματος μπορεί να αφορούν στα πρώτα στάδια εκδήλωσής τους, τόσο το συμπαθητικό όσο και το παρασυμπαθητικό σύστημα. Οι παιδιατρικοί ασθενείς εμφανίζουν αλλαγές στη συμπεριφορά, χειροτέρευση στις σχολικές εργασίες ή ανικανότητα να πραγματοποιήσουν εργασίες που απαιτούν τον συντονισμό χεριού-ματιού. Άλλα συνήθη ευρήματα σε αυτούς που εμφανίζουν συμπτώματα της νευρολογικής νόσου είναι το τρέμουλο, η έλλειψη συντονισμού κινήσεων, η δυσαρθρία, η δυστονία και η σπαστικότητα. Μαζί με τις αλλαγές στη συμπεριφορά, άλλες ψυχιατρικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν την κατάθλιψη, άγχος ακόμα και ψύχωση². Σημειώνεται ότι μεταξύ συμπτωματικών ασθενών για τη νόσο του Wilson, οι γυναίκες παρουσιάζουν πιο προφανή νευροψυχιατρικά συμπτώματα από τους άντρες ασθενείς. Μέρος των νευρολογικών προβλημάτων που προαναφέρθηκαν είναι αναστρέψιμο μέσα σε μία περίοδο δύο ετών θεραπείας δέσμευσης χαλκού. Ωστόσο

κάποιοι ασθενείς είναι πιθανό να εμφανίσουν συμπτώματα τοξικότητας από το χαλκό πριν από την εμφάνιση των νευρολογικών προβλημάτων¹⁴.

Οι ασθενείς με τη νόσο του Wilson μπορεί να παρουσιάζουν σημαντικές εξωηπατικές εκδηλώσεις, εκτός από τις νευρολογικές και τις ψυχιατρικές. Μπορεί να εμφανίζουν νεφρικές ανωμαλίες όπως πρωτεϊνουρία και νεφρολιθίαση¹⁵, σκελετικές ανωμαλίες όπως πρόωρη οστεοπόρωση και αρθρίτιδα¹⁶. Επιπλέον, μπορεί να εμφανίσουν καρδιομυοπάθεια¹⁷, παγκρεατίτιδα¹⁸, υποπαραθυρεοειδισμό¹⁹, ανικανότητα γονιμοποίησης και επαναλαμβανόμενες αποβολές²⁰.

Τα δαχτυλίδια Kayser-Fleischer αντιπροσωπεύουν απόθεση χαλκού στη μεμβράνη Decemet του κερατοειδή χιτώνα. Όταν είναι ορατοί με απευθείας εξέταση του ματιού, εμφανίζονται σαν μια χρυσό-καφετιά δέσμη στην ακριανή περιοχή του κερατοειδούς. Απαιτείται, ωστόσο, εξέταση με ειδική λάμπα από έμπειρο ιατρό για την αναγνώρισή τους στους



Kayser-Fleischer Ring

περισσότερους ασθενείς². Τα δαχτυλίδια αυτά, βέβαια, δεν είναι ειδικά για τη νόσο του Wilson, αλλά μπορεί να εντοπιστούν σε ασθενείς με χρόνιες χολοστατικές νόσους καθώς και σε παιδιά με νεογνική χολόσταση²¹. Οι ασθενείς με νόσο του Wilson εμφανίζουν τα δαχτυλίδια Kayser-Fleischer σε ποσοστό 50% έως 62% και κυρίως αυτοί που πάσχουν από ηπατική νόσο κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Τόσο τα δαχτυλίδια Kayser-Fleischer όσο και ο καταρράκτης σταδιακά εξαφανίζονται με την κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή ή με ακόλουθη μεταμόσχευση ήπατος, αν και ο ρυθμός εξαφάνισης δεν συσχετίζεται με μείωση των κλινικών συμπτωμάτων²².

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μέσα στα χρόνια, η πρόοδος στις διαγνωστικές μεθόδους κατέστησε δυνατό τον συστηματικό έλεγχο των φορέων ή ασθενών της νόσου, πριν ακόμη αυτοί εμφανίσουν τα νευρολογικά συμπτώματα (Πίνακας 2). Οι διαγνωστικοί μέθοδοι περιλαμβάνουν την αναγνώριση των δαχτυλιδιών Kayser-Fleischer, τα μειωμένα επίπεδα σερουλοπλασμίνης στην κυκλοφορία του αίματος και τη δυνατότητα υπολογισμού της ηπατικής συγκέντρωσης του χαλκού, από βιοψία δείγματος διαδερμικού ήπατος²³.

Πίνακας 2. Διαγνωστικά τεστ

Παράμετρος	Φυσιολογική τιμή	Νόσος του Wilson
Σερουλοπλασμίνη ορού	> 200 mg/l	< 200 mg/l
Χαλκός ούρων προ-πενικιλαμίνης	< 1.25 micromol/24 h	> 3 micromol/24 h
Χαλκός ούρων μετά-πενικιλαμίνης	< 25 micromol/24 h	> 25 micromol/24 h
Ηπατικός χαλκός	< 250 microg/g ξηρού βάρους	> 250 microg/g ξηρού βάρους
Ελεύθερος χαλκός ορού	< 1.6 microM	> 7 microM
Δακτυλίδια Kayser-Fleischer	Απόντα	Παρόντα

Πιο πρόσφατα, οι μοριακές διαγνωστικές μελέτες κατέστησαν πιο εφικτό τον καθορισμό του απλότυπου ή των πολυμορφισμών του DNA γύρω από το γονίδιο ATP7B, ώστε να εντοπίζονται πιο εύκολα οι συγγενείς πρώτου-βαθμού των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών. Σε ορισμένους ασθενείς μπορούν να καθοριστούν οι ειδικές για τη νόσο μεταλλάξεις και στα δύο αλληλία του χρωμοσώματος 13. Οι ασθενείς με κίρρωση, νευρολογικές εκδηλώσεις και δακτυλίδια Kayser-Fleischer μπορούν να διαγνωστούν εύκολα ως ασθενείς της νόσου, επειδή παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά της αρχικής κλινικής περιγραφής².

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Η θεραπευτική προσέγγιση της νόσου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως, εάν η νόσος είναι ενεργής ή εμφανίζονται μόνο συμπτώματα, εάν υπάρχουν νευρολογικές ή ηπατικές εκδηλώσεις, καθώς και εάν ο εντοπισμός του ασθενή προηγείται της εκδήλωσης των συμπτωμάτων. Θεωρείται ότι αυτός ο διαχωρισμός είναι καθοριστικός τόσο για την επιλογή της θεραπείας όσο και για τη χορηγούμενη δόση αγωγής, αν και δεν υπάρχουν μελέτες που να έχουν συστηματικά ερευνήσει την παραπάνω προσέγγιση. Η φαρμακευτική αγωγή πρέπει να χορηγείται δια βίου και η αδυναμία συμμόρφωσης σε αυτή οδηγεί σε επανεμφάνιση των συμπτωμάτων και τελικά σε ηπατική ανεπάρκεια. Σε αυτό το στάδιο απαιτείται μεταμόσχευση ήπατος για την επιβίωση του ασθενή. Η αξιολόγηση της χορηγούμενης θεραπείας πρέπει να γίνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα και να περιλαμβάνει έλεγχο των πιθανών παρενεργειών και της συμμόρφωσης του ασθενούς².

Μια από τις διαθέσιμες φαρμακευτικές αγωγές είναι η D-πενικιλλαμίνη που αναγνωρίστηκε ως το πρώτο από του στόματος φάρμακο για τη θεραπεία της νόσου Wilson το 1956. Η κυριότερη δράση της πενικιλλαμίνης είναι η αύξηση της απέκκρισης του χαλκού από το σώμα²⁴. Η συνολική βιοδιαθεσιμότητά της στον οργανισμό υπολογίζεται στο 40-70%²⁵. Πρόκειται για έναν γενικό δεσμευτή μετάλλων που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της κυστίνωσης ενώ στη ρευματοειδή αρθρίτιδα έχει χορηγηθεί ως ανοσοκατασταλτικό. Όταν λαμβάνεται ταυτόχρονα με κάποιο γεύμα, η απορρόφηση του φαρμάκου μειώνεται συνολικά στο 50% γιατί η απορρόφηση του φαρμάκου γίνεται από το γαστρεντερικό σωλήνα²⁶. Η πενικιλλαμίνη πρέπει να χορηγείται ιδανικά μία ώρα πριν ή δύο ώρες μετά το γεύμα για να πετύχουμε τη μέγιστη δυνατή δράση της². Αποτυχία συμμόρφωσης στη θεραπεία με

πενικιλλαμίνη έχει οδηγήσει σε ταχεία εξέλιξη της ηπατικής νόσου ενώ διακοπή της θεραπείας καθιστά απαραίτητη τη μεταμόσχευση ήπατος ή οδηγεί ακόμη και στο θάνατο²⁷. Η χρήση της πενικιλλαμίνης συσχετίζεται με πολλές παρενέργειες οι οποίες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3). Το φάρμακο απαιτεί τακτική χορήγηση συμπληρωμάτων πυριδοξίνης σε δόση 25 έως 50 mg καθημερινώς².

Πίνακας 3. Θεραπευτικές μέθοδοι της WD

Αγωγή	Τρόπος δράσης	Νευρολογική επιδείνωση	Παρενέργειες	Σχόλια
Πενικιλλαμίνη	Γενικός δεσμευτής	10% ως 50% κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της θεραπείας	Πυρετός, εξάνθημα, πρωτεϊνουρία, τύπου λύκος-αντιδρ. Εκφυλιστικές αλλαγές στο δέρμα Απλαστική αναιμία Λευκοπενία Θρομβοκυτοπενία Νεφρωτικό Σύνδρ. Ηπατοτοξικότητα	Μείωση δόσης σε χειρουργείο και κατά την εγκυμοσύνη
Τριεντίνη	Γενικός δεσμευτής	Ενίοτε, κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της θεραπείας	Γαστρίτιδα Απλαστική αναιμία σπάνια Σιδηροβλαστική αναιμία	Μείωση δόσης σε χειρουργείο και κατά την εγκυμοσύνη
Ψευδάργυρος	Διεγέρτης μεταλλοθειονίνης	Κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της θεραπείας	Γαστρίτιδα Βιοχημική παγκρεατίτιδα Συσσώρευση ψευδαργύρου Αλλαγές στο ανοσοπ/κο σύστημα	Καμία μείωση της δόσης
Τετραθειομόλυβδος	Γενικός δεσμευτής	Σπάνια	Ουδετεροπενία	Πειραματικός

Η τριεντίνη αποτελεί ένα μέλος της οικογένειας των δεσμευτών μετάλλων, με δομή πολυαμίνης χημικά διακριτή από την πενικιλλαμίνη. Εισήχθη το 1969 ως εναλλακτική θεραπεία της πενικιλλαμίνης. Απορροφάται ελάχιστα από το γαστρεντερικό σωλήνα ενώ το μέρος αυτής που απορροφάται μεταβολίζεται και απενεργοποιείται. Όπως η πενικιλλαμίνη, η τριεντίνη προωθεί επίσης την απέκκριση του χαλκού από τους νεφρούς²⁸. Μία άλλη δράση της είναι η δέσμευση του σιδήρου, γι'αυτό η συγχορήγηση τους πρέπει να αποφεύγεται. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η έλλειψη χαλκού που προκαλείται από την τριεντίνη, μπορεί να οδηγήσει σε υπερφόρτωση του ήπατος με σίδηρο²⁹. Πρόκειται για μία αποτελεσματική θεραπεία

για τη νόσο του Wilson και ενδείκνυται ιδιαίτερα σε ασθενείς που δεν μπορούν ανεχτούν τη χρήση της πενικιλλαμίνης ή έχουν ιστορικό νεφρικής νόσου, συμφορητικής σπληνομεγαλίας ή τάση για αυτοάνοσα νοσήματα²⁷. Η τριεντίνη έχει λίγες παρενέργειες και πρέπει να χορηγείται μία ώρα πριν ή δύο ώρες μετά τα γεύματα.

Ο ψευδάργυρος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τη θεραπεία της νόσου στην Ολλανδία στις αρχές της δεκαετίας του 1960³⁰. Ο μηχανισμός δράσης του διαφέρει από αυτόν της πενικιλλαμίνης και της τριεντίνης. Ο ψευδάργυρος εμπλέκεται στην απορρόφηση του χαλκού από το γαστρεντερικό σωλήνα με τον εξής τρόπο: διεγείρει τη μεταλλοθειονίνη των εντεροκυττάρων, μια πρωτεΐνη πλούσια σε κυστεΐνη, που είναι ενδογενής δεσμευτής των μετάλλων. Η μεταλλοθειονίνη έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το χαλκό από ότι με τον ψευδάργυρο κι έτσι επιλεκτικά δεσμεύει το χαλκό κατά την είσοδο του στην πυλαία κυκλοφορία. Εφόσον δεσμευτεί ο χαλκός δεν απορροφάται αλλά αποβάλλεται στα κόπρανα³¹. Εφόσον ο χαλκός εισέρχεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και από τη σίελο και από τις γαστρικές εκκρίσεις, η θεραπεία με ψευδάργυρο δημιουργεί αρνητικό ισοζύγιο χαλκού και επομένως μετακινεί τον αποθηκευμένο χαλκό³². Ο ψευδάργυρος επίσης δρα διεγείροντας τη μεταλλοθειονίνη των ηπατοκυττάρων. Εμφανίζει λίγες παρενέργειες και χρησιμοποιείται κυρίως για θεραπεία συντήρησης. Ως θεραπεία πρώτης γραμμής χρησιμοποιείται πιο συχνά σε ασυμπτωματικούς ή προσυμπτωματικούς ασθενείς. Φαίνεται να είναι όμοια αποτελεσματική με την πενικιλλαμίνη θεραπεία αλλά καλύτερη ανεκτή³³. Η λήψη ψευδαργύρου με ταυτόχρονη κατανάλωση τροφής, εμπλέκεται στην απορρόφηση του ψευδαργύρου και στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας².

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες και κυρίως η βιταμίνη Ε μπορούν να έχουν συμπληρωματικό ρόλο στη θεραπευτική αγωγή των ασθενών με νόσο του Wilson. Σε αυτούς έχουν βρεθεί χαμηλά επίπεδα βιταμίνης Ε τόσο στον ορό όσο και στο ήπαρ. Έχει αναφερθεί σε ορισμένες μελέτες ότι η χορήγηση βιταμίνης Ε παράλληλα με τη θεραπευτική αγωγή, οδήγησε σε συμπτωματική βελτίωση των ασθενών. Ωστόσο, δεν έχουν διεξαχθεί ακριβείς μελέτες, που να επιβεβαιώνουν το παραπάνω³⁴.

Όσον αφορά στη διατροφή, φαίνεται να διαδραματίζει αρκετά σημαίνων ρόλο στην εξέλιξη της νόσου, καθώς ο χαλκός αποτελεί σημαντικό ιχνοστοιχείο, που εντοπίζεται σε διάφορα τρόφιμα. Οι γενικές οδηγίες προς τους ασθενείς με νόσο του Wilson, περιλαμβάνουν αποφυγή των τροφών με υψηλή συγκέντρωση σε χαλκό (θαλασσινά, ξηροί καρποί, μανιτάρια, οργανικά κρέατα), τουλάχιστον κατά το πρώτο έτος της φαρμακευτικής αγωγής. Οι δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε χαλκό μπορεί να καθυστερήσουν την έναρξη της νόσου και να ελέγξουν την πορεία εξέλιξής της. Ωστόσο, η διατροφική αντιμετώπιση δεν συνιστά μοναδικός τρόπος θεραπείας^{35,36}. Η συμβουλευτική από ειδικούς διατροφολόγους είναι απαραίτητη, ιδιαίτερα σε αυτούς που εφαρμόζουν φυτοφαγικές δίαιτες.

Επίσης, το πόσιμο νερό που εισέρχεται σε κάθε σπίτι μέσω χάλκινων σωλήνων, πρέπει να ελέγχεται για την περιεκτικότητά του σε χαλκό. Εάν αυτή είναι υψηλή, συστήνεται ειδική συσκευή φιλτραρίσματος του νερού. Η δημοτική παροχή νερού δεν χρειάζεται να ελέγχεται. Σημασία, πρέπει να δίδεται γενικότερα στους χάλκινους σωλήνες, στο νερό που χρησιμοποιείται για τη μαγειρική ή και την πόση, στο εμφιαλωμένο νερό, καθώς και στην ποιότητα των μαγειρικών σκευών².

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ WILSON

Η ομοιοστάση του χαλκού στο ανθρώπινο σώμα εξαρτάται αποκλειστικά από την απέκκριση του από το ήπαρ στη χολή. Μετά την απορρόφησή του από τον εντερικό αυλό, ο χαλκός αρχικά συνδέεται με την αλβουμίνη και μεταφέρεται στο ήπαρ. Εκεί χρησιμοποιείται, είτε για τη σύνθεση ενζύμων που περιέχουν χαλκό, όπως κυτοχρωμική οξειδάση, υπεροξειδική δυσμουτάση, είτε για την ενσωμάτωσή του στη σερουλοπλασμίνη. Η σερουλοπλασμίνη περιέχει έξι ή επτά άτομα χαλκού ανά μόριο και εκκρίνεται στο πλάσμα. Το 95% του χαλκού πλάσματος βρίσκεται δεσμευμένο στη σερουλοπλασμίνη. Ο βασικός της ρόλος είναι να μεταφέρει τον χαλκό σε εξωηπατικούς ιστούς, ενώ έχει και άλλες λειτουργίες³⁷.

Η φυσιολογική σημασία του χαλκού έγκειται στο γεγονός ότι είναι συστατικό πολλών ενζύμων και ταυτόχρονα εμπλέκεται στο σχηματισμό των λευκοκυττάρων και ερυθροκυττάρων του αίματος, στην απολιθοποίηση των οστών, στη σύνθεση της ελαστίνης και του κολλαγόνου, ενώ συμμετέχει και στην αντιοξειδωτική προστασία³⁸. Υψηλά επίπεδα ανιχνεύονται σε γυναίκες (εξαιτίας των υψηλότερων επιπέδων σερουλοπλασμίνης που διεγείρονται από τα οιστρογόνα της εγκυμοσύνης και τη χρήση αντισυλληπτικών), σε καπνιστές, σε κυρρωτικές, κακοήθεις και φλεγμονώδεις καταστάσεις³⁷. Η έλλειψη σε χαλκό συνίσταται σε ουδετεροπενία, μικροκυτταρική και υποχρωμική αναιμία, απάθεια, υποθερμία, υποτονία, υποχρωματισμό δέρματος και μαλλιών, αλλαγές στο κεντρικό νευρικό σύστημα, χαμηλά επίπεδα χαλκού και σερουλοπλασμίνης πλάσματος. Σοβαρού τύπου έλλειψη είναι σπάνια. Το δεσμευτικό φάρμακο πενικιλλαμίνη (που χρησιμοποιείται στη θεραπευτική αγωγή των ασθενών με νόσο του Wilson) και τα αμινοξέα της παρεντερικής διατροφής μπορεί να αυξήσουν τη νεφρική του απέκκριση³⁸.

Η έλλειψη σε χαλκό μπορεί να διορθωθεί με πρόσληψη 1mg/ημέρα. Οι πλουσιότερες διαιτητικές πηγές χαλκού είναι τα σπλάχνα, ιδιαίτερα το συκώτι και τα εντόσθια, τα θαλασσινά, όπως τα μύδια, οι γαρίδες, ο σολομός και ο αστακός. Υψηλή περιεκτικότητα σε χαλκό, επίσης, έχουν οι ξηροί καρποί, τα αποξηραμένα φρούτα, τα μανιτάρια, τα ξηρά φασόλια, τα μαυρομάτικα φασόλια και το ψωμί ολικής άλεσης. Η σκόνη κακάο, η σοκολάτα και τα παράγωγά της αποτελούν πλούσιες πηγές χαλκού³⁹.

Η απορρόφηση, βέβαια, του διατροφικού χαλκού στον ανθρώπινο οργανισμό, υπολογίζεται ότι αγγίζει το 63-67%. Στις τυπικές δίαιτες, ωστόσο, των αναπτυγμένων κρατών, η μέση πραγματική ποσότητα χαλκού που απορροφάται είναι 30-40%. Οι φυσικές και χημικές επεξεργασίες των τροφίμων συχνά μειώνουν περαιτέρω την αρχική περιεκτικότητα του μετάλλου. Ιδιαίτερα οι χημικές επεξεργασίες, όπως η οξείδωση που λαμβάνει χώρα από την έκθεση στον αέρα ή την παρουσία οξειδωτικών παραγόντων, μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα του χαλκού³⁷.

Τα κλινικά αποτελέσματα από την έλλειψη διαιτητικού χαλκού στη νηπιακή ηλικία συνίστανται σε αναιμία, ουδετεροπενία και αλλαγές στα οστά. Η έλλειψη του διαιτητικού χαλκού στις μητέρες κατά την κυοφορία, μπορεί να οδηγήσει σε ατελείς γεννήσεις, ενώ έχουν παρατηρηθεί και τερατογεννήσεις σε διαβητικές (in vitro). Τα φυσιολογικά όρια είναι τα εξής (Πίνακας 4)⁴⁰:

Πίνακας 4. Φυσιολογικά επίπεδα χαλκού ορού ανά ηλικιακή ομάδα.

Άνδρες	Γυναίκες	Κύηση	Ηλικία 6-12 ετών	Νήπια
70 – 140 µg/dl	80 – 155 µg/dl	120 – 300 µg/dl	80 – 190 µg/dl	20 – 70 µg/dl
11 – 22 µmol/L	12.6–24.4 µmol/L	18.9–47.2 µmol/L	12.6–29.9 µmol/L	3.1 – 11 µmol/L

Η συγκέντρωση του χαλκού στο πλάσμα χρησιμοποιείται κυρίως σαν δείκτης για τη μέτρηση εφοδιασμού του διαιτητικού χαλκού. Αυτό βέβαια συμπεριλαμβάνει κάποιους περιορισμούς, καθώς η συγκέντρωση του χαλκού στο πλάσμα κυμαίνεται ανάλογα με την ηλικία, την άσκηση, την κατάσταση υγείας και δεν αυξάνεται μετά

από γεύμα, ούτε μειώνεται κατά τη διάρκεια σύντομης νηστείας. Η Αυστριακή μελέτη για τη Θρεπτική Κατάσταση (Austrian Study on Nutritional Status, ASNS) παρέχει στοιχεία για προσλήψεις θρεπτικών συστατικών και αντίστοιχες συγκεντρώσεις πλάσματος, ώστε να αξιολογηθεί η καταλληλότητα του χαλκού πλάσματος ως δείκτης πρόσληψης διαιτητικού χαλκού. Αξιολογήθηκε η διαιτητική πρόσληψη χαλκού και άλλων σχετικών θρεπτικών συστατικών με εβδομήμερο ζυγισμένο διατροφικό ημερολόγιο από 2400 παιδιά προσχολικής ηλικίας και σχολικής ηλικίας μεταξύ 4-19 ετών. Οι συσχετίσεις μεταξύ συγκεντρώσεων πλάσματος και πρόσληψης θρεπτικών συστατικών διενεργήθηκαν με το μοντέλο stepwise linear regression. Τα αποτελέσματα επέδειξαν ότι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του χαλκού πλάσματος δεν είναι ικανοποιητικός δείκτης για την πρόβλεψη πρόσληψης χαλκού από διαιτητικά ιστορικά. Ένας καλύτερος δείκτης θα ήταν η εκτίμηση εκείνων των τροφίμων, που αποτελούν την επικρατούσα πηγή πρόσληψης διαιτητικού χαλκού (food frequency questionnaire). Η υψηλότερη επιρροή στη συγκέντρωση του χαλκού πλάσματος βρέθηκε για την πρόσληψη κρέατος⁴¹.

Όσον αφορά στη βιοδιαθεσιμότητα του χαλκού, η βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι ο χαλκός είναι λιγότερο βιοδιαθέσιμος στις φυτοφαγικές δίαιτες, παρά στις σύνθετες. Μελέτη σε ασθενείς με νόσο του Wilson που ήταν γαλακτοφυτοφάγοι κατ'επιλογήν και δεν είχαν συμμορφωθεί με τη θεραπεία δέσμευσης χαλκού, χρησιμοποιούσαν τη δίαιτα σα θεραπεία διατήρησης. Στην ίδια μελέτη υποστηρίζεται ότι οι φαινομενικά υγιείς φυτοφάγοι, μπορεί να βρίσκονται σε κίνδυνο για έλλειψη διατροφικού χαλκού³⁵.

Ωστόσο σε μια άλλη μελέτη σε υγιείς γαλακτοφυτοφάγους και σε μη φυτοφάγους, φάνηκε ότι ο χαλκός πλάσματος και η σερουλοπλασμίνη πλάσματος δεν

επηρεάστηκαν από τη διαίτα. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής υποδεικνύουν ότι οι φυτοφαγικές δίαιτες μπορεί να μειώνουν ελαφρά το χαλκό πλάσματος, αλλά η μείωση αυτή δεν οφείλεται στη μειωμένη απορρόφηση από τη διαίτα. Στη μελέτη αυτή η διατροφή δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα χαλκού ή σερουλοπλασμίνης. Η εμφανής απορρόφηση χαλκού δε συσχετίστηκε, λοιπόν, με τα επίπεδα χαλκού ή σερουλοπλασμίνης στον ορό των υγιών ανθρώπων⁴².

Το οξικό άλας ψευδαργύρου έχει δημιουργηθεί για τη θεραπευτική αγωγή της νόσου του Wilson. Έχει εγκριθεί από το FDA των Ηνωμένων Πολιτειών ως θεραπεία διατήρησης για τους ενήλικες και τους παιδιατρικούς ασθενείς και η λειτουργία του έγκειται στο ότι εμποδίζει την απορρόφηση του χαλκού από τη εντερική οδό. Προκαλείται αρνητικό ισοζύγιο χαλκού από τον αποκλεισμό όχι μόνο της απορρόφησης του διαιτητικού χαλκού, αλλά και της επαναρρόφησης του ενδογενώς παραγόμενου χαλκού από τη σίελο, τα γαστρικά και εντερικά υγρά. Βέβαια, όπως όλες οι θεραπείες που δεσμεύουν το χαλκό, μετά από μεγάλη χρονική περίοδο, μπορεί να προκαλέσει έλλειψη σε χαλκό. Μια τέτοια συνέπεια θα πρέπει να αποφευχθεί ιδιαίτερα στα παιδιά, διότι ο χαλκός είναι απαραίτητος για την ανάπτυξή τους⁴³.

Σε μια μελέτη που έγινε σε τέσσερα παιδιά με νόσο του Wilson, μετρήθηκε ο χαλκός ορού και ο ψευδάργυρος ορού, ενώ βρίσκονταν στην αρχική τους θεραπεία με D-πενικιλλαμίνη. Τα αποτελέσματα επέδειξαν σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης τόσο του χαλκού όσο και του ψευδαργύρου ορού. Η D-πενικιλλαμίνη φαίνεται να μεταβάλλει το μεταβολισμό του χαλκού και του ψευδαργύρου. Το μέγεθος της μεταβολής αυτής δεν είναι μόνο δοσοεξαρτώμενο, αλλά σχετίζεται και με την επάρκεια περιορισμού του χαλκού. Οι συγκεντρώσεις του χαλκού και του ψευδαργύρου θα πρέπει να μετρώνται, ώστε να αξιολογούνται τα οφέλη της θεραπείας καθώς και οι κίνδυνοι για εκδήλωση υποκλινικής έλλειψης ψευδαργύρου⁴⁴.

Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί ότι η συσσώρευση του χαλκού στο ήπαρ των ασθενών με νόσο του Wilson, μπορεί να προκαλέσει τραυματισμό του ήπατος, εάν δε θεραπευτούν με δεσμευτικά φάρμακα κατά του χαλκού. Επιπλέον, η συσσώρευση χαλκού μπορεί να αυξήσει κατά 100 φορές τον σχετικό κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος σε ασθενείς με πρωταρχική αιμοχρωμάτωση. Οι υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού (πάνω από τις φυσιολογικές), μπορούν να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό νεοπλασματος και καρκίνο, με την καταστροφή του DNA από τις τοξικές ελεύθερες ρίζες⁴⁵.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένα από τα διαγνωστικά τεστ που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση ασθενών με νόσο του Wilson είναι η μέτρηση της σερουλοπλασμίνης ορού. Επίπεδα χαμηλότερα των 20mg/dL, έχουν χαρακτηριστεί επαρκή για τη διάγνωση της νόσου, ιδίως εάν συσχετιστούν με τα δακτυλίδια Kayser-Fleischer στους οφθαλμούς (φυσιολογικά όρια σερουλοπλασμίνης 20-45mg/dL). Η χρήση όμως του διαγνωστικού αυτού δείκτη είναι περισσότερο περίπλοκη, καθώς ορισμένοι ετεροζυγώτες της νόσου έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τους ομοζυγώτες ασθενείς. Περίπου 20% των ετεροζυγωτών παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα σερουλοπλασμίνης ορού. Σε μια πρόσφατη περίληψη μελετών που σχετίζονται με τη νόσο του Wilson, αναφέρεται ότι οι ετεροζυγώτες, μπορεί να έχουν χαμηλές συγκεντρώσεις σερουλοπλασμίνης ορού, οριακά φυσιολογική απέκκριση χαλκού από τα ούρα και μέτρια αυξημένη συγκέντρωση χαλκού ήπατος. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου δεν είναι γνωστό να παρουσιάζονται στους φορείς (ετεροζυγώτες), αν και η υπόθεση αυτή δεν έχει αποκλειστεί επαρκώς στις μεγαλύτερες ηλικίες⁴⁶.

Σε μια έρευνα εξετάστηκε ο ιστός ήπατος εννέα αδερφών, ώστε να καθοριστεί εάν οι προσυμπτωματικοί ασθενείς της νόσου του Wilson διαφέρουν από τους

ετεροζυγους φυσιολογικούς φορείς. Παρατηρήθηκαν αλλαγές στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενδεικτικά της τοξικότητας του χαλκού, τόσο στους ετεροζυγώτες όσο και στους γονοτυπικά αβέβαιους ασθενείς⁴⁷.

Παρόμοια μελέτη στόχευε στην εκτίμηση ανώμαλων ευρημάτων σε ετεροζυγώτες της νόσου σε Ιαπωνικό πληθυσμό. Τα επίπεδα σερουλοπλασμίνης και χαλκού βρέθηκαν αφύσικα χαμηλά σε 28.6% και 35% ετεροζυγώτες, αντίστοιχα. Η μελέτη αυτή καταλήγει στο ότι όταν εξετάζονται ασθενείς και οι οικογένειές τους για τη νόσο του Wilson, θα πρέπει να δίνεται μεγάλη βαρύτητα στις ανώμαλες εργαστηριακές τιμές των ετεροζυγωτών⁴⁸.

Τέλος σε μια πιλοτική μαζική μελέτη στην Κορέα για τη διάγνωση ασθενών με νόσο του Wilson, χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση της σερουλοπλασμίνης ορού σε παιδιά από 3 μηνών έως και 15 χρονών. Δεν υπήρξαν διαφορές σχετιζόμενες με το φύλο, αλλά ούτε σε σχέση με την ηλικία. Όλοι οι ασθενείς είχαν πολύ χαμηλά επίπεδα σερουλοπλασμίνης, αλλά το 5% αυτών είχαν φυσιολογικές τιμές. Οι ετεροζυγώτες που εξετάστηκαν παρουσίαζαν φυσιολογικά επίπεδα. Στη μελέτη αυτή συστήνεται περιορισμός του διαιτητικού χαλκού στη νήπια που πάσχουν, καθώς μπορεί να αποβεί ευεργετική για αυτά⁴⁹.

ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Με την πάροδο των χρόνων όλο και περισσότερες γενετικές μελέτες είναι διαθέσιμες προς κλινική χρήση, όμως μόνο γενεαλογικές αναλύσεις με χρήση απλοτύπων βασισμένες στον πολυμορφισμό του υπεύθυνου για τη νόσο γονιδίου, είναι εμπορικά διαθέσιμες από εξειδικευμένα κλινικά εργαστήρια. Η ανάλυση αυτή

απαιτεί τον εντοπισμό ενός ασθενή μέσα στην οικογένεια με κλινικές και βιοχημικές μελέτες όπως αναφέρθηκαν παραπάνω. Αφού καθορισθεί ο απλότυπος ή/και η μετάλλαξη στο ATP7B γονίδιο του ασθενή εξετάζονται οι ίδιες περιοχές του DNA στους συγγενείς πρώτου βαθμού προκειμένου να διαπιστωθεί εάν είναι υγιείς, ετερόζυγοι ή ασθενείς^{50,51}. Μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί προγεννητικός έλεγχος, ωστόσο έχει περιορισμένη κλινική εφαρμογή αν και η πρόωπη διάγνωση θα επέτρεπε την έγκαιρη αντιμετώπιση της νόσου⁵².

Η εφαρμογή της απευθείας γενετικής ανάλυσης είναι προς το παρόν περιορισμένη καθώς οι περισσότεροι ασθενείς είναι συνδυασμένοι ετεροζυγώτες με διαφορετική μετάλλαξη σε κάθε αλληλίο. Μέχρι τώρα περισσότερες από 250 μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί στο γονίδιο ATP7B (Wilson Database: www.mcgden.med.ualberta.ca/database.html)⁵³. Συνεπώς το εύρος των μεταλλάξεων αποκαλύπτει τη μεγάλη ετερογένειά τους και φαίνεται να σχετίζεται με την εκάστοτε γεωγραφική περιοχή. Ωστόσο, η γνώση για τα λειτουργικά αποτελέσματα των μεταλλάξεων είναι ακόμα πολύ περιορισμένη⁵⁴. Η ετερογένεια των μεταλλάξεων και των φαινοτύπων απαιτεί εκτενή μελέτη με σκοπό τον ακριβή προσδιορισμό του φαινοτύπου. Επίσης, οι γνώσεις που σχετίζουν τις μεταλλάξεις του γονιδίου με τη γεωγραφική περιοχή είναι ελλιπείς.

Η πιο συχνά εμφανιζόμενη μετάλλαξη του γονιδίου που παρατηρείται στην κεντρική και ανατολική Ευρώπη είναι η H1069Q στο εξώνιο 14. Η συχνότητα του αλληλίου μεταξύ των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο Wilson αγγίζει το 40% των προοπτικών μελετών⁵⁵. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη που έλαβε χώρα στην Ουγγαρία, εξετάστηκε η συχνότητα εμφάνισης των πιο κοινών μεταλλάξεων του γονιδίου σε 42 ασθενείς. Οι μεταλλάξεις που αναγνωρίστηκαν ήταν στα εξώνια 8, 13, 15 και 18. Η μετάλλαξη H1069Q βρέθηκε σε 27 ασθενείς (64,3%) εκ των οποίων οι 9

ήταν ομόζυγοι και οι 18 συνδυασμένοι ετερόζυγοι. Σε ένα μεγαλύτερο δείγμα ασθενών στην ανατολική Γερμανία βρέθηκε επίσης υψηλή συχνότητα του αλληλίου H1069Q όπως και σε παρόμοια μελέτη που έλαβε χώρα σε περιοχή της Γερμανίας. Σε αντίστοιχες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη Ρωσία, Αυστρία και Ουγγαρία τα αποτελέσματα ισχυροποίησαν την υπόθεση ότι η πιο συχνά εμφανιζόμενη μετάλλαξη στην Ανατολική Ευρώπη είναι η H1069Q⁵⁶.

Σε άλλη μελέτη που διενεργήθηκε σε πληθυσμό της Πολωνίας, 148 ασθενών με νόσο του Wilson, εξετάστηκε η συχνότητα εμφάνισης των H1069Q και Gly1267Lys μεταλλάξεων. Η πρώτη παρουσιάζεται στο 57% και η δεύτερη στο 9,1% του δείγματος. Μελετήθηκε επίσης η πιθανή συσχέτιση του γονοτύπου των μεταλλάξεων με την ηλικία έναρξης της νόσου και με την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων χωρίς κανένα όμως θετικό αποτέλεσμα. Η H1069Q μετάλλαξη εμφανίστηκε επίσης στο 38% των χρωμοσωμάτων πληθυσμών της Βόρειας Αμερικής και της Σουηδίας. Η συχνότητα του αλληλίου ωστόσο εμφανίζεται μόνο στο 17% σε βρετανικό πληθυσμό και στο 13% μη-μεσογειακού πληθυσμού της Σαρδηνίας, ενώ δεν ανιχνεύτηκε σε πληθυσμούς χωρών της Ασίας⁵⁷.

Μεγάλη γενετική μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς της νόσου του Wilson μεσογειακής καταγωγής. Αναλύθηκαν 136 χρωμοσώματα 73 εκ των οποίων ήταν ιταλικής, 18 σαρδηνικής, 2 ισπανικής και 43 τουρκικής προέλευσης. Βρέθηκαν 50 διαφορετικές μεταλλάξεις από τις οποίες οι 19 αναφέρθηκαν για πρώτη φορά (Πίνακας 5). Τα νέα στοιχεία της μελέτης αυτής καθώς και άλλων παρομοίων μελετών που έχουν ως σκοπό την εύρεση των πιο συχνών μεταλλάξεων καθώς και νέων, βελτιώνουν τη δυνατότητα πρόληψης της νόσου και γενετικής συμβουλευτικής⁵⁸.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις στους Μεσογειακούς πληθυσμούς

Μετάλλαξη	Αριθμός των χρωμοσωμάτων	%
Ηπειρωτική Ιταλία		
His1069Gln	39	17.5
2530delA	20	9
2299insC	13	6
Arg969Gln	10	4.5
Arg1319ter	9	4
Gly626Ala	7	3.1
Σαρδηνία		
246delC	13	8.5
Val146Met	12	7.9
Τουρκία		
Thr1220Met	10	10

Παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 24 οικογένειες ελληνικής καταγωγής, εντοπίστηκαν δεκαέξι μεταλλάξεις εκ των οποίων οι έξι αναφέρθηκαν για πρώτη φορά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι η νόσος παρουσιάζει μια μεγάλη αλληλική ετερογένεια στον ελληνικό πληθυσμό. Η πιο συχνή μετάλλαξη ήταν η H1069Q με συχνότητα εμφάνισης 28,9%⁵⁹. Σε ελληνικό πληθυσμό έχει διεξαχθεί μόνο μία ακόμη μελέτη, όπου εντοπίστηκαν άλλες δώδεκα διαφορετικές μεταλλάξεις εκ των οποίων οι τέσσερις ήταν καινούριες⁶⁰.

Στους Κανάριους νήσους της Ισπανίας βρέθηκε πολύ υψηλή συχνότητα της νόσου και ιδιαίτερα μιας σπάνιας μετάλλαξης, της Leu708Pro. Ιατρικά ιστορικά των νοσοκομείων επέδειξαν συχνότητα της Wilson 1/2600 ενώ στους άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς είναι 1/30000. Σε κανέναν από τους ασθενείς της μελέτης δε βρέθηκε η μετάλλαξη His1069Gln. Αν και οι Κανάριοι νήσοι υπήρξαν το σταυροδρόμι για το ταξίδι προς την Αμερική, φαίνεται ότι μεγάλο μέρος του πληθυσμού τους παρέμεινε σχετικά απομονωμένο. Η παρούσα μελέτη επίσης ενισχύει περισσότερο την υπόθεση ότι επιπρόσθετοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, καθώς και άλλοι γενετικοί επηρεάζουν τη φαινοτυπική εκδήλωση της νόσου⁶¹.

Υψηλή συχνότητα επίσης της νόσου, βρέθηκε σε πληθυσμό του Ισραήλ, σε μια γενετική και επιδημιολογική μελέτη. Το μέγεθος της συχνότητας αυτής

αποδόθηκε σε ομοαίματες συζεύξεις των ανθρώπων του πληθυσμού. Στην ίδια μελέτη εξετάστηκαν τα επίπεδα χαλκού και σερουλοπλασμίνης ορού, στους υγιείς συγγενείς των ασθενών. Φάνηκε ότι η φαινοτυπική ποικιλομορφία στη νόσο μπορεί να οφείλεται εν μέρει σε αλληλεπίδραση του γονιδίου WND με άλλους γενετικούς ή μη γενετικούς τροποποιητές, όπως η ηλικία⁶².

Σε πληθυσμό της Κίνας διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου και του φαινοτύπου σε ασθενείς με νόσο του Wilson. Η πιο συχνή μετάλλαξη ήταν η Arg778Leu. Βρέθηκε ότι η μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων στους ομόζυγους αυτής της μετάλλαξης ήταν μικρότερη από ότι στους συνδυασμένους ετερόζυγους. Επίσης τα μέσα επίπεδα της σερουλοπλασμίνης των ομοζυγωτών ήταν σημαντικά χαμηλότερα από αυτά των συνδυασμένων ετεροζυγωτών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παραπάνω μετάλλαξη δεν είναι ήπια. Βρέθηκε να έχει σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργία της ATP7B⁶³.

Λίγες μόνο μελέτες έχουν αξιολογήσει τη συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων και των κλινικών εκδηλώσεων. Η δυσκολία έγκειται στο ότι είναι μεγάλος ο αριθμός των διαφορετικών μεταλλάξεων καθώς και στο ότι οι περισσότεροι ασθενείς είναι συνδυασμένοι ετεροζυγώτες. Σε μια μελέτη των Thomas et al. γονοτυπικής-φαινοτυπικής συσχέτισης σε ομόζυγους ασθενείς για μία μετάλλαξη, υποδείχθηκε ότι ο τύπος της μετάλλαξης μπορεί να επηρεάσει τη σοβαρότητα της εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας. Για παράδειγμα η αρχική εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ασθενών με παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη, όπως στη His1069Gln, όσον αφορά τόσο την ηλικία έναρξης όσο και τις ηπατικές και νευρολογικές εκδηλώσεις⁶⁴.

Άλλες μελέτες όμως έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών, σύμφωνα με τις οποίες η His1069Gln μετάλλαξη δε συσχετίζεται με

καθυστέρηση της εμφάνισης των νευρολογικών συμπτωμάτων. Φαίνεται δε πολύ πιθανό ότι η μετάλλαξη αυτή μπορεί να μειώνει αλλά να μην καταργεί τη μεταφορά του χαλκού ενώ ταυτόχρονα η πρωτεΐνη ATP7B σε αυτή την περίπτωση εμφανίζει μια υπολλειμματική ικανότητα απέκκρισης του χαλκού⁶⁵. Άλλες μεταλλάξεις όπως προσθήκες, ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις, μπορεί να προκαλέσουν πιο σοβαρές συνέπειες στο μεταβολισμό του χαλκού και να οδηγήσουν σε διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις. Συμπερασματικά, η συσχέτιση μετάλλαξης-φαινότυπου είναι δύσκολη καθώς η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι σπάνια, ενώ οι περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνονται επίσης να επηρεάζουν την κλινική ποικιλομορφία⁶⁴.

ΣΚΟΠΟΣ

Όπως παρουσιάστηκε στη βιβλιογραφική ανασκόπηση, υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στις μεταλλάξεις καθώς και στους φαινοτύπους τόσο ανά γεωγραφική περιοχή όσο και στην ίδια περιοχή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εμφανίζονται αρκετές ελλείψεις στην έρευνα, ιδιαίτερα σε πληθυσμούς ελληνικής καταγωγής. Επομένως στόχος της μελέτης αυτής είναι να διευρυνθεί η ανάλυση των μεταλλάξεων της νόσου του Wilson σε μια περιοχή που παρουσιάζει υψηλή συχνότητα εμφάνισης. Σημαντική κρίθηκε επίσης η διατροφική αξιολόγηση ομοζυγωτών ασθενών, ασυμπτωματικών φορέων της νόσου (ετεροζυγώτες) καθώς και ομάδας ελέγχου υγιών ατόμων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η διατροφική αξιολόγηση δεν έχει μελετηθεί προηγουμένως και δεν υπάρχει σχετική βιβλιογραφία. Εξίσου σημαντική είναι η γενετική και η διατροφική συμβουλευτική.

Η Κρήτη είναι ανάμεσα στις περιοχές της Ευρώπης όπου παρατηρείται υψηλή συχνότητα περιστατικών της νόσου του Wilson. Μέχρι και τις μέρες μας καταγράφονται αρκετοί θάνατοι, τόσο ηλικιωμένων όσο και νεαρών ατόμων από αυτή την ασθένεια στην περιφέρεια της Κρήτης. Κάποιοι από τους λόγους που συμβαίνει αυτό ακόμη και σήμερα, είναι η ελλιπής ενημέρωση του εντόπιου πληθυσμού καθώς και η ομοαίματη σύζευξη συγγενών πρώτου βαθμού. Ταυτόχρονα, η απόκρυψη της ύπαρξης της ασθένειας με σκοπό την αποφυγή του στιγματισμού αυτών των ανθρώπων στην κλειστή τοπική κοινωνία, έχει σαν αποτέλεσμα να εντείνεται το πρόβλημα.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης θα μπορέσουν να δώσουν απαντήσεις σε σημαντικά ερωτήματα και κενά της βιβλιογραφίας, όπως: ποιο είναι το μέγεθος της συχνότητας της νόσου σε ελληνικό πληθυσμό, ποιες είναι οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται, καθώς και αν υπάρχουν γονοτυπικές και φαινοτυπικές συσχετίσεις στη νόσο του Wilson. Επιπλέον, θα εντοπιστούν τυχόν διαφορές στα επίπεδα χαλκού και σερουλοπλασμίνης στον ορό μεταξύ των φορέων και των υγιών, καθώς και μεταξύ των φορέων και των ασθενών. Σημαντική, επίσης, θα είναι η εύρεση ή μη συσχέτισης μεταξύ πρόσληψης του διαιτητικού χαλκού και επιπέδων χαλκού και σερουλοπλασμίνης στον ορό των ασθενών, των φορέων και της ομάδας ελέγχου. Τέλος, στη παρούσα μελέτη θα διερευνηθεί αν οι ασθενείς, που λαμβάνουν τη φαρμακευτική τους αγωγή, έχουν τα επιθυμητά επίπεδα χαλκού στο αίμα ή βρίσκονται σε κίνδυνο έλλειψης χαλκού και αν τα επίπεδα διαφοροποιούνται ανάλογα με τη διαιτητική πρόσληψη χαλκού.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σε ορεινές περιοχές της Κρήτης και συγκεκριμένα στο Νομό Ηρακλείου και Ρεθύμνου παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα της νόσου. Πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση σε 156 κατοίκους για την εύρεση ασθενών και φορέων (ετεροζυγωτών) της νόσου του Wilson σε απομονωμένες ορεινές περιοχές. Η λήψη φλεβικού αίματος έγινε παρουσία ιατρικής και νοσηλευτικής ομάδας, σε σωληνάκια με EDTA. Παραλήφθηκαν 5-10ml φλεβικού αίματος από τον κάθε κάτοικο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20°C , μέχρι να ξεκινήσει η διαδικασία της απομόνωσης του DNA.

Για τη διάγνωση της νόσου απαιτήθηκε τουλάχιστον ένα από τα κύρια κριτήρια: τα δακτυλίδια Kayser-Fleischer, χαμηλά επίπεδα σερουλοπλασμίνης ορού και υψηλή ηπατική περιεκτικότητα σε χαλκό. Επίσης, απαιτήθηκαν τουλάχιστον δύο από τα παρακάτω δευτερεύοντα κριτήρια: ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού για τη νόσο του Wilson, τυπικές νευρολογικές και ψυχιατρικές εκδηλώσεις, παρουσία ηπατικής νόσου, ανωμαλίες στο μεταβολισμό του χαλκού και συμβατή με τη νόσο ηπατική ιστολογία. Η γενετική ανάλυση εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου καθώς και από την τοπική Επιτροπή Βιοηθικής. Όλοι οι μετέχοντες στην ερευνητική μελέτη υπέγραψαν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής.

Μετά την αιμοληψία ακολούθησε προσωπική συνέντευξη με τον κάθε μετέχοντα, ξεχωριστά, με σκοπό τη διατροφική του αξιολόγηση. Χρησιμοποιήθηκαν τριήμερες ανακλήσεις 24ώρου, καθώς και προπλάσματα τροφίμων για την ακριβή

καταγραφή των αναφερόμενων ποσοτήτων. Πραγματοποιήθηκαν ανθρωπομετρικές μετρήσεις, ύψους και βάρους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΛΑΣΤΙΚΑ-ΓΥΑΛΙΚΑ

Τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι σωληνάκια Falcon των 15ml, πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης των 5 ml, ακροφύσια (Greiner) των 2 μl, 100μl, 1000μl, σωληνάκια Eppendorf των 1,5 ml, 0,5 ml και 0,2 ml.

Τα γυαλικά που χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, είναι: ποτήρια ζέσεως, κωνική φιάλη των 200 ml ογκομετρικοί κύλινδροι 25ml, 50ml, 100ml, 500ml, μπουκάλια Boro των 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml.

ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ

Τα μηχανήματα που απαιτήθηκαν είναι: φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5810R, υδατόλουτρο Memert, roller (Stuart Scientific Rollers SRTI), μηχανήμα PCR Primus 96 plus-NWGAGBIOTECH, αναδευτήρας Nuova-stir plate, vortex IKA minishaker MSI, pHμετρο microprocessor pHmeter, WTW Ph 537, ζυγαριά ακριβείας Gibertini, συσκευή ηλεκτροφόρησης, αυτόματες πιπέτες Gilson 2μl, 20μl, 100μl, 200μl, 1000μl, τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης, θάλαμος UV.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε από τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος των κατοίκων που συμμετείχαν στη μελέτη σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Miller et al (1). Η όλη διαδικασία απομόνωσης έχει διάρκεια 2 ημέρες:

1^η ημέρα

Λευκά κύτταρα που αντιστοιχούν σε 10 ml ολικού αίματος μεταφέρονται σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα Falcon των 50 ml. Στα κύτταρα προστίθεται μέχρι τα 40 ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (EL Buffer, EL: 150 Mm NH_4Cl , 10Mm KHCO_3 , 1 Mm EDTA, Ph 7,4). Το αιώρημα των κυττάρων παραμένει στον πάγο για 20min με τακτική ανάδευση για τη λύση των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 2000 rpm X 10min και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 1-2 φορές έως ότου το ίζημα πυρήνων να είναι κατά το δυνατόν απαλλαγμένο από προσμίξεις ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το ίζημα των πυρήνων διαλύεται ακολούθως σε 3 ml διαλύματος λύσης των πυρήνων (Nucleus lysis Buffer NL : 10 Mm Tris/ HCl, 400 Mm NaCl, 2 Mm EDTA Ph 8,4). Στο εναίωρημα προστίθεται 50 μl πρωτεΐνάση K (20 mg/dl) και 150 μl 20% SDS και τα δείγματα επωάζονται ολονύκτια σε υδατόλουτρο στους 56°C.

2^η ημέρα

Τα δείγματα απομακρύνονται από το υδατόλουτρο και μεταφέρονται σε πλαστικό σωλήνα Falcon των 15ml. Σε κάθε δείγμα, προστίθεται στη συνέχεια 1 ml NaCl 6 M και τα δείγματα αναδεύονται βίαια για 15-20 sec. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρωση για 10 min στις 3000 rpm, βίαιη ανάδευση για 15-20 sec και επαναφυγοκέντρωση, όπως και προηγουμένως, προκειμένου να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες. Το καθαρό

διαυγές υπερκείμενο κάθε δείγματος που περιέχει το DNA μεταφέρεται με γυάλινη Pasteur σε καθαρό σωλήνα Falcon των 50 ml. Στη συνέχεια προστίθεται 2,5 φορές ο όγκος του διαλύματος απόλυτη αιθανόλη. Το DNA που γίνεται ευδιάκριτο μετά τη προσθήκη της αιθανόλης δεσμεύεται με πιπέτα Pasteur. Το DNA ξεπλένεται αρκετές φορές με εμβάπτυση του σε διάλυμα 70% αιθανόλης και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως διαλύεται σε μικρό όγκο (300 – 500 ml) διαλύματος TE (Tris/ HCl 10 Mm, 0,1 Mm EDTA, Ph 7,4). Τα δείγματα του καθαρού DNA φυλάσσονται στους 4°C αφού προηγουμένως γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους με φωτομέτρηση.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΙΩΝ ΜΕ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Μετά την απομόνωση ακολουθεί εφαρμογή της μεθόδου PCR (Saiki et al, 1988). Αποτελεί μια νέα εξέλιξη στην τεχνολογία του DNA που έχει τεράστιες επιπτώσεις στη διαγνωστική. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας μικρής αλληλουχίας DNA από ένα πολύπλοκο μίγμα. Πρόκειται για μια αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται in vitro τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δυο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές, primers) για την in vitro σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα

του τελικού προϊόντος. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή εμφανίζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72 °C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95°C. Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει τη κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

1. Αποδιάταξη (template denaturation). Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94-96° C).
2. Σύνδεση εκκινητών (primer annealing). Οι δυο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δυο αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.
3. Επιμήκυνση (primer extension). Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών κατά την 5'-3'κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C.
4. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επαναυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές.

Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών. Το προϊόν της PCR χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη μελέτη του τμήματος που πολλαπλασιάστηκε.

Τα αντιδραστήρια που θα χρησιμοποιηθούν για τη PCR, για τον εντοπισμό της μετάλλαξης Q289X, στο εξόνιο 2c, διατηρούνται σε θερμοκρασία -20°C και είναι τα ακόλουθα:

- 3 μl buffer $\text{MgCl}(10\times)$
- 6 μl 5xQ-Solution
- 0,3 μl Taq DNA πολυμεράση
- 0,6 μl dNTP's
- 0,6 μl primer L (left primer-αριστερός εκκινητής)
- 0,6 μl primer R (right primer-δεξιός εκκινητής)
- 1 μl DNA
- 17,9 μl H_2O

Συνολικός όγκος 30 μl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

Forward: 5' – GTA AAT GAC ATG GGA TTT GAA G – 3'

Reverse: 5' – AGA ACT GGA AGA CCT GTG ATC T – 3'

Η διαδικασία της PCR γίνεται σε eppendorf των 0,2 ml ως εξής:

1. Αρχικά παρασκευάζεται μίγμα που αποτελείται από τα παραπάνω αντιδραστήρια στις αντίστοιχες ποσότητες, τα οποία καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας διατηρούνται σε πάγο. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει PCR, συν ένα επιπλέον, σε περίπτωση απώλειας. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και διατηρείται σε πάγο.
2. Σε κάθε eppendorf τοποθετούνται 29 μl από το μίγμα που παρασκευάστηκε.
3. Τοποθετείται 1 μl από κάθε δείγμα DNA στα eppendorf και γίνεται φυγοκέντρωση.

4. Τοποθετούνται τα εppendorfs στο μηχάνημα της PCR και πραγματοποιούνται τα ακόλουθα στάδια:

Βήμα 1^ο: 95°C για 10 min

Βήμα 2^ο: 95°C για 1 min

Βήμα 3^ο: 57°C για 1,5 min

Βήμα 4^ο: 72°C για 1,5 min: τα βήματα 2,3,4 x 32 φορές

Βήμα 5^ο: Αποθήκευση στους 8°C

Η διαδικασία καταλήγει σε προϊόν PCR 429 bp.

Για τον εντοπισμό της μετάλλαξης p.I1148T, ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με την παραπάνω, αλλά το εξόνιο 16 ενισχύεται με τους εκκινητές: (Forward: 5' – GCT GTT AAA AGG ATT GCA TGG – 3', reverse: 5' – AGG AGG ACT CTT TTG CCT GA – 3'). Οι συνθήκες της PCR ήταν:

Βήμα 1^ο: 95°C για 10 min

Βήμα 2^ο: 95°C για 1 min

Βήμα 3^ο: 60°C για 1,5 min

Βήμα 4^ο: 72°C για 1,5 min: τα βήματα 2,3,4 x 32 φορές

Βήμα 5^ο: Αποθήκευση στους 8°C

Η διαδικασία καταλήγει σε προϊόν 300 bp.

Για τον εντοπισμό της παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης p.G1176R στο εξόνιο 16, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με παραπάνω, με τη διαφορά ότι οι εκκινητές ήταν: (Forward: 5' – TGA CAG ACC ACG AGA TGA AAG G – 3'), (Reverse: 5' – TGG AGC CAG TGG AAA GAA TG – 3') και στο 4^ο βήμα η θερμοκρασία ήταν 61° C. Το προϊόν της PCR ήταν 235 bp.

ΕΛΕΓΧΟΣ PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Το πήκτωμα αυτό περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) 10mg/ml, το οποίο έχει την ιδιότητα να φωσφορίζει στο υπεριώδες φως. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αгарόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA ηλεκτροφορούνται, και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης αгарόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 2% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 3-3,1 Kb. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής:

1. Παρασκευάζεται πήκτωμα αгарόζης με ανάμιξη σε κωνική φιάλη 50 ml διαλύματος TBE αραιωμένου και 0.5 gr αгарόζης. Η κωνική μεταφέρεται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται ώστε να διαλυθεί η αгарόζη και να προκύψει διαυγές διάλυμα.
2. Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 3 μl βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/ml.
3. Το διάλυμα χύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφόρησης, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό ειδικά χτένια, ώστε να δημιουργηθούν “οπές”, καθώς πήζει το gel της αгарόζης. Στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης και πάνω από το gel προστίθενται 250 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE αραιωμένου.
4. Μέχρι να πήξει το gel (20 min) προετοιμάζονται τα δείγματα για την ηλεκτροφόρηση: Σε eppendorf τοποθετούνται 10μl από το προϊόν της PCR και 2 μl χρωστικής (Gel loading Dye).

5. Αφού πήξει το gel μεταφέρονται σε κάθε οπή αυτού ένα από τα παραπάνω δείγματα που αναμίχθηκαν με τη χρωστική. Σε μία από τις οπές του gel τοποθετείται ένας μάρτυρας των 8μl (DNA ladder, 50-1000bp).
6. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 150 Volts για 20 min περίπου.
7. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το gel παρατηρείται στο υπεριώδες. Η ύπαρξη ζωνών συγκεκριμένου μήκους υποδηλώνει ότι η διαδικασία της PCR έγινε με επιτυχία. Το μήκος κάθε ζώνης υπολογίζεται με σύγκριση της με το μάρτυρα, ο οποίος αποτελείται από κομμάτια DNA συγκεκριμένου μήκους (DNA ladder).

ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η πέψη γίνεται στο προϊόν της PCR με σκοπό την ανίχνευση πολυμορφισμών. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού, τα οποία αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για τη μετάλλαξη Q289X είναι το Mse I. Η διαδικασία της πέψης είναι η εξής:

Ημέρα 1^η:

1. Παρασκευάζεται μίγμα που περιέχει 1,5 μl ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), 0,25 μl BSA, 6,45 μl H₂O και 0,8 μl Mse I (4000U/ml) πολλαπλασιασμένα με τον αριθμό των δειγμάτων συν ένα για να καλυφθούν τυχόν απώλειες. Γίνεται ανάδευση σε vortex.
2. Σε eppendorf 0,5 ml τοποθετούνται 6 μl προϊόντος της PCR και 9μl από το μίγμα που προετοιμάστηκε. Γίνεται φυγοκέντρηση για καλύτερη ανάδευση.
3. Επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

Ημέρα 2^η:

1. Φτιάχνεται gel αγαρόζης 3% με ανάμιξη 4,5 gr αγαρόζης και 150 ml TBE αραιωμένου σε κωνική φιάλη. Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να προκύψει διαυγές διάλυμα.
2. Προστίθενται 9 μl βρωμιούχο αιθίδιο και ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.
3. Σε erppendorf αναμιγνύονται 10 μl από το προϊόν πέψης και 2 μl χρωστικής και γίνεται φυγοκέντρηση για καλύτερη ανάμιξη.
4. «Φορτώνονται» τα δείγματα στις οπές του gel και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 150 Volts για μια ώρα περίπου.
5. Το gel παρατηρείται στο υπεριώδες.
Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη μετάλλαξη p.I1148T είναι το BseNI, ενώ η διαδικασία είναι ίδια με την παραπάνω.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Αφού ολοκληρωθεί το ερευνητικό πρωτόκολλο, θα πραγματοποιηθεί στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, από το στατιστικό πακέτο SPSS 10.0 for Windows, 1999. Η επεξεργασία των τριήμερων ανακλήσεων 24ώρου θα γίνουν από το πρόγραμμα Nutritionist fiveTM, Version 2.2, 2000.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αποκάλυψαν υψηλή συχνότητα της νόσου του Wilson σε ένα μικρό, ορεινό χωριό κοντά στην πόλη του Ηρακλείου στη νήσο Κρήτη. Σύμφωνα με την τοπική ιστορία, στις αρχές του 20^{ου} αιώνα εγκαταστάθηκαν στο παραπάνω χωριό, τρεις οικογένειες. Η καταγωγή των δύο οικογενειών προέρχονταν από την πόλη των Ανωγείων, ενώ η μία από αυτές κατάγονταν από τη Μικρά Ασία (εικόνα 1Α, 1Β).

Για να εκτιμηθεί η συχνότητα της νόσου σε αυτή την περιοχή, ερευνήθηκε ο αριθμός των γεννήσεων στο χωριό κατά τη διάρκεια των τελευταίων 25 ετών και ο αριθμός των ασθενών με νόσο του Wilson για το ίδιο χρονικό διάστημα. Τα έξι από τα 90 βρέφη διαγνώστηκαν ως ασθενείς, συχνότητα που παρουσιάζεται ως η πιο υψηλή παγκοσμίως. Δύο από τους ασθενείς αρνήθηκαν τη συμμετοχή στη μελέτη. Στην παρούσα μελέτη, έλαβαν μέρος οι 3 ήδη διαγνωσθέντες ασθενείς, βρέθηκαν 22 φορείς, ενώ οι υπόλοιποι που συμμετείχαν βρέθηκαν υγιείς.

Εξετάστηκε, με τις γνωστές μεθόδους, για μεταλλάξεις το γονίδιο ATP7B στους τρεις ασθενείς με νόσο του Wilson. Οι δύο από αυτούς ήταν αδέρφια (αδερφός και αδερφή), που προέρχονταν από ομοαίματη σύζευξη των προγόνων τους, όπως παρουσιάζεται στο γενεαλογικό δένδρο (εικόνα 2). Η γενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι και οι δύο ήταν ομόζυγοι για την ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη p.Q289X (εικόνα 3). Το κορίτσι (VI10) παρουσίασε στην ηλικία των 6 ετών κοιλιακό πόνο και έμετο, ταχεία προοδευτική ηπατική ανεπάρκεια, που χρειάζονταν άμεση μεταμόσχευση ήπατος. Επιπλέον, εμφάνιζε τα κλασσικά βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου του Wilson (πίνακας 1). Ωστόσο, δεν παρουσίαζε τα δαχτυλίδια Kayser – Fleischer, ύστερα από εξέταση με ειδική λάμπα από εκπαιδευμένο οφθαλμολόγο.

Στην ασθενή χορηγήθηκε D-πενικιλλαμίνη, ενώ τα ηπατικά ένζυμα ήταν: SGOT (ASAT) 440 U/L, SGPT (ALAT) 720 U/L. Ο χαλκός ορού βρέθηκε 34 mg/dl (φυσιολογικές τιμές: 80-155 mg/dl), ενώ η σερουλοπλασμίνη ορού βρέθηκε < 7 mg/dl (φυσιολογικές τιμές: 21-50 mg/dl). Η ιστολογική εξέταση του ήπατος αποκάλυψε μακρο-κυστική στεάτωση, αλλά όχι νέκρωση, φλεγμονή, ίνωση, καθώς ούτε κίρρωση. Η συσσώρευση του χαλκού στο ήπαρ ήταν σημαντικά αυξημένη. Τα επίπεδα των ηπατικών της ενζύμων κατά τη διάρκεια της φαρμακευτικής αγωγής, καθόριζαν μια ασταθή κλινική νόσο.

Ο μικρός της αδερφός (VI-9) βρέθηκε, επίσης, ομόζυγος για την ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη p.Q289X. Κατά τη διάρκεια μιας εξέτασης σε ηλικία 6 ετών, το παιδί βρέθηκε χλωμό και ικτερικό. Κοιλιακή εξέταση αποκάλυψε την ύπαρξη ηπατομεγαλίας και ψηλαφητό σπλήνα. Τα ευρήματα από τη νευρολογική εξέταση ήταν φυσιολογικά, ενώ δεν υπήρχαν ενδείξεις ηπατικής εγκεφαλοπάθειας. Επιπλέον, το παιδί δεν παρουσίαζε τα δαχτυλίδια Kayser – Fleischer. Τα επίπεδα του χαλκού ορού ήταν αυξημένα στα 44mg/dl, ενώ τα επίπεδα της σερουλοπλασμίνης ήταν μειωμένα στα 3mg/dl. Στον ασθενή χορηγήθηκε D-πενικιλλαμίνη, πυριδοξίνη και σπιρονολακτόνη (εικόνα 4B). Ξεκίνησε, επίσης, διαίτα περιορισμένη σε χαλκό. Το παιδί είχε πολύ σημαντική βελτίωση μέσα στους επόμενους μήνες. Βέβαια, η βιοψία ήπατος αποκάλυψε λιπώδης διήθηση του ήπατος και μέτρια προοδευτική πυλαία ίνωση.

Ο τρίτος ασθενής, ένα νεαρό αγόρι 15 ετών, βρέθηκε να είναι συνδυασμένος ετεροζυγώτης για τρεις μεταλλάξεις, τις p.Q289X/p.I1148T/p.G1176R. Ο νεαρότερος υγιής αδερφός του ήταν ετεροζυγώτης (φορέας) για τις μεταλλάξεις p.I1148T/p.G1176R, ενώ η υγιής μητέρα τους ήταν ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη

p.Q289X. Επομένως, οι μεταλλάξεις p.I1148T και p.G1176R έχουν κληρονομηθεί ταυτόχρονα, όπως παρουσιάζεται στο γενεαλογικό δένδρο (εικόνα 5).

Η διάγνωση της νόσου έγινε στην ηλικία των 6 ετών του παιδιού. Τα επίπεδα του χαλκού ορού ήταν 32 mg/dl και τα επίπεδα της σερουλοπλασμίνης ήταν 4 mg/dl. Στον ασθενή χορηγήθηκε D-πενικιλλαμίνη (250 mg/ημέρα) και βιταμίνη B6 (25 mg/εβδομάδα). Εξαιτίας της μεγάλης αύξησης των τρανσαμινασών (SGOT 197U/L, SGPT 435U/L, γGT 157U/L) νοσηλεύτηκε σε κλινική και διακόπηκε η θεραπεία με την D-πενικιλλαμίνη. Επειδή τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων συνέχιζαν να αυξάνονται (SGOT 337 U/L, SGPT 587 U/L, γGT 175 U/L), μετά από δύο εβδομάδες επαναχορηγήθηκε θεραπεία D-πενικιλλαμίνης (25 mg/ ημέρα) μαζί με κορτιζόνη (3x5 mg/ ημέρα). Ένα μηνά μετά και αφού αυξήθηκε σταδιακά η δόση της D-πενικιλλαμίνης στα 125 mg/ ημέρα, η κλινική του κατάσταση σταθεροποιήθηκε και τα επίπεδα των τρανσαμινασών μειώθηκαν (εικόνα 4Γ).

Μία άλλη γυναίκα V4 όπως φαίνεται από το γενεαλογικό δένδρο είχε ένα παιδί που κατέληξε στην ηλικία των 10 ετών το 1986 από οξεία ηπατική ανεπάρκεια, εξαιτίας της νόσου του Wilson. Ο σύζυγός της, που κατέληξε από καρδιακή προσβολή και ήταν αδερφός του V9, πρέπει να ήταν ο φορέας της ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης p.Q289X. Ωστόσο, ο γενετικός έλεγχος για την εύρεση της ίδιας μετάλλαξης στη γυναίκα V4, έδειξε ότι δεν την είχε. Για τον λόγο αυτό, αναλύθηκε ολόκληρο το γονίδιο της, καθώς και των γιων της (V13 και V15) και έτσι ανακαλύφθηκε η μετάλλαξη c.398delT, που μέχρι τώρα δεν είχε αναφερθεί. Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα, έγινε η υπόθεση ότι το παιδί που κατέληξε από τη νόσο του Wilson, ήταν συνδυασμένος ετεροζυγώτης για τις μεταλλάξεις p.Q289X/ c.398delT.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η γενετική ανάλυση διενεργήθηκε σε δείγμα 156 ατόμων, εκ των οποίων οι 3 βρέθηκαν ασθενείς, οι 22 φορείς της νόσου και οι υπόλοιποι υγιείς. Σε 46 συμμετέχοντες στη μελέτη έγινε μέτρηση του χαλκού ορού και σερουλοπλασμίνης ορού καθώς και διατροφική αξιολόγηση (3 ασθενείς, 13 φορείς και 30 υγιείς, ως ομάδα ελέγχου). Τα γενικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (2).

Πίνακας 2. Γενικά χαρακτηριστικά του δείγματος (N=46).

Δείγμα	Ηλικία (έτη) (μ.ο. ± St.D)	Δείκτης μάζας σώματος (Kg/μ ²) (μ.ο. ± St.D)
Ασθενείς (N=3)	20 ± 5	23,06 ± 1,7
Φορείς (N=13)	37,7 ± 22	25,93 ± 4,5
Υγιείς (N=30)	25,2 ± 17	23,07 ± 4,69

Στο παραπάνω δείγμα διενεργήθηκε διατροφική αξιολόγηση, αφού είχε προηγηθεί η ανάκληση 24ώρου τριών ημερών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, όσον αφορά τα βασικά μακρο- και μικρο- θρεπτικά συστατικά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (3).

Πίνακας 3. Διατροφική αξιολόγηση του δείγματος (N=46)

	Ασθενείς (N=3) (μ.ο. ± St.D)	Φορείς (N=13) (μ.ο. ± St.D)	Υγιείς (N=30) (μ.ο. ± St.D)
Θερμίδες (Kcal)	2127 ± 661	1860 ± 831	1783 ± 692
% Πρωτεΐνη	17,5 ± 5,6	16,8 ± 5,0 ^a	13,9 ± 3,2
% Υδατανθρ.	40,7 ± 0,1	40,2 ± 4,9	43,8 ± 9,4
% Λίπος	42,1 ± 3,2	42,1 ± 4,7	43,4 ± 9,1
Φυτικές ίνες (γρ.)	15,2 ± 10,3	18,6 ± 9,6	17,4 ± 7,0
Ασβέστιο (mg)	781 ± 174,8	618,7 ± 426,9	734,2 ± 464,5
Βιταμίνη Ε (IU)	10,3 ± 2,4	14,2 ± 5,86	12,1 ± 10,6
Βιταμίνη Β ₆ (mg)	1,8 ± 1,0	1,74 ± 0,92	1,29 ± 0,68
Ψευδάργυρος (mg)	11,8 ± 8,1 ^b	10,53 ± 5,83 ^c	7,9 ± 3,7
Χαλκός (mg)	1,23 ± 0,5	3,37 ± 4,6	1,64 ± 1,19

^a P= 0.048

^b P= 0.044

^c P= 0.043

Όπως φαίνεται στον πίνακα, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην πρόσληψη θερμίδων, στο ποσοστό ενέργειας προερχόμενο από υδατάνθρακες και λίπος, στη βιταμίνη E, στην πυριδοξίνη (βιταμίνη B₆), καθώς και στην πρόσληψη διαιτητικού χαλκού. Ωστόσο, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φορέων και των υγιών στην πρόσληψη ενέργειας προερχόμενη από τις πρωτεΐνες. Επιπλέον, η πρόσληψη ψευδαργύρου βρέθηκε να διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ασθενών και υγιών και μεταξύ των φορέων και των υγιών. Οι αναλύσεις προέκυψαν από τη σύγκριση των μέσων με τη χρήση του Independent Samples T Test με ομάδα ελέγχου τους υγιείς.

Όσον αφορά στη πρόσληψη διαιτητικού χαλκού, φαίνεται ότι οι ασθενείς, ομοίως και οι υγιείς προσλαμβάνουν μικρότερη ποσότητα από τη συνιστώμενη, με πιθανότητα να παρουσιάσουν έλλειψη. Οι φορείς δε, φαίνεται ότι προσλαμβάνουν μεγαλύτερη ποσότητα από τη συνιστώμενη (2 mg/ ημέρα). Για το λόγο αυτό ακολούθησε μέτρηση του χαλκού ορού και της σερουλοπλασμίνης ορού, ώστε να εκτιμηθεί η διατροφική κατάσταση των ατόμων. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων (πίνακας 4).

Πίνακας 4. Επίπεδα χαλκού ορού και σερουλοπλασμίνης ορού στο δείγμα

Βιοχημικές μετρήσεις	Ασθενείς (N=3) (μ.ο. ± St.D)	Φορείς (N=13) (μ.ο. ± St.D)	Υγιείς (N=30) (μ.ο. ± St.D)
Χαλκός ορού (μg/dl)	17,0 ± 8,0	110,8 ± 23,3	131,7 ± 27,6
Σερουλοπλασμίνη ορού (mg/l)	29,6 ± 17,6	212,7 ± 39,2	233,1 ± 45,6

Όσον αφορά το χαλκό ορού, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών και των φορέων (p=0,000), μεταξύ των ασθενών και υγιών(p=0,000), καθώς και μεταξύ των φορέων και των υγιών (p=0,035) . Ο χαλκός ορού, μάλιστα των ασθενών, βρέθηκε εξαιρετικά χαμηλός σε σχέση με τις φυσιολογικές τιμές (70-140 μg/dl για τους άνδρες και 80-155 μg/dl για τις γυναίκες).

Σημαντικό είναι το εύρημα, ότι ο φορέας με τη διπλή μετάλλαξη (IV2), παρουσίασε πολύ χαμηλά επίπεδα χαλκού (62 $\mu\text{g/dl}$), καθώς και πολύ χαμηλά επίπεδα σερουλοπλασμίνης (147 mg/l).

Η σερουλοπλασμίνη ορού βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ασθενών και των φορέων ($p=0,000$) και μεταξύ των ασθενών και υγιών ($p=0,000$), μετά από σύγκριση των μέσων με Independent Samples T Test. Σημειώνεται ότι οι φυσιολογικές τιμές της σερουλοπλασμίνης ορού είναι 200-600 mg/l . Σημαντικό είναι το εύρημα ότι οι 6 φορείς από τους 13 που μελετήθηκαν (το 46%, δηλαδή των φορέων), ενώ παρουσίαζαν φυσιολογικές τιμές χαλκού, είχαν ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα σερουλοπλασμίνης ορού, κάτω των φυσιολογικών ορίων.

Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης διαιτητικού χαλκού και χαλκού ορού. Ομοίως, δεν βρέθηκε συσχέτιση διαιτητικού χαλκού και σερουλοπλασμίνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι μεταλλάξεις της ATP7B πρωτεΐνης, που προέρχονται από μια ορεινή περιοχή της Κρήτης. Επίσης, αξιολογήθηκε η διατροφική πρόσληψη των ατόμων με τη νόσο του Wilson, των φορέων αυτής καθώς και ομάδας ελέγχου. Όσον αφορά τις μεταλλάξεις, μέχρι πρόσφατα έχουν αναφερθεί 250 διαφορετικές, αποκαλύπτοντας τη μεγάλη ετερογένειά τους. Ωστόσο, είναι ακόμη πολύ λίγα γνωστά για τα λειτουργικά αποτελέσματα των περισσότερων μεταλλάξεων⁵⁴. Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν τέσσερις διαφορετικές μεταλλάξεις που προέρχονταν όλες από ασθενείς με νόσο του Wilson οι οποίοι διέμεναν στην ίδια περιοχή. Ανάμεσά τους οι δύο ήταν παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (p.I1148T και p.G1176R), η μία ήταν ανερμηνεύσιμη (p.Q289X) και η τελευταία ήταν η (c.398delT). Οι μεταλλάξεις p.Q289X και p.I1148T έχουν εντοπιστεί και στο παρελθόν σε ανάμεσα σε άτομα ελληνικού πληθυσμού ενώ η p.G1176R εντοπίζεται για πρώτη φορά σε δείγμα ελληνικού πληθυσμού. Η c.398delT αποτελεί μετάλλαξη που αναφέρεται για πρώτη φορά παγκοσμίως. Υψηλή συχνότητα άλλων μεταλλάξεων της νόσου του Wilson, κυρίως της p.H1069Q έχει πρόσφατα περιγραφθεί σε άλλες περιοχές της Ευρώπης⁵⁵. Η μετάλλαξη p.Q289X έχει, επίσης, ήδη περιγραφθεί σε ασθενείς με Σουηδική καταγωγή⁶⁶. Επιπλέον, δεν είναι γνωστές οι συνέπειες της p.G1176R μετάλλαξης στον φαινότυπο των ασθενών, καθώς δεν υπάρχουν μελέτες που να παρουσιάζουν αυτή τη μετάλλαξη ως την αμιγή αιτιολογία για την πρόκληση της νόσου ενώ την υποδεικνύουν ως έναν πολυμορφισμό.

Η συνύπαρξη των δύο παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων (p.I1148T/ p.G1176R) αναφέρεται επίσης για πρώτη φορά. Συνδυασμένοι ετεροζυγώτες που φέρουν τρεις μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί και σε άλλα γονίδια καθώς και σε παθολογίες άλλων

νόσων, όπως στο γονίδιο του υποδοχέα της LDL στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Τέτοιοι συνδυασμένοι ετεροζυγώτες (N543H+2393del9) + (W-18X+E256K) βρέθηκαν στην Ισπανία⁶⁷. Η υπολογιζόμενη συχνότητα αυτής της διπλής μετάλλαξης, εκτιμήθηκε 2,2%.

Η συχνότητα των μεταλλάξεων της νόσου του Wilson στην Ελλάδα είναι: p.Q289X (9.3%), p.I1148T (3.3%). Για την εύρεση της συχνότητας των παραπάνω μεταλλάξεων σε υγιή πληθυσμό αυτής της περιοχής, αναλύθηκε η παρουσία των μεταλλαγμένων αλληλίων ανάμεσα σε 156 κατοίκους. Οι δεκαέξι ήταν ετεροζυγώτες για την p.Q289X, ένας είχε διπλή μετάλλαξη και ένας είχε τη μετάλλαξη c.398delT, αυξάνοντας τη συχνότητα των ετεροζυγωτών για τη νόσο σε έναν προς έντεκα (1/11) ενώ η συχνότητα εμφάνισης της νόσου παγκοσμίως είναι 1/90. Από τις παραπάνω μεταλλάξεις η p.Q289X αναλογούσε στο 88,8% των χρωμοσωμάτων για τη νόσο του Wilson. Αυτή η εξαιρετικά υψηλή συχνότητα προφανώς αντικατοπτρίζει τη σημαντική απομόνωση και τον υψηλό βαθμό της ομοαίματης σύζευξης, για τόσες γενιές, σε αυτή την απομακρυσμένη περιοχή της Κρήτης. Υψηλή συχνότητα της νόσου (1 προς 2600) έχει καταγραφεί προηγουμένως και σε άλλες κομητείες, βορειανατολικά των Κανάριων Νήσων⁶¹, ενώ χαμηλότερη συχνότητα αναφέρθηκε σε πληθυσμούς της Σαρδηνίας (1 προς 7000)⁶⁸.

Ένας έμμεσος τρόπος για τον υπολογισμό της συχνότητας της νόσου, πρόσφατα υποδείχτηκε για τους Καυκάσιους των Ηνωμένων Πολιτειών⁶⁹. Οι συγγραφείς βρήκαν τη συχνότητα της πιο κοινής μετάλλαξης (p.H1069Q) που αναλογούσε στο 1/3 των μεταλλάξεων ανάμεσα στους ασθενείς. Στη συνέχεια, πραγματοποίησαν γενετικό έλεγχο σε ένα μεγάλο αριθμό νεογέννητων βρεφών για τον εντοπισμό της παραπάνω μετάλλαξης και τελικά πολλαπλασίασαν τη συχνότητα αυτή με τον αριθμό τρία.

Η διαφορετική εξέλιξη και έκβαση της νόσου, στους τρεις ομοζυγώτες ασθενείς με την ανερμηνεύσιμη p.Q289X μετάλλαξη, μπορεί να αποδοθεί στην αδιαφορία και την άρνηση της οικογένειας να αποδεχθεί τη σοβαρότητα της νόσου. Σε μία άλλη μελέτη που διενεργήθηκε σε έναν ισλανδικό πληθυσμό, η κλινική εικόνα των ασθενών ήταν πολύ διαφορετική ανάμεσά τους παρόλο που ήταν όλοι ομοζυγώτες για την ίδια μετάλλαξη⁷⁰.

Κοιτάζοντας πίσω στην ιστορία της Κρήτης μπορεί να εξηγηθεί ο μεγάλος αριθμός των μεταλλάξεων σε μία σχετικά περιορισμένη περιοχή. Οι αρχαιολογικές εργασίες στην περιοχή της νήσου αποκάλυψαν ότι κατοικούνταν από την έκτη χιλιετία π.Χ καθώς βρέθηκαν απολιθώματα της νεολιθικής εποχής στη Φαιστό και στην Κνωσό. Μετά από την επεκτεινόμενη χρήση του χαλκού, ο πληθυσμός του νησιού αυξήθηκε σημαντικά και άρχισαν οι εμπορικές επαφές με τις γειτονικές περιοχές της Μικράς Ασίας, των Κυκλάδων και της Αιγύπτου (2600 έως 1900 π.Χ). Ο λαμπρός Μινωικός πολιτισμός καταστράφηκε μετά από την έκρηξη του ηφαιστείου της Θήρας και τους μετασεισμούς που την ακολούθησαν (1700 έως 1450 π.Χ). Οι Αχαιοί εκμεταλλευόμενοι την καταστροφή του μινωικού πολιτισμού κατέλαβαν την Κνωσό και εδραίωσαν εκεί μια ισχυρή Αχαϊκή δυναστεία. Κατά τη διάρκεια του ενδέκατου αιώνα π.Χ η Ελλάδα άρχισε να κατακλύζεται από Αχαιούς και Δωριείς που εισέβαλλαν και στην Κρήτη. Οι νέοι κατακτητές έφεραν στο νησί τη γενικευμένη χρήση του σιδήρου. Το 67 π.Χ το νησί της Κρήτης, μετά από σκληρή αντίσταση δύο χρόνων πέρασε στα χέρια των Ρωμαίων. Το 330 μ.Χ μετά τη διάσπαση του ρωμαϊκού κράτους σε ανατολικό και δυτικό, η Κρήτη πέρασε στην κυριαρχία του Βυζαντίου. Κατά την περίοδο αυτή, οι Σαρακηνοί Άραβες εισέβαλαν στο νησί. Ωστόσο η Αραβοκρατία κράτησε μέχρι το 961 όπου μετά από πολύμηνη πολιορκία ο βυζαντινός Νικηφόρος Φωκάς συμπεριέλαβε το νησί πάλι στο Βυζαντινό κράτος. Το 1204 με την

κατάληψη της Κωνσταντινούπολης από τους Φράγκους, ο Λατίνος αυτοκράτορας παραχώρησε το νησί στον Βονιφάτιο Μονφερατικό, που το πούλησε στους Βενετούς το 1210. Η Ενετοκρατία διήρκησε τέσσερις αιώνες. Το 1645, 60.000 Τούρκοι με επικεφαλής το Γιουσούφ Πασά αποβιβάστηκαν στην Κρήτη και κατέλαβαν τα Χανιά και το Ρέθυμνο. Μετά από σκληρή πολιορκία 21 ετών, στις 27 Σεπτεμβρίου 1669, ο Χάνδακας, το τελευταίο προπύργιο αντίστασης παραδόθηκε από το Φραγκίσκο Μοροζίνη στον Τούρκο Αχμετ Κιοπρούλη. Το νησί παρέμεινε υπό την τουρκική κυριαρχία για περίπου δύο αιώνες και τελικά απελευθερώθηκε το 1898, όταν η Κρήτη ανακηρύχτηκε από τις Μεγάλες Δυνάμεις ως ανεξάρτητη «Κρητική Πολιτεία». Το 1913, επικυρώθηκε η τελική ένωση της Κρήτης με την υπόλοιπη Ελλάδα και υψώθηκε η ελληνική σημαία στο νησί. Το 1923 με την ανταλλαγή πληθυσμών, Έλληνες από την Ασία ήρθαν στην Κρήτη και μια μικρή ομάδα από αυτούς μετακινήθηκαν στην περιοχή που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη και αναμίχθηκε με τον πληθυσμό που ήδη ζούσε εκεί. Συνομιλώντας με τα γηραιότερα μέλη του δεύτερου γενεαλογικού δένδρου (Fig 5) οι πρόγονοι τους μας είπαν ότι κατάγονταν από την Ασία, συνεπώς η προέλευση της p.I1148T/G1176R διπλής μετάλλαξης είναι από τη σύγχρονη Τουρκία ενώ κάποιοι ντόπιοι που προέρχονταν από τον ήδη υπάρχον πληθυσμό, ήταν φορείς των δύο άλλων μεταλλάξεων. Αυτή η τυχαία ανακάλυψη καθώς και το γεγονός ότι η υπό εξέταση κοινότητα βρισκόταν σε μια απομονωμένη περιοχή, οδήγησε στη συχνή εμφάνιση των περιστατικών και στην ποικιλομορφία των πολυμορφισμών. Επίσης, η άγνοια, η μη σωστή κατανόηση της σοβαρότητας της νόσου καθώς και οι προκαταλήψεις μπορεί να αποτέλεσαν εμπόδιο στον τοπικό πληθυσμό για την αναζήτηση ιατρικής βοήθειας. Πολλοί ασθενείς κατέληγαν μη διαγνωσμένοι, κυρίως στις ηπατολογικές κλινικές ενώ δεν υπάρχουν διαθέσιμα ιατρικά αρχεία για τον επιπολασμό της νόσου στη συγκεκριμένη περιοχή.

Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη μη κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση και ταυτόχρονα δεν αναπτύχθηκαν προληπτικές μέθοδοι για τη νόσο. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι εξαιρετικής σημασίας όχι μόνο από γενετικής άποψης αλλά και από την πλευρά της δημόσιας υγείας.

Όσον αφορά στη διατροφική κατάσταση των ατόμων που εξετάστηκαν, φαίνεται ότι οι ασθενείς παρουσιάζουν την καλύτερη θερμιδική πρόσληψη, για την ηλικία τους. Παρουσιάζουν αυξημένη πρόσληψη λίπους και σχετικά αυξημένη πρόσληψη πρωτεΐνης, κάτι ωστόσο που χαρακτηρίζει τις τοπικές συνήθειες του ορεινού χωριού της Κρήτης. Έγινε εμφανής, δηλαδή, από τις διατροφικές ανακλήσεις, η αυξημένη κατανάλωση κρέατος και ελαιολάδου. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τους φορείς και υγιείς στα παραπάνω θρεπτικά συστατικά. Η πρόσληψη του ασβεστίου στους ασθενείς κρίθηκε ικανοποιητική, αν και ήταν χαμηλότερη της συνιστώμενης ποσότητας.

Επίσης, βρέθηκε ότι οι ασθενείς που λαμβάνουν τη D-πενικιλλαμίνη ως φαρμακευτική αγωγή, χρειάζονται την παράλληλη χορήγηση συμπληρώματος της βιταμίνης B₆. Επιπλέον, σε μελέτη που διενεργήθηκε σε ασθενείς με νόσο του Wilson, βρέθηκε ότι παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα βιταμίνης E. Έτσι στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η διαιτητική πρόσληψη της βιταμίνης B₆, καθώς και της βιταμίνης E. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς και οι φορείς προσλαμβάνουν επαρκή ποσότητα της βιταμίνης B₆, ενώ υστερούν οι υγιείς. Όσον αφορά τη βιταμίνη E, φαίνεται και οι τρεις ομάδες παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερη πρόσληψη από τη συνιστώμενη.

Η πρόσληψη του διαιτητικού χαλκού φαίνεται να είναι χαμηλή στους ασθενείς και στους υγιείς. Προσλαμβάνουν χαμηλότερη ποσότητα από τη συνιστώμενη (2mg/ ημέρα), με κίνδυνο να παρουσιάσουν έλλειψη. Ομοίως, η

πρόσληψη ψευδαργύρου, είναι χαμηλότερη από τη συνιστώμενη (15 mg/ ημέρα), και στις τρεις ομάδες, με κίνδυνο να παρουσιάσουν έλλειψη.

Επιπλέον, ο χαλκός ορού στους ασθενείς βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, κάτι που μπορεί να οφείλεται στην φαρμακευτική τους αγωγή (χαλκο-δεσμευτική), αλλά και στην χαμηλή πρόσληψη διαιτητικού χαλκού. Οι ασθενείς ήταν ενημερωμένοι για τις διαιτητικές πηγές χαλκού, και τις απέφευγαν συστηματικά. Ωστόσο, η φοβία τους για τις προαναφερθείσες τροφές, μπορεί να έχει οδηγήσει στο παραπάνω αποτέλεσμα. Πιθανότατα, θα πρέπει να αυξηθεί η πρόσληψη χαλκού, καθώς και να τροποποιηθεί η δοσολογία της φαρμακευτικής τους αγωγής, ώστε αν αποτραπούν οι αρνητικές συνέπειες από την έλλειψη του χαλκού.

Οι φορείς και οι υγιείς, βρίσκονται σε φυσιολογικά επίπεδα τόσο στο χαλκό όσο και στην σερουλοπλασμίνη ορού, αν και οι υγιείς παρουσιάζουν χαμηλή πρόσληψη χαλκού. Σημαντικό είναι το εύρημα, ότι ο φορέας με τη διπλή μετάλλαξη (IV2), παρουσίασε πολύ χαμηλά επίπεδα χαλκού (62 $\mu\text{g/dl}$), καθώς και πολύ χαμηλά επίπεδα σερουλοπλασμίνης (147 mg/l). Σημαντικό, επίσης, είναι το γεγονός ότι οι 6 φορείς από τους 13 που μελετήθηκαν (το 46%, δηλαδή των φορέων), ενώ παρουσίαζαν φυσιολογικές τιμές χαλκού, είχαν ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα σερουλοπλασμίνης ορού, κάτω των φυσιολογικών ορίων. Και σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι το 20% των φορέων παρουσίαζαν χαμηλά επίπεδα σερουλοπλασμίνης⁷².

Η υψηλή συχνότητα της νόσου του Wilson στον πληθυσμό της Κρήτης, η ύπαρξη αποτελεσματικής θεραπευτικής αγωγής και ικανότητα εντοπισμού των περισσότερων μεταλλάξεων με γενετική ανάλυση υποδεικνύουν ότι ο γενετικός έλεγχος του πληθυσμού και προγράμματα πρόληψης μπορούν να πραγματοποιηθούν με επιτυχία. Βασισμένοι σε προηγούμενα δεδομένα⁷¹, όταν η διάγνωση πραγματοποιείται το ταχύτερο δυνατό τόσο καλύτερη είναι η εξέλιξη της νόσου διότι

με αυτό τον τρόπο μπορεί να αποφασιστεί έγκαιρα η γραμμή της θεραπευτικής αγωγής. Συμπερασματικά, ο πληθυσμός στόχος πρέπει να είναι τα νεογνά, τα βρέφη και τα παιδιά πριν αυτά εμφανίσουν κλινικά συμπτώματα. Η γενετική συμβουλευτική, καθώς και η διατροφική συμβουλευτική αποτελούν τα καλύτερα όπλα της πρόληψης σε ασθένειες όπως αυτή που μελετήθηκε.

3. Brady RO. A genetic analysis of thirty families with Finkler's disease (hepatolenticular degeneration). *Am J Hum Genet* 1962;34:33-43.
4. Ball PC, Thomas GR, Fournier JM, et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993;3:327-333.
5. Taniguchi K, Fujimura K, Chernov L, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993;3:343-350.
6. Lachance G, Lavoie M, Dore V, et al. Abnormal mRNA splicing resulting from a nonsense sequence induces mutation of ATP7B. *Biol Mol Biol* 2002;29:260-266.
7. Culkin LM, Ford L, Cox DW. Genetic variation in the promoter and 5' UTR of the copper transporter, ATP7B, in patients with Wilson's disease. *Hum Genet* 2001;104:429-432.
8. Hollings NA, Gammeter BM. Studies on the rate of release and turnover of ceruloplasmin and apoceruloplasmin in the rat plasma. *J Biol Chem* 1970;245:2354-2358.
9. Frydman M. Genetic aspects of Wilson's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1990;5:433-440.
10. Kalach N, Selman FG, Mow C, et al. Acute liver failure from Wilson's disease in a five year old child. *Cas J Gastroenterol* 1993;7:610-612.
11. Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, et al. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut* 2000;48:115-119.
12. Waisbe JM. Wilson's disease. New oral therapy. *Transf* 1956;4:23-26.
13. Schalky ML, Scheinberg IR, Stauder L. Liver transplantation for Wilson's disease: Indications and outcome. *Hepatology* 1994;19:583-587.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912;34:295-50.
2. Roberts EA, Schilsky ML. A practice guideline on Wilson Disease. *Hepatology* 2003;1475-1492.
3. Bearn AG. A general analysis of thirty families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Ann Hum Genet* 1960;24:33-43.
4. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, *et al.* The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993;5:327-335.
5. Tanzi RE, Petrunikhin K, Chernov I, *et al.* The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993;5:340-350.
6. Loudianos G, Lovicu M, Dessi V, *et al.* Abnormal mRNA splicing resulting from consensus sequence splicing mutation of ATP7B. *Hum Mut* 2002;20:260-266.
7. Cullen LM, Prat L, Cox DW. Genetic variation in the promote and 5' UTR of the copper transporter, ATP7B, in patients with Wilson's disease. *Clin Genet* 2003;64:429-432.
8. Holtzman NA, Gaummitz BM. Studies on the rate of release and turnover of ceruloplasmin and apoceruloplasmin in the rat plasma. *J Biol Chem* 1970;245:2354-2358.
9. Frydman M. Genetic aspects of Wilson's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1990;5:483-490.
10. Kalach N, Seidman FG, Morin C, *et al.* Acute liver failure from Wilson's disease in a five year-old child. *Can J Gastroenterol* 1993;7:610-612.
11. Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, *et al.* Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut* 2000;46:415-419.
12. Walshe JM. Wilson's disease. New oral therapy. 1956;4:25-26.
13. Schilsky ML, Scheinberg IH, Sternlieb I. Liver transplantation for Wilson's disease: Indications and outcome. *Hepatology* 1994;19:583-587.

14. Brewer GJ. Autonomic dysfunction in Wilson's disease. *Clin Auton Res* 2002;12:139-140.
15. Azizi E, Eshel G, Aladjem M. Hypercalciuria and nephrolithiasis as a presenting sign in Wilson's disease. *Eur J Pediatr* 1989;148:548-549.
16. Golding DN, Walshe JM. Arthropathy on Wilson's disease. Study of clinical and radiological features in 32 patients. *Ann rheum Dis* 1977;36:99-111.
17. Factor SM, Cho S, Sternlieb L, *et al*. The cardiomyopathy of Wilson's disease. Myocardial alterations in nine cases. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 1982;397:301-311.
18. Weizman Z, Picard E, Barki Y, Moses S. Wilson's disease associated with pancreatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7:931-933.
19. Carpenter TO, Carnes DL, Jr., Anast CS. Hypoparathyroidism in Wilson's disease. *N Engl J Med* 1983;309:873-877.
20. Klee JG. Undiagnosed Wilson's disease as cause of unexplained miscarriage. *Lancet* 1979;2:423.
21. Fleming CR, Dickson ER, Wahner WH, *et al*. Pigmented corneal rings in non-Wilsonian liver disease. *Ann Intern Med* 1977;86:285-288.
22. Steindi P, Ferenci P, Dienes HP, *et al*. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* 1977;113:212-218.
23. Scheinberg IH, Gitlin D. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science* 1952;116:484-485.
24. Scheinberg IH, Sternlieb I, Schilsky M, *et al*. Penicillamine may detoxify copper in Wilson's disease. *Lancet* 1987;11:95.
25. Wiesner RH, Dickson ER, Carlson GI, *et al*. The pharmacokinetics of D-penicillamine in man. *J Rheumatol Suppl* 1981;7:51-55.
26. Bergstrom RF, Kay DR, Harkcom TM, *et al*. Penicillamine kinetics in normal subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1981;30:404-413.
27. Scheinberg IH, Jaffe ME, Sternlieb, *et al*. The use of trientine in preventing the effects of interrupting penicillamine therapy in Wilson's disease. *N Engl J Med* 1987;317:209-213.
28. Walshe JM. Treatment of Wilson's disease with trientine (trethylene tetramine) dihydrochloride. *Lancet* 1982;1:643-644.

29. Shiono Y, Hayashi H, Wakusawa S, *et al.* Ultrastructural identification of iron and copper accumulation in the liver of a male patient with Wilson's disease. *Med Electron Microsc* 2001;34:54-60.
30. Hoogenraad TU, Van Hattum J, Van den Hamer CJ. Management of Wilson's disease with zinc sulphate. Experience in a series of 27 patients. *J Neurol Sci* 1987;77:137-146.
31. Brewer GJ, Yusbasiyan-Gurkan V, Young AB. Treatment of Wilson's disease. *Semin Neurol* 1987;7:209-220.
32. Brewer GJ, Hill GM, Prasad AS, *et al.* Oral zinc therapy for Wilson's disease. *Ann Intern Med* 1983;99:314-319.
33. Czlonkowska A, Gadja J, Rodo M. Effects of long term treatment in Wilson's disease with D-penicillamine and zinc sulphate. *J Neurol* 1996;243:269-273.
34. von Herbay A, de Groot H, Hegi U, *et al.* Low vitamin E content in plasma of patients with alcoholic liver disease, hemocromatosis and Wilson's disease. *J Hepatolo* 1994;20:41-46.
35. Brewer GJ, Yusbasiyan-Gurkan V, Dick R, *et al.* Does a vegetarian diet control Wilson's disease? *J Am Coll Nutr* 1993;12:527-530.
36. Novy MA, Schwarz KB. Nutritional considerations and management of the child with liver disease. *Nutrition* 1997;13:177-184.
37. Wapnir RA. Copper absorption and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 1998;67(suppl):1054S-1060S.
38. Bonham M, O'Connor JM, Hannigan BM, Strain JJ. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *Br J Nutr* 2002 May;87(5):393-403.
39. Barceloux DG. Copper. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;37(2):217-230.
40. Dorea JG. Iron and Copper in human milk. *Nutrition* 2000;16:209-220.
41. Konig JS, Elmadfa I. Plasma Copper concentration as marker of copper intake from food. *Ann Nutr Metab* 2000;44(3):129-134.
42. Hunt JR, Vanderpool RA. Apparent copper absorption from a vegetarian diet. *Am J Clin Nutr* 2001;74:803-7.
43. Brewer GJ. Zinc acetate for the treatment of Wilson's disease. *Expert Opin Pharmacother* 2001 Sep;2(9):1473-1477.

44. Van Caillie-Bertrand M, Degenhart HJ, Luijendijk I, et al. Wilson's disease: assessment of D-penicillamine treatment. *Arch Dis Child* 1985 Jul;60(7):652-655.
45. Theophanides T, Anastassopoulou J. Copper and carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2002;42:57-64.
46. Cox DW, Roberts E. Wilson Disease. *Gene Reviews* 1999 Oct;1-9.
47. Lough J, Winglesworth FW. Wilson disease. Comparative ultrastructure in a sibship of nine. *Arch pathol Lab Med* 1976 Dec;100(12):659-3.
48. Okada T, Shiono Y, Hayashi H, et al. Mutation analysis of ATP7B and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson's disease. *Hum Mutat* 2000;15(5):454-462.
49. Hahn SH, Lee SY, Jang YJ, et al. Pilot study of mass screening for Wilson's disease in Korea. *Molecular Genet Metab* 2002;76:133-136.
50. Thomas GR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. Haplotypes and mutations in Wilson's disease. *Am J Hum Genet* 1995;56:1315-1319.
51. Maier-Dobersberg T, Mannhalter C, Rack S, et al. Diagnosis of Wilson's disease in an asymptomatic sibling by DNA linkage analysis. *Gastroenterology* 1995;109:2015-2018.
52. Cossu P, Pirastu M, Nucaro A, et al. Prenatal diagnosis of Wilson's disease by analysis of DNA polymorfism. *N Engl J Med* 1992;327:57.
53. Buiakova OI, Xu J, Lutensko S, et al. Null mutation of the murine ATP7B (Wilson's disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. *Hum Genet* 1998;8:1665-1671.
54. Riordan S, Williams R. the Wilson's disease gene and phenotypic diversity. *J Hepatolo* 2001;34:165-171.
55. Caca K, Ferenci P, Kuhn HJ, et al. High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson's disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. *J Hepatol* 2001;35:575-581.
56. Firnseiz G, Lakatos PL, Szalay F, et al. common mutations of ATP7B in Wilson's disease patients from Hungary. *Am J Med Genet* 2002;108:23-28.
57. Tamacka B, Gromadzka G, Rodo M, et al. Frequency of His1069Gln and Gly1267Lys mutations in polish Wilson's disease disease population. *Europ J Neur* 2000;7:495-498.

58. 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.
59. Loudianos G, Lovicu M, Solinas P, *et al.* Delineation of the spectrum of Wilson disease mutations in the Greek population and the identification of six novel mutations. *Genet Test* 2000;4:399-402.
60. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, *et al.* Haplotype and mutation analysis in Greek patients with Wilson disease. *Eur J Hum genet* 1998;5:487-491.
61. Garcia-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;32:1329-1336.
62. Bonne-Tamir B, Frydman M, Agger MS, *et al.* Wilson's disease in Israel: a genetic and epidemiological study. *Ann Hum Genet* 1990;54:155-168.
63. Wy ZY, Wang N, Lin MT, *et al.* Genotype-phenotype correlation of patients with Wilson disease in Chinese population. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003;83:309-311.
64. Thomas G, Forbes J, Roberts E, *et al.* The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genetics* 1995;9:210-217.
65. Houven R, Juyn J, Hoogenraad T, *et al.* H714Q mutation in Wilson's disease is associated with late, neurological presentation. *J Med Genet* 1995;32:1-3.
66. Waldenstrom E, Lagerkvist A, Dahlman Th, *et al.* Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing. *Genomics* 1996;37:303-309.
67. Castillo S, reyes G, Tejedor D, *et al.* Spanish group of FH. A double mutant [N543H+2393del] allele in the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia: effect on plasma cholesterol levels and cardiovascular disease. *Hum Mutat* 2002;20:477.
68. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, *et al.* Molecular characterization of Wilson disease in the Sardinian population—evidence of a founder effect. *Hum Mutat* 1999;14:294-303.
69. Olivarez L, Caggana M, Pass KA, *et al.* Estimate of the frequency of Wilson's disease in the Caucasian population : a mutation analysis approach. *Ann Hum Genet* 2001;65:459-463.

70. Palsson, Runolfur, Jonasson, *et al.* Genotype-phenotype interactios in Wilson's disease : insight from an Icelandic mutation, Eur J Gastreenterol Hepatol 2001 ;13 :433-436.

71. Durand F, Berneau J, Giostra E, *et al.* Wilson's disease with severe hepatic insufficiency: beneficisl effects of early administration of D-penicillamine. Gut 2001;48:849-852.

72. Walshe JM. Copper: Not too little, not too much, but just right. J R Coll Physicians London 1995;29:280-288.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

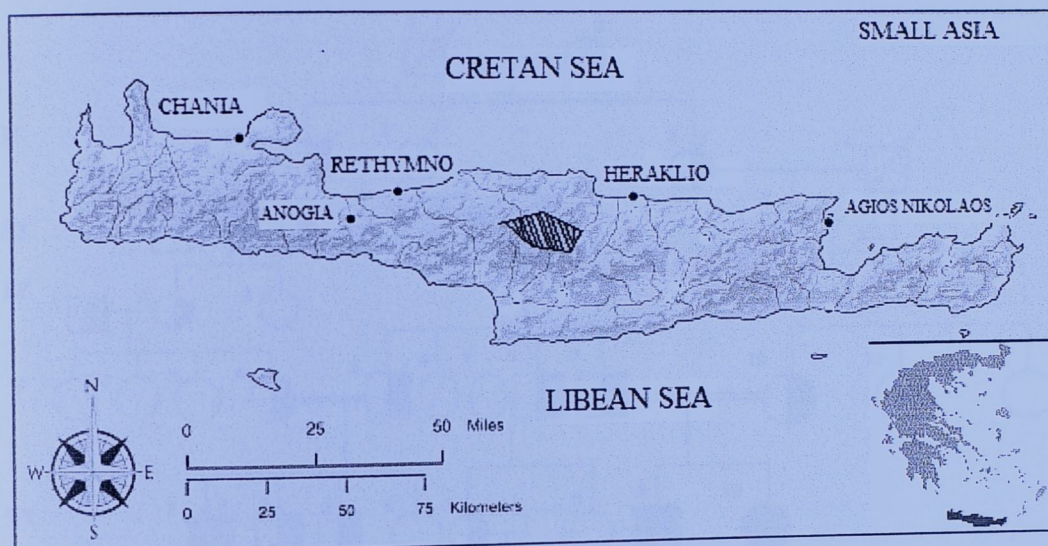
ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Βιοχημικά και δημογραφικά δεδομένα των ασθενών με νόσο του Wilson

Ασθενείς	Φύλ	Ημερ. Γέννη σης	Ηλικία έναρξ συμπτ	Ηπατικές Εκδηλώσεις	Βιοψία ήπατος	KFR	Cu Ορού (mg/dl)	Σερουλο πλασμίν (mg/dl)	Ομοσίμα τη σύζευξη	Πορεία	Θεραπεία
Π2	A	1976	5	Οξεία ηπατική ανεπάρκεια	-	+	NA	NA	+	Θάνατος το 1986	-
Π9	A	1981	6	Ηπατοσπληνομε γαλία	Πυλαία ίνωση, λιπώδης διήθηση	-	44	3	+	Βελτίωσ η	D-penicil./ ZnS
Π10	Θ	1979	6	Οξεία ηπατική ανεπάρκεια	Στεάτωση και υψηλός Cu ήπατος	-	34	<7	+	Χειροτέρ ευση	D-penicil./ ZnS
Π1	A	1989	6	Ηπατομεγαλία	-	+	32	4	+	Βελτίωσ η	D-penicil./ ZnS

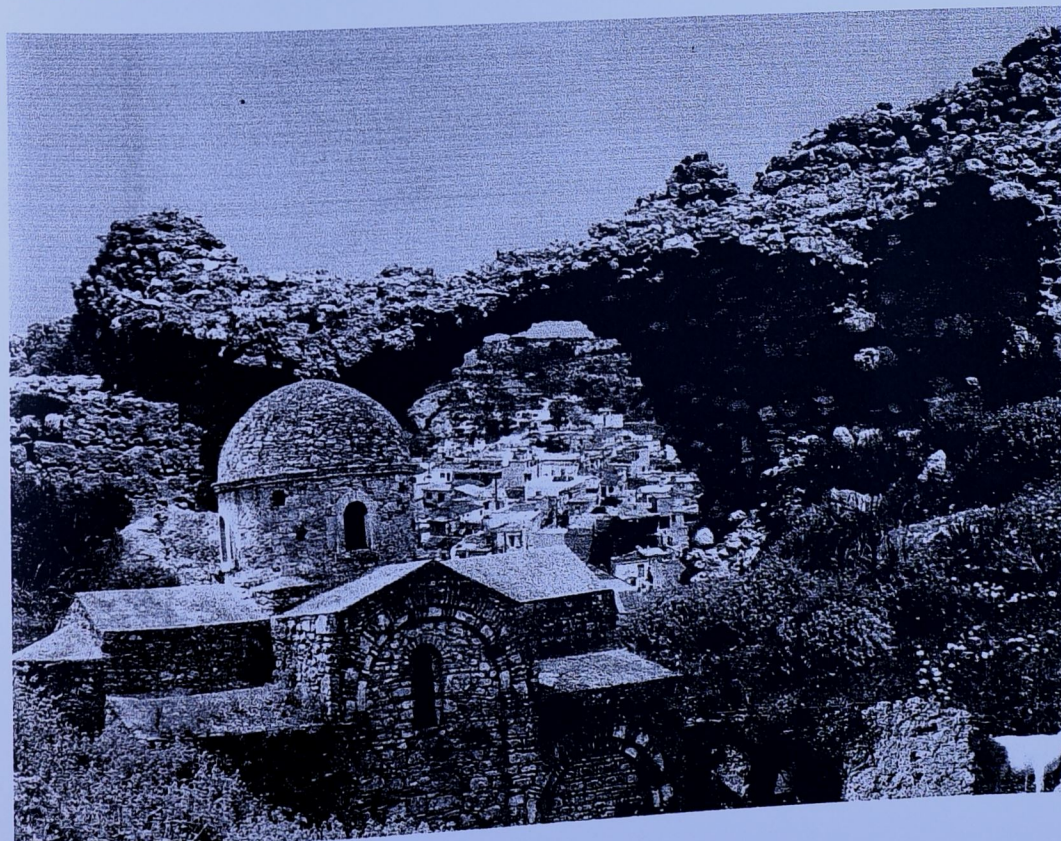
NA: not available (τα στοιχεία δεν είναι διαθέσιμα)

KFR: Kayser-Fleischer rings

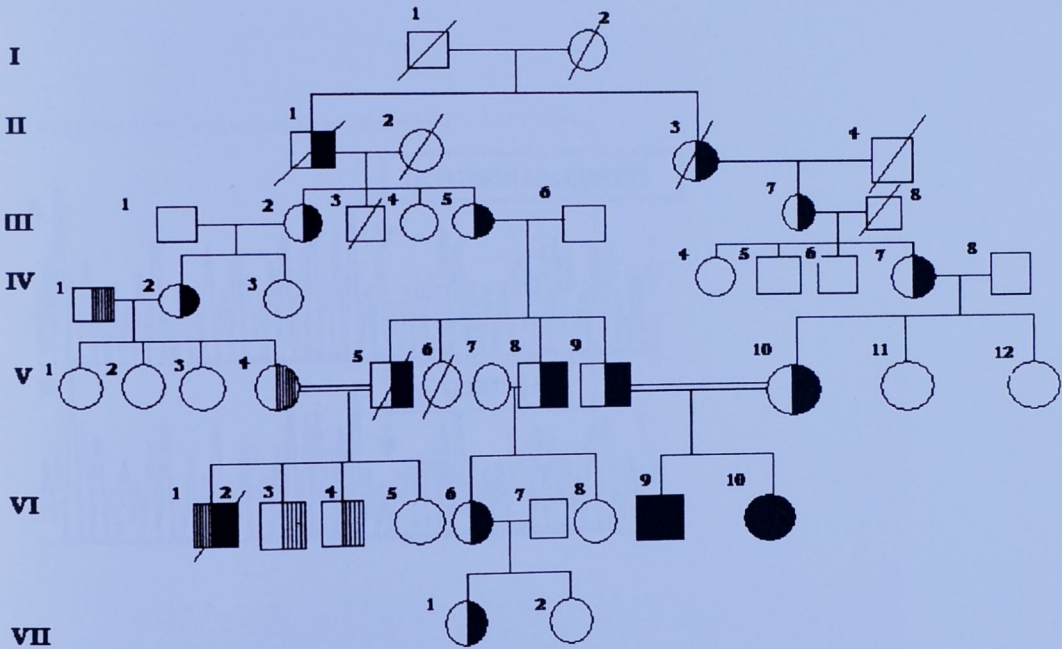
ΕΙΚΟΝΑ 1Α. Ο χάρτης της Κρήτης. Η σκιαγραφημένη περιοχή δείχνει την εγκατάσταση των πρώτων οικογενειών στο χωριό. Οι δύο προέρχονταν από την πόλη των Ανωγείων και η τρίτη από τη Μικρά Ασία, κατά την ανταλλαγή των πληθυσμών με την Τουρκία το 1922.



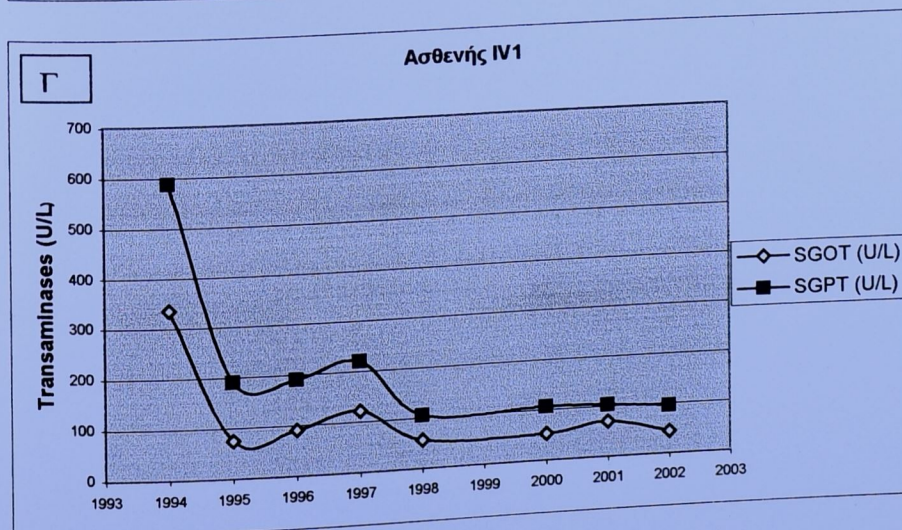
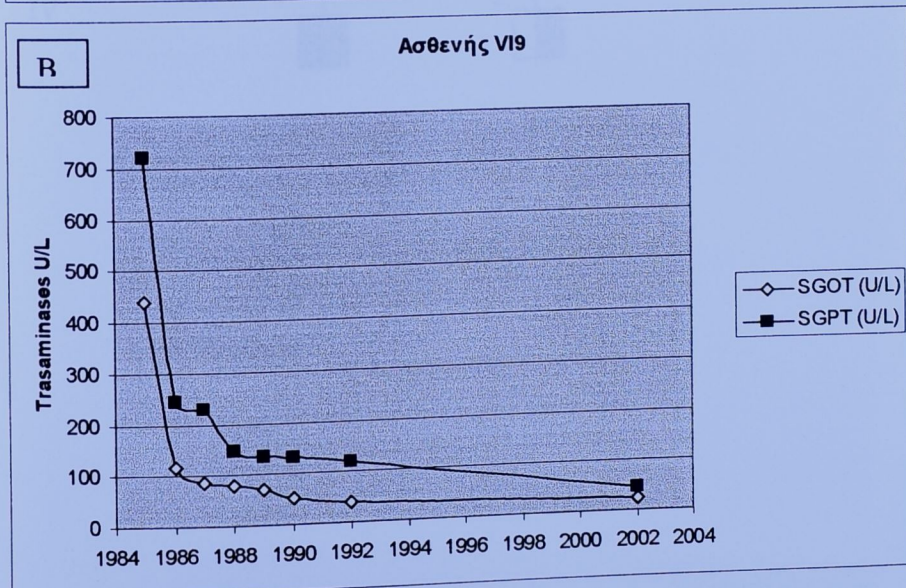
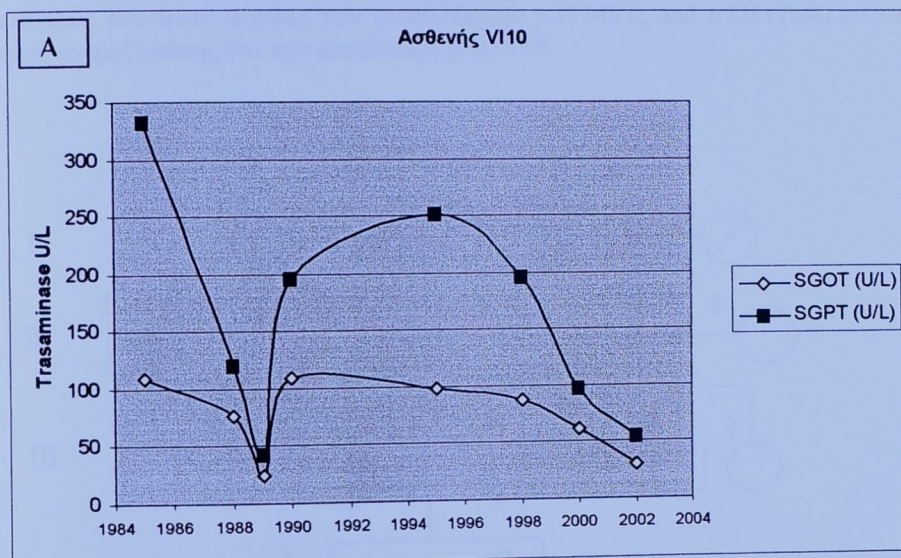
ΕΙΚΟΝΑ 1Β. Απεικονίζεται το ορεινό χωριό, στο οποίο πραγματοποιήθηκε η μελέτη.



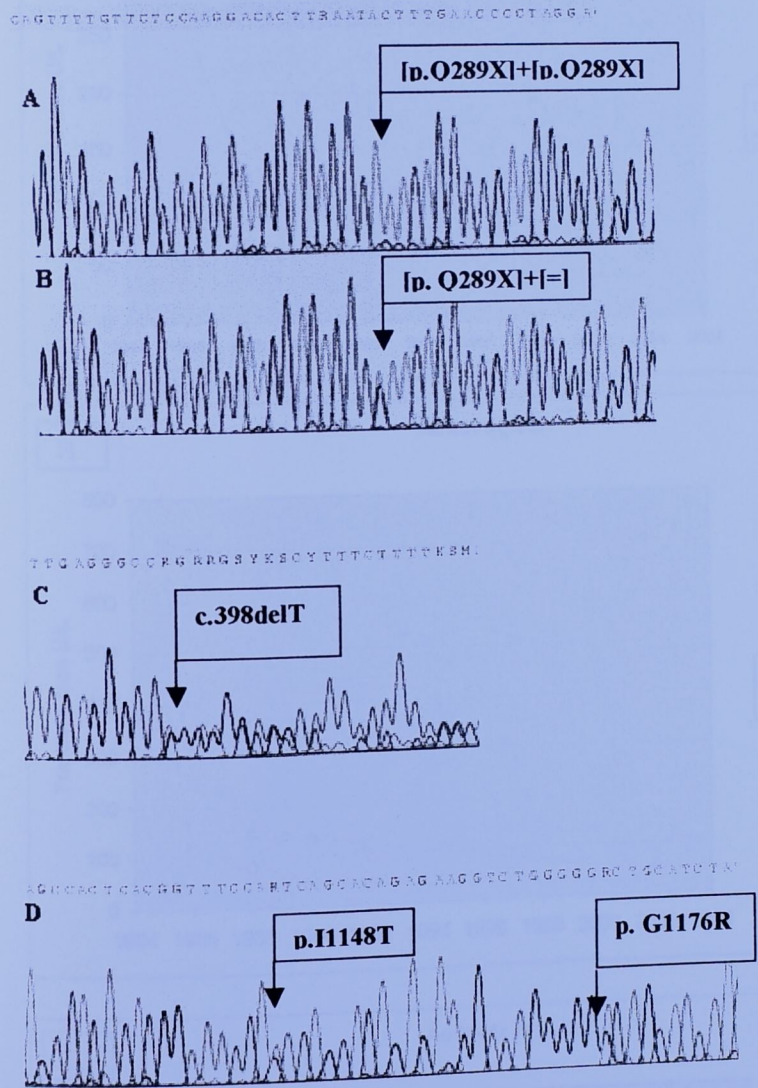
ΕΙΚΟΝΑ 2. Γενεαλογικό δένδρο της 1^{ης} μεγάλης οικογένειας με νόσο του Wilson. Ο ασθενής VI2 ήταν συνδυασμένος ετεροζυγώτης για τις μεταλλάξεις 398delT και p.Q289X. Οι ασθενείς VI9 και VI10 ήταν ομόζυγοι για τη μετάλλαξη p.Q289X.



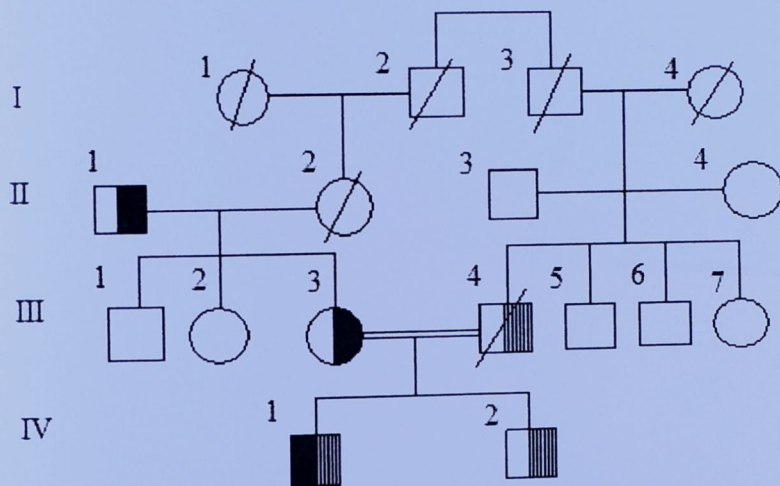
ΕΙΚΟΝΑ 4. Επίπεδα των τρανσαμινασών SGOT (ASAT) και SGPT (ALAT) των τριών ασθενών με νόσο της Wilson κατά τη διάρκεια της φαρμακευτικής αγωγής με D-πενικυλλαμίνη.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Η άμεση γενετική ανάλυση του DNA αποκάλυψε (α) έναν ομοζυγώτη ασθενή για την ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη p.Q289X (β) μία καινούρια μετάλλαξη, την c.398delT (γ) δύο παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις την p.I1148T και p.G1176R που κληρονομήθηκαν ταυτόχρονα στον ίδιο ασθενή.



ΕΙΚΟΝΑ 5. Γενεαλογικό δένδρο της 2^{ης} μεγάλης οικογένειας με νόσο του Wilson. Ο ασθενής IV1 ήταν συνδυασμένος ετεροζυγώτης για τις μεταλλάξεις p.I1148T, p.G1176R, και p.Q289X. Οι πρώτες δύο μεταλλάξεις κληρονομήθηκαν ταυτόχρονα στο ίδιο αλληλίο. Ο αδερφός του ήταν φορέας των μεταλλάξεων p.I1148T, and p.G1176R, ενώ η μητέρα τους ήταν ετεροζυγώτης για την μετάλλαξη p.Q289X.



**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

