

**Universitatea de Medicină și Farmacie
“Iuliu Hațieganu” – Cluj-Napoca
Facultatea de Medicină**

Teza de doctorat

**Aspecte privind diagnosticul și
prognosticul bolii Wilson**

**Conducător științific
Prof. Dr. Caius Duncea**

**Doctorand
Valentin Militaru**

2011

Cuprins

Introducere	5
I. <u>PARTEA GENERALĂ</u>	6
1. Scurt istoric	6
2. Stadiul actual al cunoașterii privind etiopatogeneza, diagnosticul și prognosticul bolii Wilson	9
II. <u>CERCETĂRI PERSONALE</u>	31
3. Impactul asupra prognosticului al depistării pacienților cu boală Wilson în stadiul presimptomatic	31
3.1. Introducere	31
3.2. Ipoteza de lucru	34
3.3. Obiectivele cercetării	34
3.4. Material și metodă	35
3.5. Rezultate	38
3.6. Discuții	48
3.7. Concluzii	55
4. Întârzierea diagnosticului bolii Wilson și factorii care o influențează	57
4.1. Introducere	57
4.2. Ipoteza de lucru	58
4.3. Obiectivele cercetării	59
4.4. Material și metodă	59
4.5. Rezultate	63
4.6. Discuții	79
4.7. Concluzii	85
5. Particularități ale scorului diagnostic (Leipzig) și ale fenotipurilor clinice, în funcție de vârstă și sex în boala Wilson	86
5.1. Introducere	86
5.2. Ipoteza de lucru	87
5.3. Obiectivele cercetării	87
5.4. Material și metodă	88
5.5. Rezultate	92
5.6. Discuții	100
5.7. Concluzii	103
Concluzii generale	105
Elementele originale și limitele cercetării	107
Bibliografie	109

Cuvinte-cheie: boala Wilson, inelul Kayser-Fleischer, întârzierea diagnosticului, depistarea pacienților presimptomatici, scorul diagnostic (Leipzig), fenotipurile clinice de boală Wilson

I. PARTEA GENERALĂ:

1. Scurt istoric: Chiar dacă un tablou clinic compatibil cu boala Wilson (BW) este consemnat pentru prima dată în 1850, prima descriere completă a fost făcută în 1912 de Samuel Alexander Kinnier Wilson. În 1902 și, respectiv în 1903, Kayser și apoi Fleischer au descris inelul corneean brun-roșcat, pe care l-au asociat unei boli numite „multiscleroză”. În decursul secolului XX cunoștințele despre BW s-au dezvoltat progresiv, culminând în 1993 cu clonarea genei ATP7B de către 3 colective de cercetare.

2. Stadiul actual al cunoașterii privind etiopatogeneza, diagnosticul și prognosticul bolii Wilson: Epidemiologia BW: Frecvența bolii este estimată la 1/30000 de nașteri, frecvența portajului heterozigot al genei bolnave fiind mai mare (estimată la 1/90 indivizi). Ca și în alte boli autosomal recesive, există zone cu concentrare mare de cazuri, fapt explicat prin consanguinizare.

Etiopatogeneza și anatomia patologică în BW. Cuprul este necesar mai multor procese celulare (respirația mitocondrială, apărarea antioxidantă etc.), fiind în același timp foarte toxic (generează specii reactive de oxigen). În hepatocit este legat de proteina ATP7B, care îl încorporează în ceruloplasmină sau îl elimină în canaliculul biliar. O serie de mutații ale genei ATP7B au ca și consecință disfuncția acesteia, cu acumularea cuprului în hepatocite și stres oxidativ consecutiv.

Primele modificări hepatice sunt vizibile la nivelul mitocondriilor. Ulterior se constată steatoză macro- sau microveziculară, nucleii glicogenici, depozite de cupru, fibroză/ciroză, infiltrate mononucleare. La nivel cerebral se constată atrofie, pigmentare și degenerare chistică a nucleului caudat și a putamenului.

Manifestări clinice în boala Wilson.

- manifestări hepatice: de la hepatomegalie asimptomatică până la insuficiență hepatică acută (adesea fatală); adesea ciroză hepatică (simptomatică sau nu);
- manifestări neurologice: majoritatea de tip extrapiramidal;
- manifestări psihice: depresie, comportament bizar, pierderea randamentului școlar;
- manifestări oculare: inelul Kayser-Fleischer (vizibil cu ochiul liber sau evidențiat prin examen biomicroscopic), cataracta „în floarea soarelui”;
- altele: cutanate, renale, osteo-articulare, cardiomiopatie, pancreatită.

Diagnosticul de laborator în boala Wilson. Se bazează pe probele funcțional-biochimice hepatice, ceruloplasmina serică, cuprul seric (total și liber), cupruria/24 ore și dozarea cuprului în țesutul hepatic.

Diagnosticul genetic în boala Wilson. Constă fie în analiza microsateleților, fie în analiza directă a mutațiilor genei ATP7B. Până în prezent s-au descris peste 320 mutații și 80 polimorfisme, lista lor putând fi accesată pe următorul *site*: <http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp>.

Clasificarea fenotipică și diagnosticul pozitiv. În 2001 a avut loc la Leipzig (Germania) o reuniune a experților în boala Wilson și boala Menkes, care au definit următoarele fenotipuri clinice de BW: hepatică (acută/cronică), neurologică (neasociată bolii hepatice/asociată bolii hepatice/neinvestigată pentru boala hepatică) și altele.

Scorul diagnostic (Leipzig) a fost definit în cadrul aceleiași reuniuni ca un instrument pentru clinicieni, util în cazurile la care manifestările clinice sau/și modificările de laborator sunt mai puțin evidente. Este construit pe baza unor parametri clinici, neuroimagingici, biologici, histologici și genetici. Valoarea sa peste 4 face ca diagnosticul de BW să fie foarte probabil, la valori de 2-3 diagnosticul este probabil (alte teste fiind necesare pentru confirmare), iar valorile de 0-1 fac diagnosticul de BW improbabil.

Prognosticul BW este favorabil dacă pacienții presimptomatici beneficiază de tratament și dacă diagnosticul este stabilit precoce. În absența tratamentului evoluția este întotdeauna fatală. Evoluția sub tratament a formelor simptomatice este favorabilă în majoritatea cazurilor și variază de la un pacient la altul. Hepatita fulminantă are o mortalitate mare.

II. CERCETĂRI PERSONALE:

3. Impactul asupra prognosticului al depistării pacienților cu boală Wilson în stadiul presimptomatic:

Ipozeza de lucru: Utilitatea și eficiența depistării și tratamentului BW în faza presimptomatică sunt probate de câteva studii din literatura medicală. Majoritatea sunt însă studii observaționale, non-intervenționale, realizate pe loturi mici de pacienți, urmărite pe perioade mai lungi sau mai scurte, iar adesea datele sunt incomplete.

Obiectivele cercetării: a) Compararea pacienților depistați printr-o anchetă familială (presimptomatici) cu cei al căror diagnostic a fost stabilit în urma unor manifestări clinice (simptomatice) în două planuri temporale:

- la momentul diagnosticului – parametrii clinici și paraclinici ai afectării hepatice, neurologice, psihiatrice și renale;
- în evoluție – durata de supraviețuire, agravarea BW, necesitatea recurgerii la transplantul hepatic, eficiența terapiei medicamentoase.

b) Compararea parametrilor demografici, clinici, biologici, terapeutici și evolutivi între pacienții cu BW provenind din două centre universitare din Franța: Besançon și Dijon.

Material și metodă: Am analizat retrospectiv dosarele medicale ale 23 pacienți (8 M, 15 F) cu BW urmăriți într-o perioadă de 53 ani (1954-2007) în serviciile de hepatologie ale Spitalelor Universitare din Besançon (15 pacienți – 6 M, 9 F) și Dijon (8 pacienți – 2 M, 6 F). La 16 dintre pacienții studiați diagnosticul de BW a fost facilitat de manifestările clinice (grupul ND – nedepistați = simptomatice), diagnosticul celorlalți 7 fiind stabilit în urma unei anchete familiale (grupul D – depistați). Am notat următoarele date: clinice (prezența și severitatea afectării hepatice, prezența afectării neurologice/psihice, vizibilitatea inelului Kayser-Fleischer), biologice (indicele de

protrombină – IP, albuminemia, ASAT, ALAT, bilirubinemia, ceruloplasminemia, cupruria și creatininemia), terapeutice (durata utilizării D-Penicilaminei, efectuarea transplantului hepatic) și evolutive (decesul, agravarea neurologică/hepatică, dispariția inelului Kayser-Fleischer).

Am realizat un studiu longitudinal, observațional, de cohortă.

Pentru analiza statistică am utilizat testul non-parametric Mann-Whitney, testul t , testul Hi-pătrat (χ^2) și testul Log-Rank. Analizele statistice au fost efectuate cu ajutorul programului SPSS 17. Am considerat pragul semnificației statistice $p < 0,05$ (CI 95%).

Rezultate: Nu au fost diferențe între grupul D și ND în ceea ce privește vârsta mediană ($p = 0,663$ - Mann-Whitney) sau sexul ($p = 0,374$ - χ^2). Cu ajutorul testului χ^2 am constatat lipsa diferențelor între cele două grupuri la momentul diagnosticului în ceea ce privește frecvența afectării hepatice ($p = 0,43$), a cirozei hepatice ($p = 0,311$), a afectării neurologice ($p = 0,292$), a manifestărilor psihice ($p = 1,00$) și a frecvenței cu care inelul Kayser-Fleischer a fost pus în evidență ($p = 0,53$).

Dintre parametrii de laborator comparați între cele două grupuri la momentul diagnosticului am constatat diferență semnificativă pentru bilirubinemie ($p = 0,035$ – Mann-Whitney) și pentru creatininemie ($p = 0,022$ – Mann-Whitney). Întrucât pacienții care s-au prezentat în insuficiență hepatică acută (IHA) aveau valorile cele mai mari ale creatininemiei, am realizat o corelație parțială pentru creatininemie, cu control pentru prezența IHA, constatând pierderea semnificației statistice ($p = 0,248$). Am interpretat acest fapt ca și corecția *bias*-ului indus de IHA ca variabilă *confounder*.

Nu am constatat diferențe între frecvența utilizării D-Penicilaminei la pacienții presimptomatici depistați față de cei simptomatici ($p = 1,00$). Durata tratamentului cu D-Penicilamină a fost semnificativ mai lungă la pacienții depistați în faza presimptomatică față de pacienții simptomatici ($p = 0,012$ – Mann-Whitney). Nici un pacient presimptomatic nu a fost transplantat, față de 9 din pacienții simptomatici ($p = 0,038$ – χ^2).

Am efectuat o analiză de tip „curbă de supraviețuire” cu ajutorul testului Log-Rank. Am ales ca eveniment-cenzor decesul sau transplantul hepatic și am găsit o diferență semnificativă de supraviețuire fără transplant hepatic între pacienții depistați și cei simptomatici ($p = 0,004$). Am privit acest rezultat ca pe o dovadă a eficienței terapiei precoce cu D-Penicilamină la pacienții presimptomatici în controlul BW.

Nu am constatat diferențe între pacienții provenind din Besançon față de cei din Dijon pentru niciunul dintre parametrii demografici, clinici, terapeutici și evolutivi, lotul dovedindu-și astfel omogenitatea.

4. Întârzierea diagnosticului bolii Wilson și factorii care o influențează:

Ipoteza de lucru: În ciuda progreselor realizate în ceea ce privește mijloacele de investigare a BW, persistă întârzierea în stabilirea diagnosticului, principalele cauze ale acesteia fiind reprezentate de lipsa „atenției” clinice și de polimorfismul manifestărilor

BW. Paucitatea literaturii medicale internaționale și absența completă din literatura românească a studiilor privind întârzierea diagnosticului BW și a factorilor care o modifică într-un sens sau în celălalt ne-au determinat să ne propunem studiul acestora. Un alt motiv pentru care am abordat această problemă este reprezentat de diferențele dintre datele din literatură privind aceste aspecte ale BW.

Obiectivele cercetării: Ne-am propus să evaluăm mărimea intervalului de timp cu care întârzie diagnosticul BW și să identificăm factorii care-l influențează.

Material și metodă: Am analizat retrospectiv documentele medicale ale 21 pacienți cu BW, consultați sau/și internați în perioada ianuarie 2003 - februarie 2010 în Clinica Medicală V (adulții – cu vârsta de cel puțin 18 ani) și, respectiv, în Clinica Pediatrie II (pacienții pediatrici – cu vârsta sub 18 ani) din Cluj-Napoca. Am notat următoarele date: clinice (data aproximativă a primelor simptome, modalitatea de debut, prezența și severitatea afectării hepatice, prezența manifestărilor neurologice sau/și psihice, rezultatul examenului oftalmologic), biologice (bilirubinemia totală, albuminemia, IP, ALAT și ASAT, cupruria, cupremia și ceruloplasminemia) și rezultatul testării genetice (realizată cu sprijinul Prof. Dr. Peter Ferenci și a colaboratorilor săi din cadrul Innere Medizin III – Universitatea de Medicină din Viena - Austria). Pacienții au fost încadrați într-unul dintre fenotipurile clinice cunoscute și li s-a calculat scorul diagnostic (Leipzig).

Studiul a fost unul observațional, analitic, de cohortă.

Au fost evaluate relațiile dintre întârzierea diagnosticului și parametrii demografici, clinici, biologici și genetici menționați. Am utilizat testele Mann-Whitney, Kruskal Wallis, corelațiile Pearson și Spearman. Testele statistice au fost aplicate inițial întregului lot de pacienți și au fost reluate apoi doar pentru pacienții simptomatici, fiind excluși cei al căror diagnostic a fost stabilit în urma unei depistări active. Am utilizat programul SPSS 17, considerând $p < 0,05$ ca limita semnificației statistice (CI 95%).

Rezultate: Vârsta medie a fost de $19,47 \pm 12,84$ ani, iar cea mediană de 14 ani, extremele de vârstă fiind de 8 și, respectiv, 55 ani. Dintre cei 21 pacienți 4 au fost adulți și 17 pediatrici. Sex ratio a fost F/M = 10/11. Întârzierea diagnosticului a variat de la 0 zile (diagnosticul a fost stabilit chiar în ziua consultației/internării pacientului) până la 3288 zile (aproximativ 9 ani), cu o medie de $812,14 \pm 1122,76$ zile, adică 2 ani și aproape 3 luni, și o mediană de 120 zile (aproximativ 4 luni). Aceste valori au fost similare celor din literatură.

Următorii factori au influențat întârzierea diagnosticului în mod semnificativ statistic: vârsta ca variabilă numerică ($p=0,015$, $r=0,524$ – corelația Spearman) și dihotomică – pediatric/adult ($p=0,007$, $r=0,574$ – corelația Spearman); modalitatea de debut (hepatic/neurologic/ depistare – $p=0,002$ – test Kruskal-Wallis); prezența afectării hepatice ($p=0,004$, $r=-0,602$); prezența manifestărilor psihice ($p=0,028$, $r=0,480$); valorile ALAT ($p=0,006$, $r=-0,592$) și ASAT ($p=0,018$, $r=0,521$). Ceilalți parametri clinici sau biologici testați nu au avut o influență semnificativă statistic asupra retardului

diagnostic. Testul Kruskal-Wallis a infirmat prezența diferenței semnificative statistic între medianele scorurilor diagnostice ale pacienților încadrați în cele 4 fenotipuri clinice ($p=0,330$).

Eliminând cei 4 pacienți netestați genetic, am constatat existența unei diferențe semnificative statistic ($p=0,016$ – test Kruskal-Wallis) între medianele întârzierilor diagnosticelor în cele 4 subgrupuri (homoziгоți, heterozigoți compuși, heterozigoți și fără mutații detectate). La cei 17 pacienți la care testarea genetică a fost realizată, am constatat existența unei corelații inverse, semnificativă statistic, de putere medie între valoarea numerică a scorului diagnostic (Leipzig) și retardul diagnostic ($p=0,02$, $r=-0,557$).

Pentru a corecta eventualul *bias* indus de existența a trei pacienți presimptomatici depistați prin anchetă familială, fără întârziere de diagnostic, i-am eliminat pe aceștia și am reluat testele statistice de mai sus cu cei 18 pacienți simptomatici. Am obținut rezultate similare cu cele de mai sus, cu două excepții: diferența între mediana întârzierii diagnostice a pacienților cu manifestări neurologice și a celor fără astfel de manifestări a fost la limita semnificației statistice ($p=0,05$) și nu am constatat o corelație între prezența manifestărilor psihice și întârzierea diagnosticului ($p=0,062$).

5. Particularități ale scorului diagnostic (Leipzig) și ale fenotipurilor clinice, în funcție de vârstă și sex în boala Wilson:

Ipozeza de lucru: Autorii scorului diagnostic (Leipzig) au recomandat în articolul lor evaluarea prospectivă a scorului, lucru realizat până în prezent de puține studii. Nu am găsit în literatura medicală nici o publicație care să evalueze influența asupra scorului diagnostic (Leipzig) a unor variabile demografice (vârsta, sexul) și clinice (prezența și severitatea afectării hepatice, modalitatea de debut). Un alt imbold pentru această cercetare este reprezentat de absența studiilor care să evalueze fenotipurile clinice în ceea ce privește valoarea lor diagnostică, distribuția lor și dependența de factori demografici sau clinici.

Obiectivele cercetării: Ne-am propus să studiem următoarele aspecte:

- a) fenotipurile clinice: frecvențele lor relative în lotul studiat, relația lor cu vârsta și sexul.
- b) raportul afectării hepatice și al manifestărilor neurologice cu vârsta.
- c) efectul asupra scorului diagnostic (Leipzig) al unor factori:
 - demografici: sexul, vârsta pacienților la momentul diagnosticului,
 - clinici: prezența afectării hepatice, severitatea afectării hepatice (hepatită cronică/ciroză), modalitatea de debut (hepatică, neurologică sau depistare activă prin *screening*).

Material și metodă: Am studiat retrospectiv documentele medicale ale 24 pacienți cu BW, consultați sau internați în Clinica Medicală V și, respectiv, Clinica Pediatrie II din Cluj-Napoca în perioada ianuarie 2003-octombrie 2010. Au fost colectate următoarele date: demografice (sex și vârstă), clinice (prezența/absența afectării hepatice,

a manifestărilor neurologice, a inelului Kayser-Fleischer, modalitatea de debut – hepatic/neurologic sau screening), biologice (ceruloplasminemia, cupruria/24 ore, concentrația cuprului în țesutul hepatic și testarea genetică - realizată cu sprijinul Prof. Dr. Peter Ferenci și a colaboratorilor săi din cadrul Innere Medizin III – Universitatea de Medicină din Viena). Pacienții au fost clasificați după fenotipul clinic și li s-a calculat scorul diagnostic (Leipzig). Am analizat relația dintre apartenența la un anumit fenotip clinic și vârstă (ca variabilă numerică, dar și dihotomică – pacient pediatric/adult) și sex. Am căutat o asocieră între vârsta la momentul diagnosticului și prezența afectării hepatice și a manifestărilor neurologice. Am căutat eventuale corelații între valoarea numerică a scorului Leipzig și: vârsta pacienților la momentul diagnosticului, sex, modalitatea de debut, prezența și severitatea afectării hepatice.

Studiul a fost unul observațional, analitic, de cohortă.

Am efectuat testele Hi-pătrat (χ^2), Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, corelația Spearman (neparametrică). Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul programului SPSS 17. Am considerat $p < 0,05$ ca prag al semnificației statistice (CI 95%).

Rezultate: Grupul de pacienți studiat a fost compus din 7 adulți și 17 pacienți pediatrici, cu o vârstă medie de $20,33 \pm 13,58$ ani și mediană de 14,5 ani. Sex ratio a fost F/M = 10/14. Nu am avut pacienți încadrabili în fenotipurile Nx sau O.

Nu am constatat diferențe semnificative între pacienții încadrați în cele 4 fenotipuri clinice reprezentate în lot, din punct de vedere al vârstei sau sexului. Vârsta ca variabilă numerică s-a corelat direct cu prezența manifestărilor neurologice ($p=0,05$, $r=0,41$ – corelația Spearman) și invers cu prezența afectării hepatice ($p=0,02$, $r=-0,46$ - corelația Spearman). Vârsta ca variabilă dihotomică (pediatric/adult – separate prin pragul de 18 ani) nu s-a corelat cu niciuna dintre cele două variabile de mai sus. Cu ajutorul analizei de tip ROC am stabilit vârsta-prag de 36,5 ani care separă pacienții mai tineri, la care afectarea hepatică este semnificativ mai frecventă, de cei mai în vârstă, la care este mai rară. Vârsta-prag de 20,5 ani, stabilită de asemenea prin analiză ROC, are semnificație similară pentru manifestările neurologice.

Nu am găsit corelații între valoarea numerică a scorului diagnostic și sex, vârstă, prezența și severitatea afectării hepatice și modalitatea de debut. Testele statistice au fost efectuate în două moduri: ținând cont de concentrația hepatică a cuprului (disponibilă la un singur pacient), apoi ignorând-o; nu am găsit diferențe semnificative între rezultate.

Cu ajutorul testului Kruskal-Wallis am pus în evidență o diferență semnificativă între medianele scorurilor diagnostice ale pacienților aparținând celor 4 fenotipuri reprezentate în lot ($p=0,028$). Cu ajutorul testului Mann-Whitney am comparat medianele scorurilor diagnostice între două câte două fenotipuri clinice, constatând o diferență semnificativă doar între pacienții încadrați în fenotipurile H2 (valori mici ale scorului) și N1 (valori mari ale scorului) ($p=0,028$).

Concluzii generale:

1. Frecvența atingerii hepatice și a cirozei hepatice nu diferă semnificativ, la momentul diagnosticului BW, între pacienții la care acesta a fost stabilit precoce, în urma unei depistări familiale și pacienții simptomatici.

2. Frecvența afectării neurologice, a manifestărilor psihice și a inelului Kayser-Fleischer nu diferă semnificativ la momentul diagnosticului între pacienții depistați în faza presimptomatică a BW și cei simptomatici.

3. Bilirubinemia este semnificativ mai mare la momentul diagnosticului la pacienții simptomatici, față de cei aflați în faza presimptomatică a BW dar celelalte probe funcțional-biochimice hepatice nu diferă semnificativ între cele două grupuri de pacienți.

4. Mediana creatininemiei pacienților cu BW depistați în stadiul presimptomatic este semnificativ mai mică față de cea a pacienților simptomatici, diferența fiind consecința frecvenței mai mari a IHA în grupul pacienților simptomatici.

5. Tratamentul cu D-Penicilamină poate controla BW o perioadă semnificativ mai lungă de timp la pacienții depistați activ, în faza presimptomatică, față de pacienții diagnosticați în faza simptomatică a BW.

6. Pacienții cu BW depistați activ (presimptomatici) au o durată de supraviețuire fără transplant hepatic semnificativ mai mare, comparativ cu cei simptomatici.

7. Prognosticul pacienților cu BW simptomatică, tratați cu D-Penicilamină, nu diferă semnificativ statistic de cel al pacienților depistați activ în faza presimptomatică, sub același tratament, în ceea ce privește frecvența agravării neurologice, deteriorării funcționale hepatice și deceselor.

8. Întârzierea diagnosticului de BW are o mare variabilitate în timp, cuprinsă între 0 zile și 9 ani.

9. Principalul determinant al întârzierii diagnosticului BW este vârsta pacienților, atât ca variabilă numerică (ani), cât și ca variabilă dihotomică (pacient pediatric/adult – separați prin vârsta de 18 ani).

10. Debutul BW prin manifestări hepatice este asociat unei întârzieri semnificativ mai reduse a diagnosticului, față de formele care debutează cu manifestări neurologice.

11. Întârzierea diagnosticului de BW este semnificativ mai redusă la pacienții care prezintă afectare hepatică în cadrul bolii, față de cei care nu au acest tip de afectare, fără ca severitatea bolii hepatice să influențeze semnificativ retardul diagnosticului.

12. Diagnosticul de BW este stabilit într-un interval de timp semnificativ mai scurt la pacienții care prezintă creșterea valorilor transaminazelor, față de pacienții cu transaminaze normale.

13. Diminuarea ceruloplasminemiei și creșterea cupremiei și cupruriei/24 ore nu influențează semnificativ întârzierea diagnosticului de BW.

14. Medianele întârzierilor diagnosticului de BW diferă semnificativ între pacienții homozigoți, heterozigoți compuși, heterozigoți și fără mutații detectate la nivelul genei ATP7B.

15. Apartenența la un fenotip clinic nu influențează semnificativ intervalul de timp cu care întârzie diagnosticul de BW.

16. Există o corelație inversă, semnificativă statistic, de putere medie, între valoarea numerică a scorului diagnostic (Leipzig) și întârzierea diagnosticului BW, în sensul că diagnosticul întârzie cu atât mai puțin cu cât scorul Leipzig este mai mare.

17. Încadrarea pacienților cu BW într-un fenotip clinic nu este influențată de sexul sau vârsta acestora.

18. Frecvența afectării hepatice în cadrul BW se corelează invers, semnificativ statistic, cu vârsta pacienților (cu cât pacienții sunt mai tineri, cu atât frecvența afectării hepatice este mai mare).

19. Frecvența manifestărilor neurologice în cadrul BW se corelează direct, semnificativ statistic, cu vârsta pacienților (cu cât pacienții sunt mai vârstnici, cu atât frecvența manifestărilor neurologice este mai mare).

20. Nu există o asociere semnificativă statistic între valoarea numerică a scorului diagnostic Leipzig și vârstă, sex, modalitatea de debut, prezența și severitatea afectării hepatice în BW.

21. Există o diferență semnificativă statistic între medianele scorurilor Leipzig ale pacienților aparținând fenotipurilor H1, H2, N1 și N2, consecință a unei diferențe semnificative între valorile mari ale scorului la pacienții aparținând fenotipului N1 și, respectiv, valorile mici ale lui la pacienții aparținând fenotipului H2.

Limitele cercetării:

1. Studiile realizate sunt retrospective.
2. Am colectat o parte dintre cazuri din alte servicii medicale, aceasta putând fi la originea unor neuniformități a practicilor medicale.
3. Lotul de pacienți a fost relativ mic.

Elementele de originalitate ale cercetării:

1. Supraviețuirea fără transplant hepatic – parametru nou-definit.
2. Corelația directă între vârsta pacientului și întârzierea diagnosticului BW.
3. Corelația inversă între transaminazemie și întârzierea diagnosticului BW.
4. Influența rezultatelor testării genetice asupra întârzierii diagnosticului de BW.
5. Corelația inversă între scorul diagnostic (Leipzig) și retardul diagnostic.
6. Independența fenotipurilor clinice ale BW de sexul și vârsta pacienților.
7. Diferența semnificativă statistic între scorurile diagnostice (Leipzig) ale pacienților aparținând diferitelor fenotipuri clinice.
8. Corelațiile vârstei la momentul diagnosticului cu frecvența manifestărilor neurologice (corelație directă) și, respectiv, atingerii hepatice (corelație inversă).
9. Stabilirea, printr-o analiză ROC, a vârstelor-prag pentru afectarea hepatică și, respectiv, neurologică.

CURRICULUM VITAE

A. Date personale:

- 1. Nume:** MILITARU
- 2. Prenume:** VALENTIN
- 3. Data și locul nașterii:** 23 decembrie 1974, Cluj-Napoca
- 4. Cetățenie:** română
- 5. Stare civilă:** căsătorit
- 6. Studii**

Instituția	Liceul	Facultatea	Master	Rezidențiat	Rezidențiat (al 2-lea)
Perioada	1989-1993	1993-1999	2000-2001	2001-2007	2009-prezent
Grade sau diplome obținute	Bacalaureat	Licență	Diplomă de Master în Informatică și Biostatistică Medicală	Medic specialist în medicină internă	Medic rezident în gastroenterologie

7. Experiență profesională

Perioada	ian 2000-ian 2001	feb-sept 2001	oct 2001-apr 2005	mai 2005-oct 2006	nov 2006-prezent	oct 2007-prezent	feb 2009-prezent
Locul	Cluj-Napoca	Cluj-Napoca	Cluj-Napoca	Besançon (Franța)	Cluj-Napoca	Cluj-Napoca	Cluj-Napoca
Instituția	Spit. Cl. Municipal	Spit. Cl. Județean	U.M.F. - Cl. Medicală V	Centre Hospitalier Universitaire - service de gastroenterologie	U.M.F. - Cl. Medicală V	Spit. Cl. Municipal	UMF Cluj-Napoca
Funcția	stagiar	rezident în medicină internă	preparator	faisant fonction d'interne	asistent universitar	integrare clinică - medic specialist medicină internă	rezident în gastroenterologie

8. Locul de muncă actual și funcția: Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” – asistent universitar

9. Vechime la locul de muncă actual: 10 ani

10. Membru al asociațiilor profesionale:

- European Association for the Study of the Liver (EASL)

11. Limbi străine cunoscute: engleză, franceză, italiană

12. Alte competențe: ecografie generală

13. Specializări și calificări:

- 03.10-19.12.1999 – Tel Aviv (Israel) – Stagiul de formare în medicina de urgență

- 01.02-30.04. 2004 – Angers (Franța) – Stagiul de formare în endoscopia digestivă (bursă a Guvernului României)

- 01.05.2005-30.10.2006 – Besançon (Franța) – Attestation de Formation Spécialisée în gastroenterologie și hepatologie

14. Activitate redacțională: din anul 2011 – recenzor științific la Revista HVM Bioflux (indexată CNCSIS B+)

B. Activitate științifică:

Capitole publicate: 1

- **Militaru V.** *Semiologia aparatului digestiv.* In Lucaciu D. (ed.) *Semiologie medicală.* Editura Alma Mater, Cluj-Napoca, pp. 87-114, 28 pg., 2003.

Articole publicate in extenso în reviste indexate în baze de date internaționale: 6

- Rădulescu L, Duncea CR, Rădulescu D, **Militaru V**, Pârv A. *Cardiotoxicity of antineoplastic agents: onset, risk factors and clinical manifestation.* HVM Bioflux 3(2), pp. 150-157, 8 pg., 2011.

- **Militaru V**, Miu N, Pop TL, Burac L, Ștefănescu A, Crișan S, Vesa Ș, Rădulescu L, Duncea CR. *Diagnostic particularities in Wilson's disease as related to age, sex and clinical presentation.* HVM Bioflux 3(2), pp. 119-124, 6 pg., 2011.

- **Militaru V**, Miu N, Pop TL, Burac L, Ștefănescu A, Crișan S, Duncea CR, Vesa Ș. *The delay of the diagnosis in Wilson's disease.* Clujul Medical 84(2), pp. 274-277, 4 pg., 2011.

- **Militaru V**, Pop T, Burac L, Miu N, Ștefănescu A, Militaru FC, Bocșan CI, Buzoianu A, Duncea C. *D-Penicillamine and Zinc therapy for Wilson's disease.* Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology 15(1), pp. 35-39, 5 pg., 2011.

- Crișan S, **Militaru V**, Crișan IM. *Abdominal aortic aneurysm – online methods of patient education.* Med Ultrason 12(1), pp. 22-25, 4 pg., 2010.

- Crișan S, Niță T, Vișovan D, Vesa Ș, Buzdugan E, Donca V, **Militaru V**, Busuioceanu E, Pîrloagă IA, Pestrea C, Crișan IM. *Online methods of patient education concerning arterial duplex ultrasonography of the legs.* Med Ultrason 11(2), pp. 11-14, 4 pg., 2009.

Articole publicate in extenso în reviste de circulație națională recunoscute: 11

- Crișan S, Chirilă D, Constantea N, Pop T, **Militaru V**, Pițura M. *Varice bilaterale ale croșei venei safene mari – prezentare de caz.* Revista Româna de Ultrasonografie 7(3-4), pp.155-158, 4 pg., 2005.

- Crișan S, Crișan D, Duncea C, Donca V, Jivănescu-Bunea D, Buzdugan E, Ciovișescu F, **Militaru V**, Pop T, Rad M. *Explorarea Doppler cu emisie pulsatorie a venelor femurală și poplitee.* Revista Română de Ultrasonografie 7(1-2), pp. 67-76, 10 pg., 2005.

- Lucaciu D, Ghidrai O, Duncea C, Donca V, Mihut S, Condor A, **Militaru V**, Macarie A. *Modificari electrocardiografice evidențiate prin înregistrare continua Holter la bolnavi vârstnici aflați în program de hemodializă cronică.* Romanian Journal of Gerontology and Geriatrics 25(2), pp. 27-33, 7 pg., 2003.

- Lucaciu D, Mihut S, Condor A, Donca V, Buzdugan E, **Militaru V**, Radulescu D. *Hemodializa la vârstnici – observații privind particularități clinico-evolutive și prognostice.* Clujul Medical 76(4), pp. 857-861, 5 pg., 2003.

- Lucaciu D, Donca V, Condor A, Mihut S, **Militaru V**, Ciovișescu F. *Tulburări de ritm cardiac la bolnavii cu insuficiență renală cronică aflați în program de hemodializă iterativă.* Studiu Holter. Clujul Medical 76(3), pp. 608-612, 5 pg., 2003.

- Crișan S, Duncea C, **Militaru V**, Constantea N, Donca V, Buzdugan E, Crișan D, Hergheba D, Pop T, Vlaicu R. *Characteristics of peripheral arterial obstructive disease in*

rural environment patients. Romanian Journal of Angiology and Vascular Surgery. 5(3-4), pp. 78-81, 4 pg., 2003.

- Crișan S, Constantea N, Pop T, Duncea C, Donca V, Buzdugan E, **Militaru V**. *Formațiune tumorală localizată în fosa poplitee: chist Baker (Răspuns quiz RRU 2003; 5(2))*. Revista Română de Ultrasonografie. 5(3-4), pp. 243-244, 2 pg., 2003.

- Crișan S, Constantea N, Pop T, Duncea C, Donca V, Buzdugan E, **Militaru V**. *Formațiune tumorală localizată în fosa poplitee (quiz nr 2-2003)*. Revista Română de Ultrasonografie. 5(2), pp. 149-150, 2 pg., 2003.

- Crișan S, Duncea C, Constantea N, Donca V, Buzdugan E, **Militaru V**, Iștoc A, Crișan D. *Examinarea venei femurale cu ajutorul ultrasonografiei bidimensionale*. Revista Română de Ultrasonografie. 5(2), pp. 123-129, 7 pg., 2003.

- Crișan S, Duncea C, Buzdugan E, Constantea N, Donca V, **Militaru V**, Andercou A, Gherman I, Nicorici C, Herghea D. *Relația grupelor sanguine din sistemul ABO cu ateroscleroza obliterantă a membrelor inferioare*. Clujul Medical 76(2), pp. 338-344, 7 pg., 2003.

- Crișan S, Duncea C, Iștoc A, Donca V, **Militaru V**, Buzdugan E, Alda G. *Explorarea ultrasonografică Doppler continuu a sistemului carotidian extracranian*. Revista Română de Ultrasonografie 5(1), pp. 25-32, 8 pg., 2003.

Granturi prin competiție:

- membru în colectiv:

Nr. crt.	Titlul grant	Sursa finanțării
1	Îmbunătățirea Managementului Universitar (IMU)	Fondul Social European (FSE) prin POSDRU
2	Impactul farmacogenomic al determinării polimorfismelor genelor VKORC1 și CYP2C9 asupra eficacității, siguranței și costurilor tratamentului anticoagulant oral (TROMBOGEN)	CNCSIS

**“Tuliu Hațieganu” University of Medicine
and Pharmacy – Cluj-Napoca
Faculty of Medicine**

PhD Thesis

**Aspects concerning the diagnosis
and prognosis of Wilson’s disease**

**Scientific supervisor
Prof. Dr. Caius Duncea**

**PhD Student
Valentin Militaru**

2011

Contents

Introduction	5
I. <u>GENERAL ASPECTS</u>	6
1. Historical data	6
2. Actual state of knowledge regarding the etiology, pathogenesis, diagnosis and prognosis of Wilson's disease	9
II. <u>PERSONAL RESEARCH</u>	31
3. Prognostic impact of family screening of Wilson's disease patients in the pre-symptomatic phase	31
3.1. Introduction	31
3.2. Hypothesis	34
3.3. Research objectives	34
3.4. Material and method	35
3.5. Results	38
3.6. Discussion	48
3.7. Conclusions	55
4. The delay of the diagnosis of Wilson's disease and the factors which influence it	57
4.1. Introduction	57
4.2. Hypothesis	58
4.3. Research objectives	59
4.4. Material and method	59
4.5. Results	63
4.6. Discussion	79
4.7. Conclusions	85
5. Particularities of the diagnostic (Leipzig) score and of the clinical phenotypes in relation with age and sex in Wilson's disease	86
5.1. Introduction	86
5.2. Hypothesis	87
5.3. Research objectives	87
5.4. Material and method	88
5.5. Results	92
5.6. Discussion	100
5.7. Conclusions	103
General conclusions	105
Original elements and limits of the research	107
References	109

Key-words: Wilson's disease, Kayser-Fleischer ring, delay of the diagnosis, screening of pre-symptomatic patients, diagnostic score (Leipzig), Wilson's disease clinical phenotypes

I. GENERAL ASPECTS:

1. Historical data: Even if a clinical picture suggesting Wilson's disease (WD) was first mentioned in 1850, the first complete description was made in 1912 by Samuel Alexander Kinnier Wilson. In 1902 and in 1903 respectively Kayser, followed by Fleischer described the brown ring, which they associated to a disease called "multisclerosis". During the 20th century knowledge on WD progressively developed, reaching its top in 1993 with the cloning of the ATP7B gene by three research groups.

2. Actual state of knowledge regarding the etiology, pathogenesis, diagnosis and prognosis of Wilson's disease: Epidemiology of WD: The frequency of the disease is estimated at 1/30000 births, the frequency of heterozygous carriage of the mutant gene being higher (estimated at 1/90 persons). As in other autosomal recessive diseases, there are areas with greater concentration of cases, explained by consanguinity.

Etiology, pathogenesis and pathology in WD. Copper is necessary for many cellular processes (mitochondrial respiration, antioxidant defense etc.), meanwhile being very toxic (it generates reactive oxygen species). In the hepatocytes it is bound to ATP7B protein, which turns it to caeruloplasmin or eliminates it in the bile canalicula. Several mutations of the ATP7B gene cause its dysfunction, leading to copper storage in the hepatocytes and to oxidative stress.

The first hepatic alterations are visible in the mitochondria. Afterwards macro- or microvesicular steatosis, glycogenic nuclei, copper deposits, fibrosis/cirrhosis and mononuclear infiltrates can be noted. In the brain the lesions consist of atrophy, pigmentation and cystic degeneration of the caudate nucleus and putamen.

Clinical manifestations in Wilson's disease.

- hepatic manifestations: vary from asymptomatic hepatomegaly to acute hepatic failure (often fatal); often cirrhosis (symptomatic or not);
- neurological manifestations: mostly extrapyramidal;
- psychiatric manifestations: depression, strange behavior, learning troubles;
- ocular manifestations: Kayser-Fleischer ring (visible at clinical examination or by slit-lamp examination), "sun-flower" cataracts;
- others: cutaneous, renal, osteo-articular, cardiomyopathy, pancreatitis.

Laboratory diagnosis in Wilson's disease relies on liver function (biochemical) tests, serum caeruloplasmin, serum copper (total and free), 24 hours urinary copper excretion and liver parenchymal copper concentration.

Genetic diagnosis in Wilson's disease is based on microsatellites analysis and on ATP7B gene mutations analysis. Over 320 mutations and 80 polymorphisms have been described so far, listed at: <http://www.wilsonsdisease.med.ualberta.ca/database.asp>.

Clinical phenotypes and diagnostic score. In 2001, at a meeting of experts in Wilson and Menkes diseases in Leipzig (Germany), the following WD clinical phenotypes were defined: hepatic (acute/chronic), neurological (not associated with liver disease/associated with liver disease/not investigated for liver disease) and others.

The diagnostic (Leipzig) score was defined at the same meeting as an instrument for the clinicians, useful mainly when clinical manifestations and/or laboratory findings are less obvious. It is built on several clinical, neuroimaging, biological, histological and genetic parameters. If it is greater than 4 the diagnosis of WD is highly likely, if it equals 2 or 3 WD the diagnosis is likely (other tests being required for confirmation) while values of 0 or 1 make WD diagnosis unlikely.

WD prognosis is favorable if pre-symptomatic patients are given appropriate treatment and if the diagnosis is set early. Untreated WD is always fatal. Evolution under treatment of symptomatic WD is favorable in most cases and varies from one patient to another. Fulminant hepatic failure has a great mortality rate.

II. PERSONAL RESEARCH:

3. Prognostic impact of family screening of Wilson's disease patients in the pre-symptomatic phase:

Hypothesis: Usefulness and efficiency of WD's screening and treatment in the pre-symptomatic phase are proven by several published clinical studies. These are mostly observational studies, non-interventional, made on small groups of patients, followed for longer or shorter periods of time and data are often incomplete.

Research objectives: a) To compare patients diagnosed through family screening (pre-symptomatic) with those whose diagnosis was revealed by clinical manifestations (symptomatic) at two moments:

- at diagnosis – clinical and laboratory parameters of the hepatic, neurological, psychiatric and renal involvement;
- in evolution – period of survival, WD aggravation, liver transplantation necessity, medication efficiency.

b) To compare the demographical, clinical, laboratory, therapeutic and evolution parameters between WD patients followed in two university hospitals in France: Besançon and Dijon.

Material and method: We analyzed retrospectively the medical records of 23 WD patients (8 M, 15 F) followed during a 53 years period (1954-2007) in the departments of hepatology of the University Hospitals of Besançon (15 patients – 6 M, 9 F) and Dijon (8 patients – 2 M, 6 F). In 16 patients the diagnosis was set due to clinical signs/symptoms (ND group = symptomatic), in the other 7 patients the diagnosis was reached through family screening (D group = screened). We recorded the following data: clinical (presence and severity of hepatic involvement, presence of neurological/psychiatric involvement, visibility of Kayser-Fleischer ring), laboratory (prothrombin index – IP, serum albumin, AST, ALT, serum bilirubin, ceruloplasminemia,

urinary copper excretion and creatininemia), therapeutic (period of D-Penicillamine use, liver transplantation necessity) and evolution (death, neurological/hepatic aggravation, Kayser-Fleischer ring disappearance).

The study was a longitudinal, observational, cohort one.

For the statistical analysis we used non-parametric Mann-Whitney test, **t** test, chi-square test (χ^2) and Log-Rank. The analysis was performed using SPSS 17 software. We considered $p < 0.05$ as the significance threshold (CI 95%).

Results: There were no differences between D and ND groups concerning median age ($p = 0.663$ - Mann-Whitney) or sex ($p = 0.374$ - χ^2). Using χ^2 test we found no difference between the two groups at diagnosis regarding the frequency of: hepatic involvement ($p = 0.43$), cirrhosis ($p = 0.311$), neurological involvement ($p = 0.292$), psychiatric manifestations ($p = 1.00$) and visibility of Kayser-Fleischer ring ($p = 0.53$).

Out of the laboratory parameters compared between the two groups at diagnosis we found significant differences for serum bilirubin (**$p = 0.035$** – Mann-Whitney) and serum creatinine (**$p = 0.022$** – Mann-Whitney). As the patients presenting with acute hepatic failure (AHF) had the highest creatininemia values, we performed a partial correlation for creatininemia with control for AHF presence, thus founding the loss of significance ($p = 0.248$). We regarded this fact as a correction of the bias induced by AHF (confounder variable).

We didn't find any differences between the frequency of D-Penicillamine use in pre-symptomatic screened patients vs. the symptomatic ones ($p = 1,00$). D-Penicillamine treatment duration was significantly longer in pre-symptomatic screened patients vs. symptomatic ones (**$p = 0.012$** – Mann-Whitney). No pre-symptomatic patient was transplanted vs. 9 of the symptomatic ones (**$p = 0.038$** – χ^2).

We performed a survival analysis using the Log-Rank test, censored by either death or liver transplantation. We found a significant difference in the survival without transplantation between the pre-symptomatic (screened) patients and the symptomatic ones (**$p = 0.004$**). We considered this result as a proof of the efficiency of early D-Penicillamine treatment of the pre-symptomatic patients in controlling WD.

No differences were found between the patients followed in Besançon vs. those followed in Dijon for the tested parameters (demographical, clinical, therapeutic and evolution), thus proving the homogeneity of the studied group.

4. The delay of the diagnosis of Wilson's disease and the factors which influence it:

Hypothesis: Despite the progress in the investigations for WD, there is still a delay in setting the diagnosis, its main causes being the lack of clinical awareness and the polymorphism of the disease's manifestations. The poverty of international medical literature and the complete absence in the Romanian literature of studies concerning WD diagnosis delay and the factors which enhance or reduce it determined us to study these

aspects. The differences among the data found in the literature represented another reason to approach these aspects.

Research objectives: We aimed to evaluate the magnitude of the delay of WD diagnosis and identify the factors which influence it.

Material and method: We analyzed retrospectively the medical records of 21 patients consulted or admitted between January 2003 and February 2010 in the Medical Clinic 5 (adults – aged 18 or more) and in the Pediatric Clinic 2 (pediatric patients – aged less than 18), in Cluj-Napoca (Romania). The following data were recorded: clinical (approximate date of the first symptoms, onset modality, presence and severity of hepatic involvement, presence of neurological and/or psychiatric manifestations, ophthalmologic examination result), laboratory (serum total bilirubin, serum albumin, prothrombin index - IP, ALT, AST, urinary copper excretion, total serum copper – cupremia and ceruloplasminemia) and genetic testing result (realized with the kind help of Prof. Peter Ferenci and his co-workers in Innere Medizin III – Vienna Medical University, Austria). Patients were assigned to one of the clinical phenotypes and their diagnostic (Leipzig) score was calculated.

The study was an observational, analytic, cohort one.

We assessed the relations between the delay of WD diagnosis and the above-mentioned demographic, clinical, laboratory and genetic parameters. We used Mann-Whitney and Kruskal Wallis tests and Pearson and Spearman correlations. The statistical tests were initially applied to the whole group and then only to the symptomatic patients, after exclusion of those whose diagnosis was set through active screening. We used SPSS 17 software, considering $p < 0.05$ as the statistical significance threshold (CI 95%).

Results: Average age was 19.47 ± 12.84 years and median age was 14 years, ranging between 8 and 55 years. Out of the 21 patients 4 were adults and 17 pediatric. Sex ratio was F/M = 10/11. Diagnosis delay ranged from 0 days (the diagnosis was set the same day the patient was consulted/admitted) to 3288 days (approximately 9 years), with an average of 812.14 ± 1122.76 days (2 years and almost 3 months) and a median of 120 days (approximately 4 months). These values were similar to those found in the literature.

The following factors significantly influenced the diagnosis delay: age as a numeric variable ($p=0.015$, $r=0.524$ – Spearman's correlation) and as dichotomic variable – pediatric/adult ($p=0.007$, $r=0.574$ – Spearman's correlation); onset modality – hepatic/neurological/screening ($p=0.002$ – Kruskal-Wallis test); presence of hepatic involvement ($p=0.004$, $r=-0.602$); presence of psychiatric manifestations ($p=0.028$, $r=0.480$); values of ALT ($p=0.006$, $r=-0.592$) and AST ($p=0.018$, $r=0.521$). The other clinical and laboratory parameters did not have a significant influence on the diagnostic delay. Kruskal-Wallis test excluded a statistically significant difference among the medians of the diagnostic scores of the patients belonging to the 4 clinical phenotypes ($p=0.330$).

By eliminating the 4 patients who did not have the genetic test done we found a significant difference ($p=0.016$ –Kruskal-Wallis test) among the medians of the delays of the diagnosis in the 4 sub-groups (homozygous, compound heterozygous, heterozygous and without any known mutation detected). In the 17 patients who had the genetic test done we found an inverse correlation, statistically significant, with a medium power, between the numeric value of the diagnostic (Leipzig) score and the diagnosis delay ($p=0.02$, $r=-0.557$).

In order to correct a potential bias induced by the presence of three pre-symptomatic patients, detected through family screening, virtually without any delay of the diagnosis, we excluded these patients and performed again the statistical tests on the 18 symptomatic patients. We obtained results similar to those above-mentioned, with two exceptions: the difference between the median diagnosis delay of the patients displaying neurological manifestations and those not having them reached the threshold of statistical significance ($p=0.05$) and we did not find a correlation between the presence of psychiatric manifestations and the diagnosis delay ($p=0.062$).

5. Particularities of the diagnostic (Leipzig) score and of the clinical phenotypes in relation with age and sex in Wilson's disease:

Hypothesis: The authors of the diagnostic (Leipzig) score recommended in their article the prospective evaluation of the score, which was done by very few studies so far. We did not find in the medical literature any publication to assess the influence on the diagnostic (Leipzig) score of demographic variables (age, sex) and of clinical ones (presence and severity of the hepatic involvement, onset modality). Another impulse for this research was the absence of studies to assess the clinical phenotypes regarding their diagnostic value, their distribution and their dependence on demographic or clinical factors.

Research objectives: We aimed to study the following aspects:

- a) clinical phenotypes: their relative frequencies in the studied group, their relation with age and sex.
- b) the relation of hepatic involvement and neurological manifestations with age.
- c) the effect on the diagnostic (Leipzig) score of certain factors:
 - demographic: sex, age at diagnosis,
 - clinical: presence of hepatic involvement, severity of hepatic involvement (chronic hepatitis/cirrhosis), onset modality (hepatic, neurologic or screening).

Material and method: We studied retrospectively the medical records of 24 WD patients consulted or admitted in the Medical Clinic 5 and in the Pediatric Clinic 2 in Cluj-Napoca during the period January 2003-October 2010. The following data were recorded: demographic (sex and age), clinical (presence/absence of hepatic affectation, neurological manifestations, Kayser-Fleischer rings, onset modality – hepatic/neurologic or screening), laboratory (ceruloplasminemia, 24 hours urinary excretion of copper,

hepatic parenchymal copper concentration and genetic testing – performed with the help of Prof. Peter Ferenci and his co-workers in Innere Medizin III – Vienna Medical University, Austria). Patients were classified according to the clinical phenotype and their diagnostic score was calculated. We analyzed the relation between the clinical phenotype and age (as a numeric variable – years – and dichotomic – pediatric/adult) and sex. We looked for an association between age at diagnosis and the presence of hepatic involvement and of neurological manifestations. We searched for potential correlations between the numeric value of the diagnostic score and: age at diagnosis, sex, onset modality, presence and severity of hepatic involvement.

The study was an observational, analytic, cohort one.

We performed chi-square (χ^2), Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests and Spearman's non-parametric correlation. Statistical analysis was done using SPSS 17 software. We considered $p < 0.05$ as the threshold for statistical significance (CI 95%).

Results: The group we studied was made of 7 adults and 17 pediatric patients, with an average age of 20.33 ± 13.58 years and a median age of 14.5 years. Sex ratio was F/M = 10/14. No patients were assigned to Nx or O phenotypes.

We did not find any significant differences between the patients in the 4 clinical phenotypes represented in our group of study concerning age or sex. Age as a numeric variable directly correlated with the presence of neurological manifestations (**$p=0.05$, $r=0.41$** – Spearman's correlation) and inversely with the presence of hepatic involvement (**$p=0.02$, $r=-0.46$** – Spearman's correlation). Age as dichotomic variable (pediatric/adult – separated by the threshold of 18 years) did not correlate with any of the two above mentioned variables. Using ROC analysis we set the age of 36.5 years as a threshold to delineate the younger patients, displaying a significantly more frequent hepatic involvement, from the older ones, having a less frequent hepatic involvement. The age of 20.5 years was similarly set as a threshold for the neurological manifestations by ROC analysis.

We did not find any correlations between the numeric value of the diagnostic score and sex, age, presence and severity of hepatic involvement and onset modality. The statistical tests were performed twice: taking into at first account the hepatic parenchymal concentration of copper (available for only one patient) and then ignoring it; we did not find significant differences between the results.

Using Kruskal-Wallis test we proved a significant difference between the medians of the diagnostic scores of the patients belonging to the 4 phenotypes represented in our group (**$p=0.028$**). Using Mann-Whitney test we compared the medians of the diagnostic scores in every pair of the represented clinical phenotypes, thus finding a significant difference only between the patients belonging to H2 phenotype (having low scores) and N1 (having high scores).

General conclusions:

1. The frequency of hepatic involvement and of cirrhosis do not differ significantly, at the moment of the diagnosis of WD, between patients in whom the diagnosis is set early (by family screening) and symptomatic patients.

2. The frequency of neurological suffering, psychiatric manifestations and Kayser-Fleischer ring do not differ significantly, at the time of the diagnosis, between the patients diagnosed in the pre-symptomatic phase of WD and the symptomatic ones.

3. Serum bilirubin is significantly higher at diagnosis in symptomatic patients than in pre-symptomatic WD patients but the other biochemical functional liver tests do not differ significantly between the two groups.

4. The median of serum creatinine of pre-symptomatic WD patients (diagnosed by screening) is significantly lower than that of symptomatic patients, the difference being the consequence of the higher frequency of acute hepatic failure in symptomatic patients.

5. D-Penicillamine treatment can control WD for a significantly longer period in pre-symptomatic patients diagnosed by screening vs. patients diagnosed in the symptomatic phase of WD.

6. Pre-symptomatic WD patients diagnosed by screening have a significantly longer survival without liver transplantation than the symptomatic patients.

7. The prognosis of symptomatic WD patients treated by D-Penicillamine does not differ significantly from that of pre-symptomatic patients diagnosed by screening and receiving the same treatment in regard with the frequency of neurological aggravation, hepatic functional deterioration and death.

8. WD diagnosis delay shows a great variability in time ranging from 0 days to 9 years.

9. The main determinant of the delay of WD diagnosis is patients' age, both as numeric variable (years) and as dichotomic variable (pediatric/adult – delineated by the age of 18 years).

10. The onset of WD by hepatic manifestations is associated to a significantly shorter delay of the diagnosis, compared to the onset by neurological manifestations.

11. The delay of WD diagnosis is significantly shorter in patients displaying hepatic involvement than in those not having liver involvement but the severity of liver disease does not influence the delay of the diagnosis.

12. The diagnosis of WD is set in a significantly shorter period of time in patients having elevated serum aminotransferases, compared to patients having normal serum aminotransferases.

13. Decrease of ceruloplasminemia and increase of serum copper and of 24 hours-urinary excretion of copper does not influence significantly the delay of WD diagnosis.

14. The medians of the delays of WD diagnosis significantly differ among homozygous, compound heterozygous, heterozygous and patients without any known mutation detected on the ATP7B gene.

15. Belonging to a certain clinical phenotype of WD does not influence significantly the delay of the diagnosis.

16. An inverse correlation, statistically significant, with a medium power is noted between the numeric value of the diagnostic (Leipzig) score and the delay of the diagnosis, higher the Leipzig score, shorter the delay of the diagnosis.

17. Belonging to a clinical phenotype of WD is not influenced by age or sex of the patients.

18. The frequency of hepatic involvement in WD is inversely correlated, in a statistically significant way, with the age of the patients (younger the patients, higher the frequency of liver involvement).

19. The frequency of neurological manifestations in WD is inversely correlated, in a statistically significant way, with the age of the patients (older the patients, higher the frequency of neurological manifestations).

20. There is no significant association between the numeric value of the diagnostic (Leipzig) score and age, sex, onset modality, presence and severity of hepatic involvement in WD.

21. There is a statistically significant difference among the medians of the Leipzig scores of patients belonging to H1,H2, N1 and N2 phenotypes, as a consequence of a significant difference between the high values of the score in N1 patients and low values of the score in H2 patients.

Limits of the research:

1. The studies we made are retrospective.
2. We partially collected the cases from other medical units, this potentially being the cause of unevenness of medical approaches.
3. The group of patients was relatively small.

Original elements of the research:

1. Survival without liver transplantation – newly-defined parameter.
2. Direct correlation between patients' age and WD diagnosis delay.
3. Inverse correlation between serum aminotransferases and WD diagnosis delay.
4. Influence of the genetic testing results on the diagnosis delay in WD.
5. Inverse correlation between the diagnostic (Leipzig) score and the delay of the diagnosis.
6. Independence of WD clinical phenotypes from patients' sex and age.
7. Statistically significant difference between the diagnostic (Leipzig) scores of patients belonging to different WD clinical phenotypes.
8. Correlations between age at diagnosis and the frequency of neurological manifestations (direct correlation) and of hepatic involvement (inverse correlation).
9. Setting by a ROC analysis of the threshold ages for the hepatic and neurological involvement.

CURRICULUM VITAE

A. Personal information:

- 1. Last name:** MILITARU
- 2. First name:** VALENTIN
- 3. Date and place of birth:** December 23rd 1974, Cluj-Napoca (Romania)
- 4. Nationality:** Romanian
- 5. Marital status:** married, 2 children
- 6. Education**

Institution	High school	Faculty	Master	Residency	2 nd Residency
Period	1989-1993	1993-1999	2000-2001	2001-2007	2009-present day
Grades or diplomas	Bacalaureat (Bachelor)	Licence Diploma	Master in Medical Informatics and Biostatistics Diploma	Specialist in Internal Medicine (MD)	Gastroenterology

7. Professional Experience

Period	jan 2000-jan 2001	feb 2001 – feb 2007	oct 2001-present day	mai 2005-oct 2006	oct 2007-present day	feb 2009-present day
Place	Cluj-Napoca	Cluj-Napoca	Cluj-Napoca	Besançon (France)	Cluj-Napoca	Cluj-Napoca
Institution	Municipal Hospital	Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy	Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy	Centre Hospitalier Universitaire - service de gastroenterologie	Municipal Hospital	Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy
Function	intern	resident in internal medicine	Assistant Professor	faisant fonction d'interne (resident)	specialist in internal medicine (MD)	resident in gastroenterology

8. Actual employment and function: Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy – Assistant Professor

9. Experience at actual employment: 10 years

10. Member of professional associations:

- European Association for the Study of the Liver (EASL)

11. Spoken foreign languages: English, French, Italian

12. Other skills/formations: general ultrasonography

13. Specializations and trainings:

- 03.10-19.12.1999 – Tel Aviv (Israel) – Clinical Elective Rotation in Emergency Medicine

- 01.02-30.04. 2004 – Angers (France) – Training in digestive endoscopy (Romanian Government Scholarship)
- 01.05.2005-30.10.2006 – Besançon (France) – Attestation de Formation Spécialisée (AFS) in gastroenterology and hepatology

14. Scientific reviewing activity: since 2011 – scientific reviewer for HVM Bioflux (ranked CNCSIS B+)

B. Scientific activity:

Book chapter: 1

- **Militaru V.** *Semiologia aparatului digestiv (Digestive Apparatus Semiology)*. In Lucaciu D. (ed.) *Semiologie medicală (Medical Semiology)*. Alma Mater Ed., Cluj-Napoca, 2003: 87-114.

Papers published in extenso in journals indexed in international data bases: 6

- Rădulescu L, Duncea CR, Rădulescu D, **Militaru V**, Pârv A. *Cardiotoxicity of antineoplastic agents: onset, risk factors and clinical manifestation*. HVM Bioflux 3(2), pp. 150-157, 8 pg., 2011.
- **Militaru V**, Miu N, Pop TL, Burac L, Ștefănescu A, Crișan S, Vesa Ș, Rădulescu L, Duncea CR. *Diagnostic particularities in Wilson's disease as related to age, sex and clinical presentation*. HVM Bioflux 3(2), pp. 119-124, 6 pg., 2011.
- **Militaru V**, Miu N, Pop TL, Burac L, Ștefănescu A, Crișan S, Duncea CR, Vesa Ș. *The delay of the diagnosis in Wilson's disease*. Clujul Medical 84(2), pp. 274-277, 4 pg., 2011.
- **Militaru V**, Pop T, Burac L, Miu N, Ștefănescu A, Militaru FC, Bocșan CI, Buzoianu A, Duncea C. *D-Penicillamine and Zinc therapy for Wilson's disease*. Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology 15(1), pp. 35-39, 5 pg., 2011.
- Crișan S, **Militaru V**, Crișan IM. *Abdominal aortic aneurysm – online methods of patient education*. Med Ultrason 12(1), pp. 22-25, 4 pg., 2010.
- Crișan S, Niță T, Vișovan D, Vesa Ș, Buzdugan E, Donca V, **Militaru V**, Busuioceanu E, Pîrloagă IA, Pestrea C, Crișan IM. *Online methods of patient education concerning arterial duplex ultrasonography of the legs*. Med Ultrason 11(2), pp. 11-14, 4 pg., 2009.

Papers published in extenso in national journals: 11

- Crișan S, Chirilă D, Constantea N, Pop T, **Militaru V**, Pițura M. *Varice bilaterale ale crosei venei safene mari – prezentare de caz (Bilateral varices of the great saphena vein – case report)*. Revista Româna de Ultrasonografie 7(3-4), pp.155-158, 4 pg., 2005.
- Crișan S, Crișan D, Duncea C, Donca V, Jivănescu-Bunea D, Buzdugan E, Ciovișescu F, **Militaru V**, Pop T, Rad M. *Explorarea Doppler cu emisie pulsatorie a venelor femurală și poplitee (Pulsed-Doppler investigation of the femoral and popliteal veins)*. Revista Română de Ultrasonografie 7(1-2), pp. 67-76, 10 pg., 2005.
- Lucaciu D, Ghidrai O, Duncea C, Donca V, Mihut S, Condor A, **Militaru V**, Macarie A. *Modificari electrocardiografice evidențiate prin înregistrare continua Holter la bolnavi vârstnici aflați în program de hemodializă cronică (Electrocardiographic changes investigated by Holter continuous recording in chronically dialyzed elderly)*. Romanian Journal of Gerontology and Geriatrics 25(2), pp. 27-33, 7 pg., 2003.
- Lucaciu D, Mihut S, Condor A, Donca V, Buzdugan E, **Militaru V**, Radulescu D. *Hemodializa la vârstnici – observații privind particularități clinico-evolutive și*

prognostice (Hemodialysis in elderly – observations concerning the clinical and evolution particularities). Clujul Medical 76(4), pp. 857-861, 5 pg., 2003.

- Lucaciu D, Donca V, Condor A, Mihut S, **Militaru V**, Ciovesescu F. *Tulburări de ritm cardiac la bolnavii cu insuficiență renală cronică aflați în program de hemodializă iterativă. Studiu Holter. (Heart rhythm disturbances in chronically dialyzed chronic renal failure patients. Holter study.)* Clujul Medical 76(3), pp. 608-612, 5 pg., 2003.

- Crișan S, Duncea C, **Militaru V**, Constantea N, Donca V, Buzdugan E, Crișan D, Herghea D, Pop T, Vlaicu R. *Characteristics of peripheral arterial obstructive disease in rural environment patients*. Romanian Journal of Angiology and Vascular Surgery. 5(3-4), pp. 78-81, 4 pg., 2003.

- Crișan S, Constantea N, Pop T, Duncea C, Donca V, Buzdugan E, **Militaru V**. *Formațiune tumorală localizată în fosa poplitee: chist Baker (Răspuns quiz RRU 2003; 5(2)) (Tumor in the popliteal region: Baker cyst (Answer to quiz RRU 2003; 5(2)))*. Revista Română de Ultrasonografie. 5(3-4), pp. 243-244, 2 pg., 2003.

- Crișan S, Constantea N, Pop T, Duncea C, Donca V, Buzdugan E, **Militaru V**. *Formațiune tumorală localizată în fosa poplitee (quiz nr 2-2003) (Tumor in the popliteal region (quiz no 2-2003))*. Revista Română de Ultrasonografie. 5(2), pp. 149-150, 2 pg., 2003.

- Crișan S, Duncea C, Constantea N, Donca V, Buzdugan E, **Militaru V**, Iștoc A, Crișan D. *Examinarea venei femurale cu ajutorul ultrasonografiei bidimensionale (Examination of the femoral vein by bi-dimensional ultrasonography)*. Revista Română de Ultrasonografie. 5(2), pp. 123-129, 7 pg., 2003.

- Crișan S, Duncea C, Buzdugan E, Constantea N, Donca V, **Militaru V**, Andercou A, Gherman I, Nicorici C, Herghea D. *Relația grupelor sanguine din sistemul ABO cu ateroscleroza obliterantă a membrelor inferioare (Relation of ABO system blood groups with obliterant atherosclerosis of the lower limbs)*. Clujul Medical 76(2), pp. 338-344, 7 pg., 2003.

- Crișan S, Duncea C, Iștoc A, Donca V, **Militaru V**, Buzdugan E, Alda G. *Explorarea ultrasonografică Doppler continuu a sistemului carotidian extracranian (Continuous Doppler ultrasonography investigation of extracranial carotid system)*. Revista Română de Ultrasonografie 5(1), pp. 25-32, 8 pg., 2003.

Research projects obtained by competition:

- member in the collective:

Nr. crt.	Title of the project	Financing source
1	Îmbunătățirea Managementului Universitar (Improvement of University Management) (IMU)	European Social Fund (FSE) through POSDRU (Operational Sectorial Program – Development of Human Resources)
2	Impactul farmacogenomic al determinării polimorfismelor genelor VKORC1 și CYP2C9 asupra eficacității, siguranței și costurilor tratamentului anticoagulant oral (Pharmacogenomic impact of the assessment of VKORC1 and CYP2C9 genes polymorphisms on the efficacy, safety and costs of oral anticoagulant treatment) (TROMBOGEN)	CNCSIS (National Council for Scientific Research in the Superior Learning)