

MODIFICAREA MECANISMELOR DE NEUROPROTECȚIE ÎN BOALA WILSON

Adriana Bulboacă, A. Bulboacă
Universitatea de Medicină și Farmacie, Cluj

REZUMAT

Ionul de cupru este un element cheie pentru funcția unor sisteme enzimatice, dar reactivitatea sa incontrollabilă poate fi o sursă de specii reactive ale oxigenului. Deficitul, excesul sau tulburările metabolismului său sunt situații patologice care pot fi în detrimentul celulelor nervoase, extrem de sensibile la stresul oxidativ. Aceste tulburări pot fi întâlnite în boala Wilson. Scopul acestui studiu a fost evaluarea concentrației serice a acidului uric (și a fenomenului inflamator) la pacienții cu boală Wilson. Material și metodă: s-a comparat un lot de 17 pacienți cu boală Wilson cu un lot de voluntari sănătoși, în ceea ce privește testele de laborator specifice pentru boala Wilson și, adițional, în ceea ce privește concentrația plasmatică a acidului uric. Rezultate: nivelul acidului uric a fost găsit scăzut la pacienții cu boală Wilson și acest nivel s-a corelat cu concentrația plasmatică a ceruloplasminei. Discuții: una dintre cele mai importante substanțe epuratoare a radicalilor liberi ai oxigenului este acidul uric. În boala Wilson producția hepatică de acid uric și reabsorbția sa renală sunt scăzute. Consecutiv, nivelul acidului uric plasmatic este redus facilitând statusul proinflamator și degenerescența neuronală.

ABSTRACT

Copper is an essential metal ion for the function of key metabolic enzymes, but its uncontrolled redox reactivity is source of reactive oxygen species. Deficit, excess, or aberrant coordination of copper are conditions that may be detrimental, especially for neuronal cells, which are particularly sensitive to oxidative stress. These situations may occur in Wilson disease. The aim of this study was to evaluate the level of uric acid (so the proinflammatory status) in patients with Wilson disease. Material and methods: 17 patients with Wilson disease were compared with a group of healthy human subjects concerning the laboratory diagnostic test specific for Wilson disease and additionally for level of uric acid in plasma. Results: the level of uric acid was decreased in patients with Wilson disease and this level is correlated with the level of plasma ceruloplasmin. Discussions: one of the most important scavengers for free oxygen radicals is uric acid. In Wilson disease, hepatic uric acid production may be decreased and renal reabsorption also. Consequently, uric acid level decrease in plasma and an important consequence is a proinflammatory status and facilitation of neurodegeneration phenomenon.

INTRODUCERE

Boala Wilson (degenerescența hepato-lenticulară) a fost descrisă pentru prima dată în 1912 de către Kinnear Wilson, în 1912, ca fiind o afecțiune neurologică familială letală, caracterizată de prezența unei „degenerescențe lenticulare progresive“, care asociază o hepatopatie cronică cu evoluție spre ciroză (1). Asocierea depozitelor corneene de cupru a fost descrisă mai târziu, de către Kayser și Fleischer (2). Ulterior, rolul tulburărilor metabolice ale cuprului a fost bine stabilit, iar transmiterea bolii s-a dovedit a fi autosomal recesivă. În 1993 s-a identificat și gena responsabilă de apariția bolii, aceasta fiind gena numită ATP7B, care codifică ATP-aza responsabilă de transportul transmembranar al cuprului și a cărei expresie este majoritar hepatocitară (3). Absența sau disfuncția acestei gene determină scăderea excreției cuprului prin bilă și acumularea sa intrahepatocitară, cu leziuni consecutive. Surplusul de cupru este eliberat în torrentul sanguin și depozitat ulterior în alte organe, în special în creier, rinichi și cornee.

Deficitul de încorporare a cuprului în ceruloplasmă este o consecință secundară disfuncției genetice. Deficitul de sinteză a apoceruloplasminei, la nivel hepatic, determină scăderea concentrației plasmatic

a ceruloplasminei, fenomen frecvent întâlnit la pacienții cu boală Wilson (4).

Un aspect interesant al modificărilor patologice biochimice care pot apare în boala Wilson este cel de scădere a concentrației serice a acidului uric, la pacienții cu simptome neurologice și/sau hepatice, datorită disfuncției tubulare prezente (5). Este cunoscut efectul antioxidant al acidului uric, efect datorat capacității sale de a epura peroxinitritul, compus rezultat în urma producției crescute de radicali liberi ai oxigenului și de oxid nitric. Efectul antioxidant protector al acidului uric este dovedit și la nivelul sistemului nervos central (6).

SCOPUL LUCRĂRII

Scopul acestui studiu a fost de a evalua concentrația plasmatică a acidului uric, ca și indicator al stresului oxidativ, la pacienții cu boală Wilson cu manifestări neurologice și/fără manifestări hepatice sau inel Kayser-Fleischer asociate. Evaluarea stresului oxidativ și, consecutiv, a mecanismelor de neuroprotecție, ar putea constitui baza patogenetică a unei eventuale terapii adjuvante, pentru ameliorarea simptomatologiei clinice.

MATERIAL ȘI METODĂ

Au fost luați în studiu 17 pacienți cu boală Wilson care au prezentat manifestări neurologice caracteristice, cu sau fără manifestări hepatice sau inel Kayser-Fleicher asociate. Valorile parametrilor biochimici au fost comparate cu cele ale unui lot martor format din 20 de voluntari sănătoși.

Evaluarea neurologică a inclus examinarea clinică și examen RMN cranian.

Evaluarea afectării hepatice s-a făcut prin determinarea aminotransferazelor serice (ALAT și ASAT), a fosfatazei alcaline (FA), a bilirubinei totale și conjugate, la cazurile cu simptomatologie clinică și modificări paraclinice caracteristice afectării hepatice, efectuându-se și puncția- biopsie hepatică cu examen histopatologic consecutiv.

Evaluarea prezenței depozitelor corneene de cupru s-a făcut prin examenul biomicroscopic al corneei. La pacienții cu acuitatea vizuală scăzută, necorectabilă, s-a decelat eventuala prezență a unei neuropatii optice asociate prin perimetrie statică computerizată (la cei la care s-a exclus prezența opacităților cristaliniene care pot însoți boala Wilson).

Examinările biochimice au mai inclus determinarea concentrației serice a ceruloplasminei, evaluarea concentrației serice și urinare a cuprului, precum și evaluarea concentrației serice a acidului uric.

Prelucrarea statistică a datelor s-a făcut cu testul t Student. Stabilirea coeficientului de corelație r dintre concentrația serică a ceruloplasminei și cea a acidului uric s-a făcut cu ajutorul testului Pearson.

REZULTATE

Caracteristicile clinice și paraclinice pe baza cărora s-a pus diagnosticul sunt redată în tabelul 1 și tabelul 2. Menționăm că vârsta medie de apariție a

Tabelul 1
Caracterele clinice ale lotului de pacienți cu boală Wilson, luați în studiu

Evaluare clinică	Număr de pacienți (%)
Examen neurologic	
• tremor postural	11 (64,7 %)
• tulburări de tonus muscular	11 (64,7 %)
• disartrie	4 (23,52%)
• tulburări de postură	3 (17,64 %)
• convulsii	1 (5,88 %)
• mișcări involuntare de tip coreic	1 (5,88 %)
Examen gastroenterologic	
• icter	2 (11,76 %)
• hepatosplenomegalie	5 (29,41 %)
• ciroză	1 (5,88%)
Examen oftalmologic	
• inel Kayser-Fleicher	2 (11,76 %)
• opacități cristaliniene	4 (23,52 %)
• neuropatie optică	2 (11,76 %)
Alte examinări	
• manifestări psihice (anxietate, depresie)	7 (41,17 %)
• nefrolitiază (ecografie renală)	1 (5,88 %)
• osteoporoză (osteodensitometrie)	5 (29,41 %)
• avorturi repetate	1 (5,88 %)

bolii a fost de $23,7 \pm 3,47$ ani. Raportul bărbați/femei a fost de 10/7.

Efectuarea corelației dintre concentrația serică a ceruloplasminei și cea a acidului uric a dus la o valoare a lui r de 0,88, ceea ce sugerează existența unei corelații liniare pozitive între modificările celor 2 parametri.

DISCUȚII

Tulburarea metabolismului cuprului, caracteristică bolii Wilson, determină creșterea riscului pentru leziuni tisulare, datorită potențialului oxidativ intens care caracterizează acest microelement. Ca urmare a reacțiilor de oxidare multiple, amplificate de prezența cuprului în țesutul cerebral, dar și în alte țesuturi în care se depozitează, se intensifică stresul oxidativ, fenomen care stă la baza procesului de neurodege-

Tabelul 2
Caracterele paraclinice ale lotului de pacienți cu boală Wilson, luați în studiu

Tipul evaluării paraclinice	Rezultate – lot de studiu	Rezultate – lot martor	Semnificație statistică față de lotul martor
Concentrația serică a ceruloplasminei (mg/dL)	14,12 ± 1,76	22,76 ± 2,87	p < 0,05
Concentrația serică a cuprului (microg/dL)	8,89 ± 0,83	10,87 ± 1,02	–
Eliminarea urinară a cuprului (microg/24 h)	143,74 ± 8,56	43,76 ± 5,67	p < 0,01
Concentrația serică a acidului uric (mg/dL)	2,83 ± 0,32	4,65 ± 0,68	p < 0,05
ALAT (U/L)	45,56 ± 4,75	18,45 ± 2,34	p < 0,05
ASAT (U/L)	57,23 ± 2,67	13,76 ± 1,76	p < 0,05
FA (U/L)	42,45 ± 2,34	39,23 ± 2,65	–
Examen histopatologic – țesut hepatic concludent – steatoză, ciroză hepatică (număr de pacienți)	7 (41,17%)	–	–
Examen RMN cranian – T2 ponderat – hipersemnal la nivelul nucleului putamen (număr de pacienți)	8 (47,05%)	–	–

nerescență. Moartea neuronală are loc prin apoptoză, proces activat de compușii rezultați în urma reacțiilor de oxidare. Unul dintre acești compuși, peroxinitritul, posedă un mare potențial neurotoxic. Astfel, reactivitatea cuprului poate fi considerată a fi un element cheie în procesele apoptotice neuronale care induc fenomenele neurodegenerative, prin intermediul amplificării stresului oxidativ (7, 8).

Peroxinitritul se formează în urma reacției dintre oxidul nitric și anionul superoxid, compuși rezultați în urma reacțiilor oxidative. Unul dintre cei mai importanți compuși care posedă proprietăți de epurare a peroxinitritului, și, consecutiv, de reducere a stresului oxidativ și a fenomenelor de neurodegenerare este acidul uric. Prin favorizarea fenomenelor de epurare a peroxinitritului, prezența acidului uric în cantități suficiente contribuie la asigurarea funcționalității unuia dintre cele mai importante mecanisme de neuroprotecție (9). Rezultatele studiului nostru, care au demonstrat scăderea semnificativă a concentrației serice a acidului uric, sugerează că, în boala Wilson, mecanismele de neuroprotecție sunt serios afectate.

Pentru a preveni reacțiile oxidative mediate de cupru, țesutul cerebral posedă sisteme specializate de transport ale cuprului. Unul dintre aceste sisteme are la bază proteina precursoră a amiloidului (PPA), care posedă situsuri speciale de legare ale cuprului, favorizând exocitarea sa. Datorită acestei proprietăți, PPA este unul dintre cei mai eficienți compuși care reglează homeostazia neuronală a cuprului. Adițional, în țesutul cerebral, mai există și alte sisteme enzimatică care pot lega cuprul, cum sunt dopamine-beta-hidroxilaza și Cu/Zn superoxid-dismutaza. În boala Wilson, toate aceste sisteme enzimatică sunt disfuncționale, mecanismul care stă la baza acestui fenomen fiind acumularea de cupru în țesutul cerebral (10). Această disfuncție enzimatică se suprapune peste ineficiența sistemelor de epurare ale radicalilor toxici ai oxigenului (demonstrate prin scăderea concentrației serice a acidului uric) contribuind la amplificarea mecanismelor neurodegenerative.

Investigarea corelației dintre nivelul cuprului plasmatic și statusul antioxidant al plasmei în boala Wilson a dus la concluzia că scăderea capacității antioxidante a plasmei este direct proporțională cu modificarea concentrației plasmatică a cuprului nelegat de ceruloplasmină. Astfel, Oghihara și col. au demonstrat că valorile concentrațiilor serice al acidului ascorbic și ale acidului uric sunt semnificativ mai mici la pacienții netratați decât la cei care au primit tratament cu Penicilamină (11). Acest studiu este concordant cu rezultatele studiului nostru, care demonstrează, pe lângă scăderea capacității antioxidante a plasmei și o relație de proporționalitate directă între concentrația serică a acidului uric și cea a ceruloplasminei.

Mecanismele care determină scăderea concentrației serice a acidului uric sunt pe de o parte scăderea reabsorbției tubulare a acidului uric, iar pe de altă parte, scăderea sintezei sale hepatice, ambele fenomene fiind datorate modificărilor lezionale determinate de depunerea cuprului la aceste niveluri (12). Datorită faptului că modificarea concentrației serice a acidului uric, la pacienții din studiul nostru, nu este însoțită întotdeauna de modificări clinice sau paraclinice hepatice și renale, sugerăm că sinteza și reabsorbția acidului uric pot fi alterate și în condițiile unor depuneri de cupru care nu induc încă modificări clinice caracteristice disfuncției acestor organe. Astfel, modificările concentrației plasmatică a acidului uric, se pot constitui într-un indicator precoce al disfuncției hepatice și renale în boala Wilson.

Pe de altă parte, radicalii liberi ai oxigenului produși în exces, prin reacțiile oxidative amplificate de prezența în exces a cuprului, împiedică legarea corespunzătoare a cuprului de ceruloplasmină (13, 14).

Formarea radicalilor liberi de oxigen, mediate de cupru, determină alterarea semnalelor intracelulare, cu alterarea consecutivă a metabolismului intracelular al calciului, precum și leziuni ale ADN-ului, fenomene care favorizează apoptoza. O altă disfuncție, indusă de cuprul acumulat în exces în boala Wilson, este disfuncția mitocondrială. La nivelul neuronilor, disfuncția lanțului respirator mitocondrial determină activarea rapidă a mecanismelor care duc la apoptoză (15,16). S-a dovedit, prin studii experimentale, că vitamina E și melatonina pot preveni fenomenele apoptotice. Administrarea unor cantități prea mari de vitamină E este însă dăunătoare, favorizând apoptoza. Totodată, administrarea de vitamină C, în prezența unor cantități mari de cupru, are un efect prooxidant (17).

Pe de altă parte, fenomenul de neurodegenerare are loc și datorită creșterii excitotoxicității, prin activarea excesivă a receptorilor N-metil-D-aspartat (NMDA) de către glutation. Sinteza excesivă a glutationului este influențată de acumularea extracelulară, la nivelul țesutului cerebral, a cuprului (18). Pe lângă sinteza excesivă a glutationului, se produce și o disfuncție a celulelor gliale, care devin incapabile de a metaboliza excesul de glutamat, favorizând astfel excitotoxicitatea (19).

Practic, se consideră că fenomenul neurodegenerativ este o consecință directă a procesului inflamator, care, la rândul său este inițiat de prezența cuprului în țesutul cerebral (20). Deficitul de acid uric are rolul de a favoriza acțiunea proinflamatoare a radicalilor liberi de oxigen, consecința directă fiind moartea neuronală. Interceptarea terapeutică a uneia dintre verigile patogenetice ale acestui proces ar putea avea consecințe directe asupra evoluției clinice a pacienților cu boală Wilson.

BIBLIOGRAFIE

1. **Wilson SAK** – Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*, 1912, 34: 295-507.
2. **Fleicher B** – Ueber einer der „Pseudosclerose“ nahestehende bisher unbekannte Krankheit (gekennzeichnet durch Tremor, physische Stoerungen, braeunliche Pigmentierung bestimmter Gewebe, insbesondere Such der Hornhauptperipherie, Lebercirrhose). *Deutsch Z Nerven Heilk*, 1912, 44: 179-201.
3. **Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M și col** – Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet*, 1993, 5: 344-350.
4. **Holtzman NA, Gaumnitz BM** – Studies on the rate of release and turnover of ceruloplasmin and apoceruloplasmin in rat plasma. *J Biochem*, 1970, 245: 2354-2358.
5. **Gaffney D, Fell GS, O'Reilly DS** – Wilson's disease: acute and presymptomatic laboratory diagnosis and monitoring. *J Clin Pathol*, 2000, 53: 807-812.
6. **Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE și col** – Reaction of uric acid with peroxynitrite and implication for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 376: 333-337.
7. **Rotilio G, Carri MT, Rossi L și col** – Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *IUBMB Life*, 2000, 50: 309-14.
8. **Uriu-Adams JY, Keen CL** – Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med*, 2005, 26: 268-98.
9. **Squadrito GL, Cueto R, Spienser AE și col** – Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 376: 333-337.
10. **Kitzberger R, Madl C, Ferenci P** – Wilson disease. *Metab Brain Dis*, 2005, 20: 295-302.
11. **Ogihara H, Ogihara T, Miki M și col** – Plasma copper and antioxidant status in Wilson's disease. *Pediatr Res*, 1995, 37: 219-26.
12. **Umeki S, Ohga R, Konishi Y și col** – Oral zinc therapy normalizes serum uric acid level in Wilson's disease patients. *Am J Med Sci*, 1986, 292: 289-92.
13. **Shukla N, Maher J, Masters J și col** – Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor? *Atherosclerosis*, 2006, 32: 345-353.
14. **Strausak D, Mercer JF, Dieter HH și col** – Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull*, 2001, 55: 175-85.
15. **Rossi L, Lombardo MF, Ciriolo MR și col** – Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. *Neurochem Res*, 2004, 29: 493-504.
16. **Sheline CT, Choi DW** – Cu²⁺ toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Ann Neurol*, 2004, 55: 645-53.
17. **Valko M, Morris H, Cronin MT** – Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 1161-208.
18. **White AR, Cappai R** – Neurotoxicity from glutathione depletion is dependent on extracellular trace copper. *J Neurosci Res*, 2003, 71: 889-97.
19. **McCarty MF** – Down-regulation of microglial activation may represent a practical strategy for combating neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses*, 2006, 34:31-37.
20. **Mander P, Brown GC** – Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation*, 2005; 2: 20-27.