

modification " *Clinica Chimica Acta, Volume 173, Issue 2, Pages 99-106*

8. Levi, S, William C. Purdy (1980) "The AAS determination of copper and zinc levels in the serum of hemodialysis patients " *Clinical Biochemistry, Volume 13, Issue 6, Pages 253-258*
9. Ugursay Kiziltepe, Zeynep Bastuzel

Eyiletlen, Mustafa Sirlak, Refik Tasoş, Atilla Aral, Neyyir Tuncay Eren, Adnan Uysalel, Hakki Akalin (2003) "Antiarrhythmic effect of magnesium sulfate after open heart surgery: effect of blood levels " *International Journal of Cardiology 89, p 153-158.*

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ĐỒNG TRONG MÁU VÀ NƯỚC TIỂU ĐỂ CHẨN ĐOÁN VÀ ĐIỀU TRỊ BỆNH WILSON

Vũ Đức Lợi, Nguyễn Gia Bình*

TÓM TẮT

Bệnh Wilson là bệnh rối loạn chuyển hóa đồng do có sự biến đổi của gen lặn. Trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá các thông số chẩn đoán lâm sàng và cận lâm sàng của 28 bệnh nhân mắc bệnh Wilson. Đánh giá lâm sàng qua kiểm tra mắt và thần kinh, làm các xét nghiệm cận lâm sàng và các xét nghiệm về chuyển hóa đồng bao gồm hàm lượng đồng trong mẫu huyết thanh gan, đồng trong huyết thanh và nhất là lượng đồng được bài tiết qua nước tiểu. Kết quả cho thấy hàm lượng đồng của bệnh nhân Wilson trong huyết thanh thấp hơn so với nhóm đối chứng. Mặt khác hàm lượng đồng được bài tiết qua nước tiểu và lượng đồng trong mẫu sinh thiết gan ở bệnh nhân Wilson cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng.

SUMMARY

Wilson disease is an autosomal recessive disorder of copper metabolism. In this study, we evaluated the diagnostic parameter, clinic and paraclinic of 28 patients with Wilson disease. Evaluation included neurological and ophthalmic examination, laboratory test and parameter of copper metabolism, including liver copper

content in liver biopsy specimens, serum copper as well as urinary copper excretion. The results showed that the serum copper content in patients was lower than that in the control subjects. On the other hand, the urinary copper excretion and liver copper contents were significantly higher in patients with Wilson disease compared to the controls subjects.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các nguyên tố kim loại có vai trò rất lớn đến các hoạt động sống của con người, ngoài các nguyên tố đa lượng như natri, kali, canxi, magiê chiếm tới 99% các ion kim loại trong cơ thể còn có các nguyên tố vi lượng như sắt, đồng, kẽm, selen... tuy tồn tại với hàm lượng rất nhỏ nhưng các nguyên tố này lại là xúc tác cho hàng loạt phản ứng enzym như phản ứng oxi hóa khử sinh học, phản ứng thủy phân...

Đồng là một nguyên tố quan trọng, nó tạo phức với nhiều protein. Trung bình mỗi người mỗi ngày cần khoảng 2 – 5 gam đồng, ít nhất là 0,9 gam/ngày. Đồng được hấp thụ qua đường ruột là chính, cụ thể là ở tá tràng và thành ruột non. Đồng được di chuyển nhờ kết hợp với albumin và aminoaxit tiết ra từ gan. Khi vào gan,

* Bệnh viện TW Quân đội 108

đồng kết hợp với một loại protein tạo Ceruloplasmin và di chuyển đến các cơ quan khác của cơ thể, lượng đồng dư thừa được thải qua mật.

Nếu vì một lý do nào đó mà tại gan không sản xuất được ra Ceruloplasmin thì đồng tồn tại ở dạng tự do và bị tích tụ ở gan. Khi lượng đồng trong gan quá lớn thì đồng sẽ di chuyển vào máu dưới dạng tự do và đi đến các bộ phận như: não, mắt, cơ, các mô,... gây nên các triệu chứng như rối loạn thần kinh, co quắp chân tay, khó vận động, xuất hiện vòng màu xanh quanh mắt.... Đó là triệu chứng của một loại bệnh mà thế giới gọi là bệnh Wilson.

Trên thế giới có trên 300 nghìn người mắc bệnh Wilson, tỉ lệ mắc bệnh Wilson trên dân số là 1/30.000 đến 1/50.000 người. Theo tỉ lệ này, ước lượng hiện nước ta có khoảng 1.600 người mắc bệnh Wilson nhưng cho đến nay mới chỉ chẩn đoán được hơn 100 trường hợp, số còn lại 1.500 người vẫn chưa được phát hiện, bệnh có tỷ lệ tử vong là rất cao nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời. Tuổi khởi bệnh trung bình ở nhiều nước từ 12 đến 16 tuổi; Ở Trung Quốc tuổi bệnh nhân nam là 20,9 tuổi, Ở Hoa Kỳ là 23,2 tuổi cho cả hai giới, còn đối với Nhật Bản bệnh từ 6 tuổi 9 tháng đến 13 tuổi 11 tháng. Ở Việt Nam thấy khởi bệnh từ 9 đến 13 tuổi, trong đó có 1 bệnh nhân phát hiện ở tuổi 37.

Tại Việt Nam mới chỉ phát hiện được trên 100 bệnh nhân mắc bệnh Wilson trong đó 12 người đã tử vong, xảy ra chủ yếu đối với các bệnh nhân chẩn đoán muộn và không có thuốc điều trị đặc hiệu.

Để có thể phát hiện và điều trị sớm bệnh Wilson thì việc xác định hàm lượng đồng trong các mẫu sinh học bao gồm máu và nước tiểu là rất cần thiết, trên thế giới đây là chỉ số cận lâm sàng quan trọng nhất để chẩn đoán bệnh Wilson. Tuy nhiên cho đến nay tại Việt Nam chưa có một công trình nào công bố chính xác về vấn đề này, vì vậy đề tài của chúng tôi xác định mục tiêu luận xác định hàm

lượng đồng trong mẫu máu và nước tiểu để phục vụ chẩn đoán và điều trị bệnh Wilson.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thiết bị và hóa chất

- Hệ thống máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS-3300 của hãng Perkin-Elmer
- Cân phân tích Satorius chính xác đến 0,01 mg.
- Các hóa chất được sử dụng có độ tinh khiết cao, được kiểm tra nồng độ các nguyên tố bằng phép đo AAS trước khi sử dụng.

2. Đối tượng nghiên cứu.

Mẫu huyết thanh của các bệnh nhân và nhóm đối chứng có độ tuổi từ 42 đến 79 được lấy tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 và Bệnh viện Bạch Mai và Bệnh viện Nhi TW trong đó nhóm bệnh gồm 28 người, độ tuổi trung bình là 14,2, trong đó có hai đối tượng trên 18 tuổi, số lượng bệnh nhân nữ là 15, bệnh nhân nam là 13.

Mẫu sinh thiết gan sinh thiết gan được lấy trên 1 bệnh nhân nữ 17 tuổi tại vị trí thùy phải, mẫu được sấy khô sau đó tiến hành vô cơ hóa và xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.

3. Xử lý mẫu

Mẫu huyết thanh được bảo quản trong tủ lạnh, khi tiến hành phân tích được rửa đông tự nhiên, lắc nhẹ ống nghiệm để đồng nhất mẫu, sau đó mẫu được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với nước cất và dung dịch chuẩn được pha trong nền glycerin 5%.

Mẫu sinh thiết gan: Cân chính xác 0,1 gam mẫu cho vào bình vô cơ hóa, thêm 8 ml hỗn hợp axit $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ (tỷ lệ 1:1) đun ở 150°C trong vòng 30 phút, sau đó định mức đến 25 ml bằng nước cất.

Kỹ thuật phân tích: Sử dụng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử với kỹ thuật ngọn lửa trên máy AAS 3300 của hãng Perkin-Elmer tại Viện Hóa - Viện Khoa học và Công nghệ Việt nam.

Xử lý số liệu: Số liệu nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê trong y học. Độ chính

xác của phương pháp được đánh giá qua việc phân tích mẫu chuẩn NIST-SRM 1589.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Do Wilson là một bệnh mới xuất hiện và số người phát hiện ở Việt Nam chưa nhiều nên việc lấy mẫu là rất khó khăn. Khi bệnh nhân được nghi ngờ mắc bệnh Wilson, để chẩn đoán bệnh, ngoài các chỉ số cận lâm sàng như chỉ số về thần kinh, chức năng gan, vòng Keyer-Fleischer ở mắt, thì hàm lượng đồng trong nước tiểu, huyết thanh và mẫu sinh thiết gan cũng là các chỉ số quan trọng để chẩn đoán và điều trị bệnh. Khi hàm lượng đồng trong nước tiểu lớn hơn so với người bình thường và vượt giá trị 0,2 mg/24 giờ

thì bệnh nhân đó được xác định chính xác bệnh là mắc bệnh Wilson, đây cũng là chỉ số mà hiệp hội Wilson thế giới sử dụng để chẩn đoán bệnh.

Hàm lượng đồng trong nước tiểu phụ thuộc vào chế độ ăn uống và quá trình đào thải của cơ thể, nên ngoài việc xác định hàm lượng đồng trong nước tiểu, cần phải biết được lượng đồng đào thải trong 24 giờ. Mẫu nước tiểu được lấy trong vòng 24 giờ và tiến hành xác định toàn bộ thể tích, hàm lượng đồng 24 giờ được tính toán dựa vào hàm lượng đồng đo được nhân với thể tích của nước tiểu. Kết quả phân tích hàm lượng đồng trong huyết thanh, nước tiểu được đưa ra ở các bảng sau.

Bảng 1: Hàm lượng đồng trong huyết thanh nhóm bệnh và nhóm chứng dưới 18 tuổi

Độ tuổi	Đối tượng	Giới tính	Số mẫu	Hàm lượng đồng
Dưới 18 tuổi	Nhóm bệnh	Nam	11	0,21 ± 0,16
		Nữ	12	0,20 ± 0,14
	Nhóm đối chứng	Nam	42	0,98 ± 0,19
		Nữ	37	0,99 ± 0,12

Bảng 2: Hàm lượng đồng trong huyết thanh nhóm bệnh và nhóm chứng trên 18 tuổi

Độ tuổi	Đối tượng	Giới tính	Số mẫu	Hàm lượng đồng
Trên 18 tuổi	Nhóm bệnh	Nam	2	0,34 ± 0,13
		Nữ	2	0,32 ± 0,11
	Nhóm đối chứng	Nam	222	0,99 ± 0,22
		Nữ	60	1,10 ± 0,34

Bảng 3: Hàm lượng đồng trong nước tiểu

TT	Đối tượng	Giới tính	Số mẫu	Hàm lượng Cu	
				(mg/l)	(mg/24h)
1	Nhóm bệnh	Nam	13	0,42 ± 0,16	0,58 ± 0,21
		Nữ	15	0,37 ± 0,21	0,51 ± 0,19
2	Nhóm đối chứng	Nam	247	< 0,04	< 0,026
		Nữ	132	< 0,04	< 0,026

Kết quả phân tích hàm lượng đồng trên các mẫu sinh học của nhóm bệnh ở các bảng từ 1 đến 3, cho thấy hàm lượng đồng trong nước tiểu của

nhóm bệnh Wilson đều lớn hơn so với nhóm đối chứng, giá trị trung bình của nam là 0,58 mg/24h và của nữ là 0,51 mg/24h.

Hàm lượng đồng trong huyết thanh của tất cả các bệnh nhân trên 18 tuổi và dưới 18 tuổi đều nhỏ hơn so với nhóm đối chứng, sự khác nhau giữa nam và nữ ở nhóm bệnh không có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Hàm lượng đồng huyết thanh của nhóm bệnh nhỏ hơn nhóm đối chứng là do lượng đồng đi vào gan không kết hợp được với α -2 Globulin tạo Ceruloplasmin nên lượng đồng bị tích tụ ở gan và không được vận chuyển vào máu để đi đến nơi cần thiết và cũng không được thải ra theo đường bài tiết chính là mật mà thải ra theo đường nước tiểu. Vì vậy hàm lượng đồng trong nước tiểu tăng và lượng đồng máu trong máu giảm, đây chính là chỉ số rất quan trọng để chẩn đoán và điều trị bệnh Wilson.

Trong các chỉ số sinh học để chẩn đoán bệnh Wilson, sinh thiết gan là một chỉ số vàng để chẩn

đoán chính xác nguyên nhân gây bệnh, tuy nhiên việc lấy mẫu sinh thiết gan tại Việt Nam còn rất khó khăn và phức tạp, chủ yếu là do tâm lý của người bệnh. Trong khi đó, trên thế giới, mẫu sinh thiết gan là một trong những chỉ số bắt buộc cần phải phân tích và đánh giá trước khi điều trị bệnh, do mẫu sinh thiết gan thể hiện được tốc độ và hệ số tích lũy của đồng theo thời gian từ đó sẽ đưa ra được phác đồ điều trị chính xác nhất. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ sử dụng được một mẫu sinh thiết gan của bệnh nhân ghép gan 12 tuổi, chỉ số phân tích về máu và nước tiểu cũng như các xét nghiệm cận lâm sàng khác cho thấy bệnh nhân không có biểu hiện mắc bệnh Wilson. Mẫu sinh thiết gan được sấy khô sau đó tiến hành vô cơ hóa theo quy trình đã mô tả ở trên. Kết quả phân tích được đưa ra ở bảng 4

Bảng 4: Hàm lượng đồng trong mẫu sinh thiết gan nhóm bệnh

TT	Đối tượng	Hàm lượng đồng
1	Nhóm đối chứng	92,1 $\mu\text{g/g}$
2	Nhóm bệnh	2382,4 $\mu\text{g/g}$

Hàm lượng đồng trong mẫu sinh thiết gan của bệnh nhân Wilson là 2382,4 $\mu\text{g/g}$ lớn hơn rất nhiều so với mẫu đối chứng là 92,1 $\mu\text{g/g}$, nguyên nhân chính là do đồng bị tích lũy ở gan dưới dạng tự do. Nghiên cứu về sự tích lũy của đồng ở gan cũng đã được nhiều tác giả đề cập. Các kết quả nghiên cứu về sự phân bố nguyên tố đồng trong gan đối với bệnh nhân Wilson của Gavino Faa cho thấy, giá trị trung bình của đồng trong gan là 1370 $\mu\text{g/g}$. Hàm lượng đồng phân bố không đều tại 38 vị trí khác nhau trong gan và dao động từ 880 đến 2100 $\mu\text{g/g}$. Sự phân bố khác nhau của đồng trên các thùy gan đã được quan sát, thùy gan phải tích lũy đồng nhiều hơn so với thùy gan trái và đồng lưu giữ chủ yếu trong tế bào gan ở vùng I (xung quanh khoảng cửa gan).

Sự tích lũy quá nhiều đồng ở gan chính là nguyên nhân gây nên bệnh Wilson.

Do vậy bằng việc phân tích hàm lượng đồng trong nước tiểu hoặc sinh thiết gan, chúng ta có thể chẩn đoán chính xác được bệnh nhân đã mắc bệnh Wilson.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã tiến hành phân tích hàm lượng đồng trong các mẫu huyết thanh và nước tiểu của người bình thường. Kết quả cho thấy hàm lượng đồng huyết thanh có giá trị trung bình đối với nam là 1.07 ± 0.34 mg/l, đối với nữ là 1.17 ± 0.39 mg/l. Khảo sát trên một mẫu sinh thiết gan thấy hàm lượng đồng trong mẫu sinh thiết gan là 92.1 $\mu\text{g/g}$.

2. Kết quả nghiên cứu trên các bệnh nhân Wilson cho thấy hàm lượng đồng trong nước tiểu

của nhóm bệnh là 0,4 mg/l lớn hơn so với nhóm đối chứng. Lượng đồng trong nước tiểu 24h là 0.545 mg vượt quá giá trị chẩn đoán bệnh của hiệp hội Wilson thế giới là 0.2 mg/ 24h. Hàm lượng đồng trong mẫu sinh thiết gan của bệnh nhân Wilson là 2382.4 µg/g lớn hơn rất nhiều so với mẫu đối chứng là 92.1 µg/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lương Thủy Quỳnh (1996). *Nghiên cứu xác định hàm lượng đồng và kẽm trong huyết thanh người có tuổi ở Việt Nam*. Luận án Phó tiến sĩ khoa học y dược. Trường Đại học Dược Hà Nội.
2. Lê Lan Anh, Vu Duc Loi, Phạm Gia Mon and Nguyen Le Phu, Nguyen Gia Binh, Dang Minh Ngoc, Phan Tuy, Philip Hartemann (2001). *Determination of Lead and Mercury in clinical samples during work and accidental exposure in Vietnam*. Analytical Sciences; 17: 38a.
3. Asonuma K, Inomata Y, Kasahara M, Uemoto S, Egawa H, Fujita S, et al (1999). *Living related liver transplantation from heterozygote genetic carriers to children with Wilson's disease*. *Pediatr Transplant* ;3:201-205.
4. Brewer GJ, Johnson V, Kaplan J (1997). *Treatment of Wilson's disease with zinc: XIV. Studies of the effect of zinc on lymphocyte function*. *J LabClin Med* ;129:649-652.
5. Felix WS, Wong and Mano Arumanayagam (1998). *The clinical Usefulness of Plasma Copper and Zinc Concentration in Patients with Invasive Carcinoma of the Cervix*. *Journal of the Hong Kong Medical Association*. Vol. 40. No.3. 194-198
6. Gavino Faa, Valeria Nurhib, Luigi Demeliac, Rossano Ambud, Giuseppina Parodoa, Terenzino Congiua, Raf Sciold....(1994), *Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease*, V22, 13: 303-308.
7. George j Brewer (1998), *Wilson disease and canine copper toxicosis*^{1,2}, *The American journal of Clinical Nutrition*; 67: 1087s-1090s.
8. Holtzman NA, Gaumnitz BM (1970). *Studies on the rate of release and turnover of ceruloplasmin and apoceruloplasmin in rat plasma*. *J Biol Chem* ;245:2354-2358.
9. Johnson PE et al: *Effect of Age and Sex on Copper Absorption, Biological Half-Life and Status in Humans*, *Am-J-ClinNutr*.1992, Nov., 56, 917-925.
10. Kern L, Nuttall¹, Jan Palaty² and Gilian lockitch² (2003), *Reference Limit for copper and iron in Liver Biopsies*, *Annals of clinical and Laboratory science* 33: 443-450.
11. K.F. Kok¹, B. Hoevenaars², E. Waanders¹, J.P.H. Drenth¹ (2008), *Value of molecular analysis of Wilson's disease in the absence of tissue copper deposits: a novel ATP7B mutation in an adult patient*, *The netherland journal of Medicine*; 8:66.
12. Perrett D (1981). *The metabolism and pharmacology of D-penicillamine in man*. *J Rheumatol Suppl* ; 7:41-50.