

KONCENTRACIJE BAKRA U TKIVIMA BOLESNIKA S WILSONOVOM BOLEŠĆU

VEDRANA PETROVEČKI¹, ZDRAVKO
KOVAČIĆ¹, ALICA PIZENT² I JASMINKA
JAKIĆ-RAZUMOVIĆ³

*Zavod za sudsku medicinu i
kriminalistiku, Medicinski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb¹,
Institut za medicinska istraživanja i
medicinu rada, Zagreb², Zavod za
patologiju, Klinički bolnički centar
Rebro, Zagreb³*

Primljeno 25. travnja 1996.

Utvrđivanje povišene koncentracije bakra u tkivima nužno je za potvrdu dijagnoze Wilsonove bolesti koju karakteriziraju simptomi oštećenja parenhimatoznih organa zbog kroničnog otrovanja bakrom. U radu su prikazani rezultati analiza tkiva uzetih prilikom obdukcije muškarca u dobi od 39 godina. Pokojniku je za života bila postavljena dijagnoza Wilsonove bolesti, a umro je zbog sepse nakon opsežnih opekлина zadobivenih u izravnoj vatri. Histološkom analizom nakon standardnog bojenja i nakon histokemijske obrade tkiva nije dokazano postojanje bakra. Spektrografom masa s linijskim spektrom kvalitativno je dokazana nazočnost bakra u tkivima. Plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom kvantitativno su utvrđene značajno povišene koncentracije bakra u jetri (240 mg/g), mozgu (73,8 mg/g) i bubrezima (30,0 mg/g vlažnog tkiva). Na temelju makroskopskih i mikroskopskih nalaza i analitičkih mjerenja je potvrđena dijagnoza Wilsonove bolesti. Rad predstavlja doprinos mogućnostima dijagnosticiranja ove rijetke bolesti.

Ključne riječi:
atomska apsorpcijska spektrometrija, histokemijska
analiza, kronično otrovanje bakrom, masena
spektrografija, tkivna koncentracija bakra

Temeljna značajka Wilsonove bolesti je povećano nakupljanje bakra u tijelu. Od organa najčešće su zahvaćeni jetra, bazalni gangliji, bubrezi i rožnica, a rjeđe mišićno tkivo, posteljica i plod (1-4). Bolest se nasljeđuje autosomno recesivno, a gen odgovoran za izražavanje bolesti nalazi se na dugom kraku kromosoma 13 (2, 3, 5). Bolest se pojavljuje rijetko (u tri do šest slučajeva na sto tisuća stanovnika) i u mlađoj životnoj dobi (od 5. do 40. godine), iako se prvi znakovi bolesti mogu pojaviti i u starijoj dobi (5-8).

Bakar je esencijalni oligoelement, važan za funkciju mitohondrija i eritropoezu i sastavni dio molekula različitih enzima (citokrom C-oksidge, monoaminooksidge, tirozinaze, laktaze, superoksid dismutaze, urikaze, dopamin β -hidroksilaze, lizil oksidge) (9). Od bakra unesenog hranom u organizam iskoristi se 30–50% (2, 8). Bakar se apsorbira u želucu i u početnom dijelu tankog crijeva. Nakon apsorpcije labavo se veže za albumine plazme i brzo se prenosi u jetru, gdje se pohranjuje vezan na metalotionein. Ostatak bakra veže se za apoceruloplazmin i izlučuje u serum. Ceruloplazmin veže 90–95% serumskog bakra i normalno se reciklira u jetrenim stanicama. Bakar se izlučuje u žuči vezan za bjelančevine velike molekulske mase, a mali dio izlučuje se mokraćom (2, 10, 11).

Etiologija i patogeneza Wilsonove bolesti nisu potpuno rasvijetljene. Bolesnici s Wilsonovom bolešću apsorbiraju jednake količine bakra iz hrane kao i zdravi pojedinci, no u žuči se nalaze snižene koncentracije bakra (12). Danas se smatra da je temeljni poremećaj na razini lizosoma jetrenih stanica, u kojima ne dolazi do cijepanja ceruloplazmina i izlučivanja bakra putem žuči (2, 13), iako se ne može potpuno odbaciti ni teorija o sintezi strukturalno abnormalnog ceruloplazmina (8, 12). Nakupljeni bakar oštećuje jetrene stanice i sekundarno uvjetuje inhibiciju sinteze apoceruloplazmina. S vremenom se slobodni bakar labavo vezan za albumine plazme ili druge ligande prelijeva u cirkulaciju i odlaže u različite organe (12). Od brojnih teorija o patogenezi Wilsonove bolesti, najčešće se spominju oštećenje jetrenih enzima bakrom, vezivanje bakra na bjelančevine citoplazme (npr. tubulin, što vjerojatno uzrokuje oblikovanje Malloryjevih tjelešaca) ili vezivanje na sulfhidrilne skupine bjelančevina i stvaranje slobodnih radikala. Simptomi bolesti zbog oštećenja jetre jesu: slabost, iscrpljenost, mučnina, bol u području epigastrija ili pod desnim rebrenim lukom, hepatomegalija, žutica, otekline i paukoliki angiomi. Mogu se pojaviti i ascites, spontani bakterijski peritonitisi, krvarenja iz proširenih venskih spletova, hipersplenizam sa splenomegalijom i endokrinološki poremećaji (primarna ili sekundarna amenoreja, odgođeni pubertet ili ginekomastija) (12). Prvi neurološki znakovi (tremor okrajina ili glave, usporavanje pokreta, dizartrija, disfagija, promuklost i katkad koreiformni pokreti ili distonični položaj okrajina) pojavljuju se u pravilu oko 19. godine (8). Zlatna ili zlatno-smeđa pigmentacija ruba rožnice, tzv. Kayser-Fleischerov prsten, suprotno općeprihvaćenom mišljenju, nije nazočna u svih bolesnika s neurološkim poremećajima (8, 12, 14).

Dijagnoza Wilsonove bolesti postavlja se na temelju nalaza količine izlučenog bakra u 24-satnoj mokraći, koncentracije ceruloplazmina i bakra u serumu ili ispitivanja toksikokinetike bakra s pomoću radionuklida. Bakar u biološkim uzorcima rutinski se utvrđuje kolorimetrijskim postupcima i plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom, dok se rjeđe rabe postupci emisijske spektrografije (spektrograf masa), spektroskopija rendgenskim zrakama i metoda neutronske aktivacije (9). U praćenju progresije bolesti rabi se biopsija jetre. Biopsijski uzorak tkiva jetre raščlanjuje se histološki i u njemu se može izmjeriti koncentracija bakra, što ima važno dijagnostičko značenje (1, 15). Specifično histokemijsko bojenje tkiva na bakar važan je dio dijagnostike (15–19). Kompjutorizirana tomografija (14) i magnetska rezonancija (20, 21) otkrivaju promjene na mozgu i prije pojave neuroloških simptoma. Uobičajeni nalazi, proširenje lateralnih ventrikula uz proširenje cerebralnih i cerebelarnih brazdi i atrofične promjene u bazalnim ganglijima, odgovaraju promjenama koje se nalaze pri obdukciji bolesnika s razvijenom slikom bolesti (14, 22).

Temeljno načelo liječenja Wilsonove bolesti jest peroralna terapija kelirajućim spojem penicilaminom (doza 1–2 g na dan) koja se mora započeti čim se postavi

dijagnoza (12, 14). Penicilamin oblikuje s bakrom kelate koji se izlučuju mokraćom. U određenim uvjetima može se primijeniti i liječenje trietil tetraminom (12) odnosno cinkom (1, 10).

UZORCI I METODE

Na Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu primljeno je mrtvo tijelo muškarca T. B., starog 39 godina, s opeklinama II. i III. stupnja na otprilike 30% površine tijela. Opekline su zadobivene u izravnoj vatri od zapaljenja plina. U dostupnoj medicinskoj dokumentaciji nije bilo podataka iz obiteljske i osobne anamneze kao ni o tijeku bolesti ili prethodnom bolničkom liječenju, osim napomene da pokojnik unatrag godinu dana nije uzimao propisane lijekove (tablete Tegretol i Metalcaptase). Nalazi biokemijskih pokazatelja upućivali su na postojanje jetrene bolesti, a podatak o prethodnoj terapiji na vrstu jetrene bolesti. Da bi se potvrdila dijagnoza Wilsonove bolesti, bilo je nužno dokazati povećanu koncentraciju bakra u tkivima (1, 15). Za usporedbu uzeti su kontrolni uzorci jetre i mozga prilikom obdukcije dviju zdravih osoba koje su poginule nesretnim slučajem i nisu bolovale od Wilsonove bolesti i u njima izmjerene koncentracije bakra.

Dijelovi uzoraka tkiva unutrašnjih organa uzetih tijekom obdukcije fiksirani su u formalinu i uklopljeni u parafin. Uzorci su histološki analizirani nakon standardnog hematoksilin-eozinskog bojenja (23), a nazočnost bakra u tkivima ispitana je histokemijski bojenjem rodaminom (15). Dio tkiva upotrijebljen je za kemijske analize.

Identifikacija bakra u uzorcima tkiva obavljena je emisijskom spektrografijom (spektrografom masa Carl Zeiss, Jena, Njemačka). Uzorci tkiva za spektrografsku analizu pripremljeni su modificiranom metodom prema Stolmanu (24). Dvadeset grama usitnjenog tkiva parenhimatoznih organa isušeno je nad vodenom kupelji i inkubirano 12 sati uz dodatak 50 mL koncentrirane HNO_3 . Otopina je prokuhana ispod povratnog hladila dok se nije razbistrila (3-5 sati), profiltrirana i potom ponovno prokuhana uz dodavanje koncentriranog H_2O_2 (10-20 mL) do potpunog razaranja organske tvari. Ostatak je uparen do potpunog izdvajanja ostataka HNO_3 . Tako priređeni uzorci uspoređeni su sa standardnom otopinom CuSO_4 (1 mg%).

Koncentracija bakra u uzorcima tkiva izmjerena je plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (na instrumentu Perkin-Elmer, model 5100). Uzorci tkiva razgrađeni su mokrom digestijom u koncentriranoj HNO_3 i koncentracija bakra utvrđena je prema kalibracijskoj krivulji priređenoj razrjeđivanjem otopine osnovnog standarda bakra ("Spectrosol", BDH) u 0,1 M HNO_3 (25). Dobivene vrijednosti koncentracija bakra uspoređene su s referentnim vrijednostima za odgovarajući organ (25) i s koncentracijama bakra izmjerenim u uzorcima tkiva uzetim postumno od kontrolnih ispitanika.

REZULTATI I RASPRAVA

Klinički podaci prikupljeni tijekom bolničkog liječenja opekline i detaljan prikaz svih obdukcijskih i histoloških nalaza dostupni su kod autora.

Obdukcijski nalazi koji su upućivali na postojanje Wilsonove bolesti bili su: tamnija pigmentiranost kože, smeđecrvenkasta obojenost područja bazalnih ganglija i ciroza jetre. Posljednji nalaz potvrđen je histološkom analizom, no mikroskopska slika jetrene ciroze nije patognomonična za Wilsonovu bolest (2, 15). Stoga se na temelju makroskopskog i mikroskopskog nalaza nije moglo zaključiti o kakvu se obliku ciroze radi. Slično tomu ni u uzorcima tkiva mozga nisu nađene karakteristične promjene koje se susreću u Wilsonovoj bolesti. Nadalje, histokemijskim bojenjem rodaminom nije dokazana prisutnost bakra niti u jednom uzorku tkiva, što ne isključuje postojanje Wilsonove bolesti (15, 16). Istraživanja su pokazala kako bakar u tkivu jetre nije jednoliko raspoređen, pa histološke promjene i kliničko izražavanje bolesti nisu sukladni koncentraciji bakra u tkivu (17–19).

Nazočnost bakra u tkivima utvrđena je kvalitativno emisijskom spektrografijom (spektografom masa) na temelju nastanka specifičnih linijskih spektara. Međutim, tek se kvantitativnim određivanjem bakra u uzorcima tkiva mogla pouzdano utvrditi dijagnoza Wilsonove bolesti. Plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom u analiziranim uzorcima tkiva ispitanika T. B. izmjerene su povišene vrijednosti koncentracije bakra. Na tablici 1. prikazane su koncentracije bakra u uzorcima jetre, mozga i bubrega uspoređene s referentnim vrijednostima za pojedini organ (prosječna vrijednost i raspon vrijednosti) (25). Koncentracija bakra u jetri T. B. bila je oko deset puta viša negoli u uzorcima tkiva dvojice kontrolnih ispitanika (24,5 i 18,0 $\mu\text{g/g}$ vlažnog tkiva) i više od trideset puta veća od prosječne referentne vrijednosti. U moždanom tkivu koncentracija bakra bila je gotovo peterostruko viša od vrijednosti izmjerenih u kontrolnim uzorcima (17,9 i 12,5 $\mu\text{g/g}$ vlažnog tkiva). Nadalje, može se zaključiti da je koncentracija bakra u mozgu ispitanika T. B. bila viša od prosječne referentne vrijednosti (25). Referentna koncentracija bakra u ljudskom mozgu dana na tablici izražena je na jedinicu suhe težine (a izmjerena je vrijednost na jedinicu vlažne težine), pa se ove vrijednosti ne mogu izravno uspoređivati. Koncentracija elementa izražena na jedinicu suhe težine općenito je nešto viša za odgovarajući organ negoli kad je izražena na jedinicu vlažne težine, no i takva niža je nekoliko puta od izmjerene koncentracije bakra u mozgu ispitanika. U bubregu ispitanika T. B. koncentracija bakra bila je gotovo deseterostruko viša od prosječne referentne vrijednosti (25), a u kontrolnim uzorcima nije izmjerena.

Tablica 1. Koncentracije bakra u jetri, mozgu i bubrezima ($\mu\text{g/g}$ vlažne težine) u muškarca s Wilsonovom bolešću, uspoređene s referentnim vrijednostima (25).
Table 1. Copper tissue concentrations ($\mu\text{g/g}$ wet weight) in the hepatic, cerebral and renal tissues in man with Wilson's disease compared to the reference values (25).

Tkivo <i>Tissue</i>	Ispitanik T. B. / <i>Examinee T. B.</i> $\mu\text{g Cu/g}$ vlažne težine / <i>wet weight</i>	Referentne vrijednosti <i>Reference values</i>
Jetra / <i>Liver</i>	240,0	7,1 \pm 3,2 (2,6 – 13,0)
Mozak / <i>Brain</i>	73,8	23,9 \pm 6,36 (13,1 – 39,4)*
Bubreg / <i>Kidney</i>	30,0	3,4 \pm 1,6 (1,2 – 8,1)

* $\mu\text{g Cu/g}$ suhe težine tkiva mozga / * $\mu\text{g Cu/g}$ dry brain tissue weight

Analičkim mjerenjem bakra u uzorcima tkiva jetre, mozga i bubrega T. B. dokazane su povišene vrijednosti koncentracije bakra čime je potvrđena dijagnoza Wilsonove bolesti. Dijagnostički najznačajnija bila je povišena vrijednost koncentracije bakra u tkivu jetre (1, 7, 17).

ZAKLJUČNI KOMENTAR

U nedostatku podataka iz dostupne medicinske dokumentacije o postojanju Wilsonove bolesti u obduciranog ispitanika moglo se zaključiti na temelju obdukcijских nalaza (obojenost kože i područja bazalnih ganglija, ciroze jetre) potkrijepljenih naknadnim histološkim i toksikološkim analizama uzoraka tkiva unutrašnjih organa. Zaključeno je da je bolesnik preminuo nasilnom smrću zbog sepse koja se razvila tijekom liječenja opeklina, a kvantitativni dokazi povišenih koncentracija bakra u uzorcima tkiva jetre, mozga i bubrega potvrdili su dijagnozu Wilsonove bolesti. Ovakav pristup nuždan je u svim slučajevima u kojima ne postoje pouzdani podaci o postojanju Wilsonove bolesti ili kod kojih postoji sumnja na Wilsonovu bolest, a dijagnoza nije potvrđena tijekom života.

LITERATURA

1. Tankanow RM. Patophysiology and treatment of Wilson's disease. Review. Clin Pharmacy 1991;10:839-49.
2. Kumar V, Cotran RS, Robbins LS. Robbins pathologic basis of disease. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994.
3. Propst A, Propst T, Feichtinger H et al. Copper-induced acute rhabdomyolysis in Wilson's disease. Gastroenterology 1995;108:885-7.
4. Uga M, Matsui N, Anai T et al. Copper deposition of the fetus and placenta in patient with untreated Wilson's disease. Am J Obs Gyn 1993;169:196-8.
5. McInyre N. Wilson disease, Kayser and Fleischer's sign and Walshe's treatment. Br J Clin Practice 1991;45:135-40.
6. Herra SA, Hevia FJ, Vargas M et al. Fulminant Wilson's disease in Costa Rica. Clinico-pathological study of 7 cases. Gen 1990;44:9-14.
7. Hefter H, Weiss P, Wesch H et al. Late diagnosis of Wilson's disease in a case without onset of symptoms. Acta Neurol Scand 1995;91:302-5.
8. Zudenigo D, Relja M. Hepatolentikularna degeneracija. Neurologija 1990;39:115-27.
9. Štraus B. Medicinska biokemija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 1992.
10. Yuzbasiyan-Gurkan V, Grider A, Nostrant T et al. Treatment of Wilson's disease with zinc: intestinal metallothionein induction. J Lab Clin Med 1992;120:380-6.
11. Scheinberg IH, Sternlieb I. Copper metabolism. Physiol Rev 1960;12:355-9.
12. Scheinberg IH, Sternlieb I. Wilson's Disease. In: Schiff L, Schiff ER, eds. Diseases of the Liver. 7th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1993: 659-68.
13. Sternlieb I, van den Hamer CJA, Morell AG et al. Lysosomal defect of hepatic copper excretion in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). Gastroenterology 1973;64:99.
14. Adams RD, Victor M. Principles of Neurology. 3rd ed. New York: McGraw Hill Book Co, 1985.
15. Schuer PJ. Liver biopsy interpretation. 4th ed. London: Baillière Tindall, 1988.

16. *Blasco A, Domínguez P, Colina F et al.* Wilson's disease. A histological review of 7 patients and the value of histological copper positivity in relation to other hepatopathies. *Med Clin* 1992;98:207-11.
17. *Faa G, Nurchi V, Demelia L et al.* Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease. *J Hep* 1995;22:303-8.
18. *McDonald JA, Snitch P, Painter D et al.* Striking variability of hepatic copper levels in fulminant hepatic failure. *J Gastro Hepat* 1992;7:396-8.
19. *Yano M, Sakamoto N, Takikawa T. et al.* Intrahepatocellular localization of copper in Wilson's disease. *Nagoya J Med Sci* 1993;55:131-7.
20. *Bešenski N, Babić T, Jurković P et al.* Low field magnetic resonance imaging in Wilson's disease. *Neurol Croat* 1993;42:107-15.
21. *Nazer H, Brismar J, al-Kawi MZ et al.* Magnetic resonance imaging of the brain in Wilson's disease. *Neuroradiology* 1993;35:130-3.
22. *Duchen LW, Jacobs JM.* Familial hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). In: Adams JH, Duchen LW, eds. *Greenfield's Neuropathology*. 5th ed. London: Edward Arnold, 1992:838-41.
23. *Lyon H, ed.* Theory and strategy in histochemistry. Berlin: Springer-Verlag, 1991.
24. *Stolman A, ed.* Progress in Chemical Toxicology. New York: Academic Press, 1969.
25. *Tsalev DL, ed.* Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice. Vol II. Determination of Individual Elements. Boca Raton: CRC Press, 1984.
26. *Di Maio DJ, Di Maio VJM.* Forensic Pathology. Boca Raton: CRC Press, 1993.

Summary

POSTMORTEM VERIFICATION OF HIGH TISSUE COPPER CONCENTRATIONS (a case of Wilson's disease)

The evaluation of tissue copper concentration is essential for the diagnosis of Wilson's disease. It is characterized by symptoms of the damages to parenchymatous organs, primarily liver and brain, due to chronic copper intoxication. The paper presents the autopsy tissue analysis of a 39-year-old patient diagnosed to suffer from the Wilson's disease while still alive. The patient died from sepsis due to burns caused by direct flame exposure. The standard histochemical staining of tissue samples failed to demonstrate the presence of copper but it was qualitatively proved by line spectrum-based mass spectrography. The copper concentrations in the liver, brain, and kidney (240, 73.8, and 30 µg/g wet tissue weight, respectively), measured by flame-atomic absorption spectrometry, were significantly elevated. In this study, the Wilson's disease was verified by a postmortem determination of increased copper concentration in the tissues. The results obtained contribute to the understanding of this rare disease.

Key words:

atomic absorption spectrometry, chronic copper intoxication, copper tissue concentration, histochemistry, mass spectrography

Requestes for reprints

Dr. Vedrana Petrovečki
Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Šalata 11
10000 Zagreb