



Instytut Psychiatrii i Neurologii

Lek. Magdalena Antczak-Kowalska

Znaczenie autoprzeciwciał w obrazie klinicznym i monitorowaniu choroby Wilsona

**Rozprawa na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Anna Członkowska

Pracę wykonano w II Klinice Neurologicznej
Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

Warszawa 2023

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi

Pani Profesor Annie Członkowskiej

za umożliwienie realizacji pracy,

ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego,

a także za cenne uwagi udzielone

w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy

Pracownikom Pracowni Neuroimmunologii IPiN

za okazaną pomoc i życzliwość

Spis treści

Spis treści	4
Wykaz skrótów.....	6
Spis tabel i rycin.....	11
1. Wstęp.....	13
1.1. Choroba Wilsona.....	13
1.1.1. Epidemiologia	14
1.1.2. Patomechanizm	14
1.1.3. Obraz kliniczny	17
1.1.4. Diagnostyka.....	21
1.1.5. Leczenie.....	27
1.2. Zjawisko autoimmunizacji	30
1.2.1. Zarys budowy i funkcji układu immunologicznego	30
1.2.2. Budowa i rola przeciwciał	31
1.2.3. Mechanizm powstawania autoimmunizacji	32
1.2.4. Znaczenie autoprzeciwciał, choroby z autoimmunizacji.....	34
1.2.5. Autoimmunizacja polekowa.....	39
1.2.6. Znaczenie zjawisk autoimmunologicznych w neurologii	40
1.2.7. Przeciwciała przeciwneuronalne	42
1.2.8. Autoimmunologiczne zapalenia mózgu	47
1.2.9. Zespoły paraneoplastyczne.....	51
1.2.10. Autoprzeciwciała w chorobach neurodegeneracyjnych	52
1.3. Zaburzenia immunologiczne w chorobie Wilsona	52
2. Założenia i cele pracy	55
3. Materiał i metody	57
3.1. Grupa badana.....	57
3.2. Pobieranie próbek i oznaczanie przeciwciał.....	58
3.3. Analiza statystyczna	59
4. Wyniki	60
4.1. Charakterystyka grupy badanej	60
4.2. Częstość występowania autoprzeciwciał w badanej grupie pacjentów	64
4.3. Zależność między obecnością autoprzeciwciał a postacią kliniczną i przebiegiem chW ..	66
4.4. Wpływ stosowanego leczenia na występowanie autoprzeciwciał.....	74
4.5. Zależność między rodzajem mutacji w genie <i>ATP7b</i> a częstością występowania autoprzeciwciał.....	75
5. Dyskusja	77
6. Ograniczenia badania	87
7. Wnioski.....	89

8. Piśmiennictwo.....	90
9. Streszczenie.....	111
10. Summary.....	113

Wykaz skrótów

Ach – acetylocholina

AIH – autoimmunologiczne zapalenie wątroby, ang. autoimmune hepatitis

ALS – stwardnienie zanikowe boczne, ang. amyotrophic lateral sclerosis

ALT – transaminaza alaninowa, ang. alanine aminotransferase

AMA – przeciwciała przeciwmitochondrialne, ang. antimitochondrial antibodies

AMA-M2 – przeciwciała przeciwmitochondrialne typu M2

AMPA – receptor kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego, ang. alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor

ANA – przeciwciała przeciwjądrowe, ang. antinuclear antibodies

ANCA – przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów, ang. antineutrophil cytoplasmic antibody

AQP4 – akwaporyna 4, ang. aquaporin-4

AST – transaminaza asparaginianowa, ang. aspartate aminotransferase

BAL – dimerkaprol, ang. British anti-Lewisite

BBB – bariera krew-mózg, ang. blood-brain barrier

cANCA – przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów, typ cytoplazmatyczny, ang. cytoplasmic ANCA

CASPR2 – białko związane z kontaktyną, typu 2, ang. contactin-associated protein-like 2

CENP-B – centromerowe białko B, ang. centromere protein B

chW – choroba Wilsona

Con A – konkanawalina A, ang. concanavalin A

Cp – ceruloplazmina

CuEXC – miedź wymienialna, ang. exchangeable copper

DAMPs – struktury molekularne związane z uszkodzeniem, ang. damage-associated molecular patterns

DIL – toczeń polekowy, ang. drug-induced lupus

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy, ang. deoxyribonucleic acid

D-p – D-penicylamina

DPPX – białko podobne do peptydazy dipeptydylowej, typu 6, ang. dipeptidyl-peptidase-like protein-6

dsDNA – dwuniciowy DNA, ang. double-stranded DNA

EEG – elektroencefalografia

Fab – fragment wiążący antygen, ang. fragment antigen-binding

FBDS – napady dystoniczne twarzowo-ramienne, ang. faciobrachial dystonic seizures

FGF-1 – czynnik wzrostu fibroblastów 1, ang. fibroblast growth factor 1

GABAR – receptor kwasu γ -aminomasłowego, ang. γ -aminobutyric acid receptor

GAD65 – dekarboksylaza kwasu glutaminowego 65, ang. glutamic acid decarboxylase-65

GFAP – kwaśne białko włókienkowe gleju, ang. glial fibrillary acidic protein

GGTP – transpeptydaza gamma-glutamylowa, ang. γ -glutamyl transpeptidase

GlyR – receptor glicyny, ang. glycine receptor

HBV – wirus zapalenia wątroby typu B, ang. hepatitis B virus

HCV – wirus zapalenia wątroby typu C, ang. hepatitis C virus

HEp-2 – linia komórkowa ludzkiego nowotworu nabłonkowego krtani, typu 2, ang. human laryngeal epidermoid carcinoma cells type 2

IFN- γ – interferon γ

Ig – immunoglobulina

IgLON5 – cząsteczka adhezji komórkowej podobna do immunoglobuliny, typu 5, ang. immunoglobulin-like cell adhesion molecule 5

IIF – immunofluorescencja pośrednia, ang. indirect immunofluorescence

IL-1 α – interleukina 1 α , ang. interleukin 1 α

IL-1 β – interleukina 1 β , ang. interleukin 1 β

IL-6 – interleukina 6, ang. interleukin 6

INR – międzynarodowy współczynnik znormalizowany, ang. International Normalized Ratio

IPiN – Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

IQR – rozstęp międzykwartyłowy, ang. interquartile range

IVIG – dożylna immunoglobulina, ang. intravenous immunoglobulin

K-F – pierścień Kaysera-Fleischera

LEMS – zespół miasteniczny Lamberta-Eatona, ang. Lambert-Eaton myasthenic syndrome

LGI1 – białko bogate w leucynę nieaktywne w glejakach, typu 1, ang. leucine-rich glioma-inactivated 1

MCTD – mieszana choroba tkanki łącznej, ang. mixed connective tissue disease

mGluR1 – metabotropowy receptor glutaminianu-1, ang. metabotropic glutamate receptor 1

mGluR5 – metabotropowy receptor glutaminianu-5, ang. metabotropic glutamate receptor 5

MHC – główny układ zgodności tkankowej, ang. major histocompatibility complex

MIF – czynnik hamujący migrację makrofagów

MOG – glikoproteina mieliny oligodendrocytów, ang. myelin oligodendrocyte glycoprotein

MPO – mieloperoksydaza, ang. myeloperoxidase

MRI – obrazowanie rezonansu magnetycznego, ang. magnetic resonance imaging

NAFLD – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby, ang. non-alcoholic fatty liver disease

NCC – tzw. „wolna miedź”, niezwiązana z ceruloplazminą, ang. non-ceruloplasmin bound copper

NGS – sekwencjonowanie nowej generacji, ang. next-generation sequencing

NMDAR – receptor N-metylo-D-asparaginowy, ang. N-methyl-D-aspartate receptor

NMO – zapalenie nerwów wzrokowych i rdzenia kręgowego, ang. neuromyelitis optica

NSAbs – przeciwciała przeciw neuronalnym antygenom powierzchniowym, ang. neuronal surface antibodies

ONA – przeciwciała onkoneuronalne, ang. onconeural antibodies

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PAMPs – struktury molekularne związane z patogenem, ang. pathogen-associated molecular patterns

p-ANCA – przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów, typ okołojądrowy, ang. perinuclear ANCA

PBC – pierwotne zapalenie dróg żółciowych, ang. primary biliary cholangitis

PCNA – antygen jądrowy proliferujących komórek, ang. proliferating cell nuclear antigen

PERM – postępujące zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego ze sztywnością i miokloniami, ang. progressive encephalomyelitis with rigidity and myoclonus

PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy

PPD – tuberkulina oczyszczona, oczyszczona pochodna białkowa, ang. purified protein derivative

PR3 – proteinaza-3, ang. proteinase 3

PSC – pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, ang. primary sclerosing cholangitis

REC – relatywnie wymienialna miedź, ang. relative exchangeable copper

RNP – rybonukleoproteina, ang. ribonucleoprotein

SCLE – podostra skórna postać toczenia rumieniowatego, ang. subacute cutaneous lupus erythematosus

SD – odchylenie standardowe, ang. standard deviation

SLE – toczeń rumieniowaty układowy, ang. systemic lupus erythematosus

Sm – Smith

SMA – przeciwciała przeciw mięśniom gładkim, ang. smooth muscle antibodies

SS-A – antygen A związany z zespołem Sjögrena, ang. Sjögren syndrome antigen A

SS-B – antygen B związany z zespołem Sjögrena, ang. Sjögren syndrome antigen B

TAC – całkowita pojemność antyoksydacyjna, ang. total antioxidant capacity

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β , ang. transforming growth factor β

TNF- α – czynnik martwicy nowotworów α , ang. tumor necrosis factor- α

UWDRS – ujednolicona skala oceny choroby Wilsona, ang. Unified Wilson's Disease Rating Scale

WES – sekwencjonowanie całego eksomu, ang. whole-exome sequencing

WGS – sekwencjonowanie całego genomu, ang. whole-genome sequencing

VGCC – zależne od potencjału kanały wapniowe, ang. voltage-gated calcium channels

ZS – siarczan cynku

Spis tabel i rycin

Spis tabel

Tabela I. System oceny punktowej w diagnostyce chW (tzw. Leipzig score) opracowany w czasie International Meeting on Wilson Disease and Menkes Diseases.....	26
Tabela II. Charakterystyka najistotniejszych klinicznie przeciwciał przeciwjądrowych	37
Tabela III. Charakterystyka najistotniejszych klinicznie przeciwciał onkoneuronalnych	43
Tabela IV. Charakterystyka najczęściej wykrywanych przeciwciał przeciw antygenom powierzchniowym.....	45
Tabela V. Charakterystyka grupy badanej.....	61
Tabela VI. Podstawowe parametry biochemiczne.....	62
Tabela VII. Parametry laboratoryjne przy rozpoznaniu oraz w trakcie leczenia u pacjentów z chW (n=36), mediana czasu leczenia 2,00 lata (IQR=0,08).....	63
Tabela VIII. Mutacje w genie <i>ATP7b</i> w badanej grupie pacjentów z chW.....	64
Tabela IX. Częstość autoprzeciwciał u pacjentów z chW i u osób zdrowych.....	65
Tabela X. Szczegółowa dystrybucja zidentyfikowanych autoprzeciwciał.....	65
Tabela XI. Występowanie autoprzeciwciał w zależności od postaci klinicznej chW	67
Tabela XII. Obecność autoprzeciwciał w momencie rozpoznania chW i po leczeniu (mediana czasu leczenia=2 lata)	74
Tabela XIII. Częstość występowania autoprzeciwciał w zależności od stosowanego leczenia	75
Tabela XIV. Zależność między rodzajem mutacji w genie <i>ATP7b</i> a częstością występowania autoprzeciwciał	76
Tabela XV. Częstość autoprzeciwciał u pacjentów z mutacją H1069Q.....	76

Spis rycin

Rycina 1. Schemat organizacji układu immunologicznego	31
Rycina 2. Punktacja w skali UWDRS II u pacjentów z chW w zależności od obecności ANA	68
Rycina 3. Punktacja w skali UWDRS II u pacjentów z chW w zależności od obecności ANCA.....	68
Rycina 4. Punktacja w skali UWDRS II u pacjentów z chW w zależności od obecności NSAbs	69
Rycina 5. Punktacja w skali UWDRS II u pacjentów z chW w zależności od obecności ONA	69
Rycina 6. Punktacja w skali UWDRS III u pacjentów z chW w zależności od obecności ANA	70
Rycina 7. Punktacja w skali UWDRS III u pacjentów z chW w zależności od obecności ANCA.....	70
Rycina 8. Punktacja w skali UWDRS III u pacjentów z chW w zależności od obecności NSAbs	71
Rycina 9. Punktacja w skali UWDRS III u pacjentów z chW w zależności od obecności ONA	71
Rycina 10. Punktacja w skali UWDRS II + III u pacjentów z chW w zależności od obecności ANA	72
Rycina 11. Punktacja w skali UWDRS II + III u pacjentów z chW w zależności od obecności ANCA.....	72
Rycina 12. Punktacja w skali UWDRS II + III u pacjentów z chW w zależności od obecności NSAbs	73
Rycina 13. Punktacja w skali UWDRS II + III u pacjentów z chW w zależności od obecności ONA	73

1. Wstęp

1.1. Choroba Wilsona

Choroba Wilsona (chW, ang. Wilson's disease) jest uwarunkowanym genetycznie zaburzeniem metabolizmu miedzi, prowadzącym do nadmiernego gromadzenia tego metalu w tkankach oraz uszkodzenia wielu narządów. Najistotniejsze znaczenie ma uszkodzenie wątroby i mózgu, co wiąże się z wystąpieniem objawów klinicznych – wątrobowych i/lub neuropsychiatrycznych. ChW może być skutecznie leczona farmakologicznie, kluczowe dla pomyślnego rokowania jest jej wczesne rozpoznanie, gdy zmiany narządowe są jeszcze odwracalne oraz prawidłowe, kontynuowane przez całe życie leczenie.

ChW została po raz pierwszy opisana w 1912 roku przez Kinnier Wilsona jako „postępujące zwyrodnienie soczewkowe”, występująca u ludzi młodych, rodzinna choroba neurologiczna, której towarzyszy przewlekła choroba wątroby z marskością. Choroba charakteryzowała się sztywnością, ruchami mimowolnymi, zaburzeniami mowy i połykania, zaburzeniami psychicznymi, doprowadzając w ciągu kilku lat do śmierci (1). Pierwsze wzmianki związane z tą chorobą pojawiały się w literaturze już wcześniej, w 1883 roku Westphal, a w 1898 roku Strumpell, opisali przypadki postępującej choroby neurologicznej z dominującym drżeniem, nazywając ją stwardnieniem rzekomym (2). Odpowiednio, w 1902 i 1903 roku, Kayser i Fleischer opisali barwnikowy pierścień w rogówce, charakterystyczny dla chW (2). Znaczenie miedzi w etiologii chW wskazał w 1948 roku Cumings, który wprowadził do leczenia pierwszy lek chelatujący jony miedzi, 2,3-dimerkaptopropranol (BAL, ang. British anti-Lewisite) (3) (4). Ceruloplazmina (Cp), główne białko transportujące miedź w surowicy, zostało wyizolowane w latach 1947-1948 (Holmberg i Laurell) (5), a w 1952 roku opisano niedobór Cp u pacjentów z chW (Scheinberg i Gitlin; Bearn i Kunkel) (6) (7). W 1974 roku stwierdzono zmniejszone wydalanie miedzi z żółcią u pacjentów z chW (Frommer) (8). Dziedziczenie autosomalne recesywne zostało zasugerowane w 1921 roku przez Hall'a (9), gen związany z występowaniem choroby został zlokalizowany na chromosomie 13 w 1985 roku przez Frydmana (10), natomiast w 1993 roku poznano produkt tego genu – ATP-azę typu P (11). W kolejnych latach następował także rozwój farmakoterapii chW, po podawanym wyłącznie parenteralnie BAL (4), wprowadzono bezpieczniejsze leki doustne – D-

penicylaminę (D-p) (Walshe, 1956), sole cynku (Schouwink, 1961) oraz trientynę (1969) (2).

1.1.1. Epidemiologia

Częstość występowania chW oszacowali po raz pierwszy w 1968 roku Sternlieb i Scheinberg na 1:200000 (12). W 1984 roku Scheinberg i Sternlieb skorygowali swoje szacunki dotyczące częstości występowania choroby do 1:30000, przy częstości nosicielstwa mutacji wynoszącej 1 na 90, uznali także istnienie izolowanych populacji, w których częstość występowania jest wyższa (13). Chociaż analiza była oparta na ograniczonych danych, to wynikający z nich szacunek 1:30000 zdrowo urodzonych dzieci jest nadal powszechnie uznawany za aktualny.

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat opublikowano wyniki badań epidemiologicznych nad częstością chW w różnych populacjach, którą oceniano na 1:39800 w Austrii (14), 1:37000 we Francji (15), 1:29000 na Tajwanie (16) i 1:40000 w Hong Kongu (17). W odizolowanych społecznościach, gdzie częściej dochodzi do związków między krewnymi, odnotowano wyższą częstość, na przykład na Wyspach Kanaryjskich 1:2600 lub Sardynii 1:7000 (18).

Niedoszacowanie częstości występowania chW może być związane z dużym zróżnicowaniem pierwszych objawów klinicznych oraz stosunkowo niską czułością testów diagnostycznych metabolizmu miedzi, co prowadzi do błędnego diagnozowania i niedodiagnozowania chorych. Wraz z rosnącą wiedzą na temat chW i dostępnością badań metabolizmu miedzi i testów genetycznych, liczba pacjentów, u których rozpoznano chW, wydaje się rosnać (18).

1.1.2. Patomechanizm

Objawy kliniczne chW wynikają z nieprawidłowego odkładania się miedzi w tkankach i narządach, prowadzącego do ich uszkodzenia, oraz toksycznego działania znajdującej się w surowicy wolnej miedzi, niezwiązanej z Cp (NCC, ang. non-ceruloplasmin bound copper) (2). Zaburzenia metabolizmu miedzi są rezultatem, dziedzicznej autosomalnie recesywnie, mutacji w genie *ATP7B*, obejmującym ponad 80 kb genomowego DNA na ramieniu długim chromosomu 13 (13q4.2-q21), kodującym transportującą miedź ATPazę typu P. U pacjentów z chW występują homozygotyczne lub złożone heterozygotyczne mutacje w genie *ATP7B* (18), znanych jest ponad 800

patogennych wariantów (19), większość mutacji to mutacje typu zmiany sensu, braku sensu lub zmiany ramki odczytu, inne rodzaje mutacji są prawdopodobnie rzadkie. Najczęstszą mutacją wśród pacjentów z Europy Wschodniej i Północnej jest mutacja typu zmiany sensu w eksonie 14, H1069Q, która jest również najczęstsza w populacji polskiej. W badaniu genetycznym obejmującym 248 polskich pacjentów mutację H1069Q stwierdzono u 215 osób, 112 osób (45%) posiadało mutację H1069Q na obu allelach, a 103 osoby (42%) miały mutację H1069Q na jednym allelu, w tym u 85 pacjentów ta mutacja była związana z innym heterozygotycznym wariantem allelicznym, natomiast u 18 pacjentów była jedyną znaną mutacją. Pacjenci z mutacjami innymi niż H1069Q byli w większości heterozygotami złożonymi. U 3 osób nie zidentyfikowano potencjalnie patogennego wariantu genu *ATP7B* (20). W Europie Południowej powszechne są inne mutacje, takie jak mutacja zmiany sensu M645R w kontynentalnej Hiszpanii. W populacjach pozaeuropejskich, inne warianty są znacznie bardziej rozpowszechnione, np. R778L w Azji Południowo-Wschodniej (18).

Gen *ATP7B* ma 21 eksonów, koduje 1465 aminokwasów, największa ekspresja białka, produktu tego genu, występuje w wątrobie, nerkach, łożysku, a w mniejszym stopniu także w mózgu (2). ATPaza typu P składa się z sześciu domen wiążących jony metali i ośmiu domen transmembranowych, które tworzą por dla zależnego od ATP transportu miedzi przez błony komórkowe. W hepatocytach rolą tego białka jest dostarczanie miedzi do sieci trans-Golgi w celu przyłączenia do Cp, białka transportującego miedź w krwiobiegu, a także udział w wydzieleniu nadmiaru miedzi z żółcią poprzez transport miedzi do pęcherzyków endosomalnych i lizosomalnych w celu usuwania przez błonę apikalną (21).

Miedź jest kofaktorem niezbędnym w procesach wytwarzania energii w mitochondriach, ale w nadmiarze wywiera szkodliwy wpływ na te organelle. Dysfunkcja mitochondriów wynika prawdopodobnie zarówno z bezpośredniego toksycznego oddziaływania miedzi, jak i wpływu pośredniego, przez generowanie reaktywnych form tlenu i azotu (21). W obecności anionorodnika ponadtlenkowego lub innych czynników redukujących, Cu^{2+} może zostać zredukowana do Cu^+ , która jest zdolna do katalizowania tworzenia rodników hydroksylowych z nadtlenku wodoru w reakcji Fentona (22). U pacjentów z chW zaobserwowano zmniejszenie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) surowicy, ponadto pacjenci z neurologiczną postacią choroby mieli istotnie niższy TAC niż pacjenci z postacią wątrobową, a niższe TAC wiązało się z nasileniem objawów neurologicznych (23). Leczenie obniżające poziom miedzi, powoduje poprawę

parametrów metabolizmu miedzi oraz właściwości antyoksydacyjnych, ale ich w pełni nie normalizuje, co wskazuje na zwiększone ryzyko rozwoju zaburzeń związanych ze stresem oksydacyjnym. Znotowano także zmniejszoną aktywność peroksydazy glutationowej, ważnego enzymu antyoksydacyjnego, u pacjentów leczonych D-p (24). Peroksydaza glutationowa bierze udział w redukowaniu nadtlenu wodoru i nadtlenków fosfolipidów, jej obniżona aktywność może powodować peroksydację lipidów błon komórkowych, stanowiącą istotny czynnik uszkodzeń komórkowych (25).

Gromadzenie miedzi w wątrobie prowadzi do stresu oksydacyjnego, uszkodzenia błon komórkowych, lipidów oraz komórkowego DNA, a w rezultacie do martwicy hepatocytów, przewlekłego zapalenia i zwłóknienia wątroby (18). W konsekwencji dochodzi do uwalniania miedzi z przeciążonej wątroby do krążenia systemowego w postaci wolnej, niezwiązanej z Cp oraz jej odkładania w dalszych narządach, na przykład w mózgu, rogówkach, nerkach, sercu, kościach, co prowadzi do szerokiego spektrum objawów klinicznych (neuropsychiatrycznych, okulistycznych, kardiologicznych, nefrologicznych, hematologicznych).

Czas wystąpienia objawów choroby i jej postać kliniczna, różnią się znacząco u poszczególnych pacjentów, co wskazuje na udział czynników modyfikujących. Brak silnej korelacji między genotypem a fenotypem odzwierciedla wpływ czynników środowiskowych i epigenetycznych (26) (27). Postulowany jest wpływ genetycznych czynników modyfikujących, jak np. geny apolipoproteiny E czy reduktazy metylenotetrahydrofolianu, choć ich udział pozostaje niepewny (26). Stwierdzono też istotne, związane z płcią, różnice w poziomach miedzi, nasileniu zmian metabolicznych oraz postaci klinicznej u pacjentów z chW (28) (29). Postać neuropsychiatryczna chW jest dominująca u mężczyzn, natomiast postać wątrobowa występuje częściej u kobiet. W przypadku postaci neuropsychiatrycznej chW, objawy pojawiają się blisko 2 lata wcześniej u mężczyzn w porównaniu z kobietami (28). Obserwowane różnice są tłumaczone ochronnym działaniem estrogenów oraz innymi czynnikami, np. różnicami w metabolizmie żelaza (28). Estrogeny wykazują ochronny efekt poprzez wpływ na syntezę i bioaktywność czynników zapalnych, takich jak TNF α , IL-1 i IL-6 (30).

Uważa się, że wszyscy pacjenci z chW mają w pewnym stopniu uszkodzoną komórkę wątrobową, choroba wątroby mieści się w zakresie od bezobjawowego zwiększenia aktywności enzymów wątrobowych do ostrego zapalenia wątroby, marskości wątroby i piorunującej niewydolności wątroby (31). Przybyłkowski i wsp. stwierdzili, że każdy nowo zdiagnozowany pacjent z objawami neurologicznymi chW

miał przynajmniej jedną cechę uszkodzenia wątroby w badaniu ultrasonograficznym, ale tylko u 47,8% pacjentów były spełnione kryteria ultrasonograficzne, endoskopowe i biochemiczne, pozwalające rozpoznać marskość wątroby (32).

Zawartość miedzi w tkankach mózgu oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z chW jest 10-krotnie zwiększona w stosunku do obserwowanej u osób zdrowych (33). Nadmiar miedzi jest toksyczny dla tkanek mózgowych, powoduje uszkodzenia komórek, głównie poprzez zaburzenie funkcji mitochondriów i stres oksydacyjny oraz lokalną reakcję zapalną (34). W ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) nadmiar miedzi jest początkowo wychwytywany, gromadzony i buforowany przez astrocyty i oligodendrocyty. Astrocyty mogą zwiększać syntezę metalotionein i glutationu, które są peptydami o zdolności do detoksykacji miedzi (35), ale ostatecznie te mechanizmy zostają wyczerpane, w rezultacie dochodzi do dysfunkcji bariery krew-mózg (BBB, ang. blood-brain barrier) i nasilenia reakcji zapalnej (36). W badaniu histopatologicznym mózgu obserwuje się rozplamienie gleju astrocytarnego oraz postaci gleju patologicznego – komórki typu Alzheimera I, II i komórki Opalskiego. Komórki Alzheimera I to relatywnie duże komórki posiadające charakterystyczne jądro, z jednym lub dwoma jąderkami, natomiast komórki Alzheimera II to przerosłe jądra astrogleju. Komórki Opalskiego, znacznie większe od astrocytów, mają obfitą protoplazmę oraz jedno lub kilka małych jąder, ułożonych bocznie lub centralnie. Oligodendrocyty są komórkami szczególnie wrażliwymi na toksyczność miedzi, obrzęk osłonek mielinowych i demielinizacja stanowią najwcześniejsze skutki gromadzenia miedzi w mózgu (37). W badaniu histopatologicznym mózgu obserwuje się także ubytki neuronów, rozlane rozluźnienie podłoża oraz pola zgęszczenia, zwłaszcza w obrębie jąder podstawy czy w mózdzku (38).

1.1.3. Obraz kliniczny

Objawy kliniczne chW mają wysoce zmienny, zróżnicowany charakter, rozwijają się najczęściej między 5 a 35 rokiem życia, jednak stwierdzano także przypadki wczesnego pojawienia się objawów w wieku 2 lat (39) lub ich pojawienia się dopiero w ósmej dekadzie życia (40). W przypadkach o wczesnym początku dominują objawy wątrobowe o zróżnicowanym nasileniu, bardzo rzadko z towarzyszącymi objawami neurologicznymi (31). Objawy wątrobowe stanowią pierwszy objaw chW u 40–50% pacjentów, pojawiają się średnio około 11,4 roku życia i zwykle wyprzedzają wystąpienie objawów neurologicznych o około 10 lat (41). Objawy neurologiczne są pierwszymi

objawami klinicznymi chW u 18–68% pacjentów, zaczynają się najczęściej między 20. a 30. rokiem życia, ale najmłodszy pacjent z objawami neurologicznymi miał 6 lat, a najstarszy — 72 lata (18). Objawy neuropsychiatryczne są często pierwszymi klinicznymi objawami choroby u osób diagnozowanych w wieku dorosłym, uszkodzenie wątroby może rozwijać się klinicznie bezobjawowo (20).

Postacie kliniczne uszkodzenia wątroby w chW (42) (41)

1. Bezobjawowe klinicznie uszkodzenie wątroby jedynie z nieprawidłowymi wynikami prób wątrobowych (podwyższone wartości aminotransferaz), często wykryte przypadkowo, np. podczas oddawania krwi lub w czasie badań okresowych;
2. Ostre zapalenie wątroby — objawy przypominające ostre wirusowe zapalenie wątroby, występuje żółtaczka, bóle brzucha; częste samoistne ustępowanie objawów klinicznych lub konwersja w ostrą niewydolność wątroby;
3. Ostra niewydolność wątroby – przebiega gwałtownie, w ciągu kilku tygodni dochodzi do ciężkiej niewydolności wątroby, żółtaczki, encefalopatii, anemii hemolitycznej, skazy krwotocznej, niewydolności wielonarządowej i zgonu; występuje częściej u osób młodych (< 30 r.ż.) oraz u kobiet (K:M – 4:1); ta postać stanowi wskazanie do przeszczepienia wątroby w przebiegu chW;
4. Przewlekłe zapalenie wątroby z marskością (skompensowaną lub zdekompensowaną) – najczęstsza postać wątrobowa chW, marskość wątroby występuje u 95% pacjentów z objawami neurologicznymi. U części chorych nie są widoczne objawy kliniczne marskości, u części występują męczliwość, obrzęki kończyn dolnych, wodobrzusze, świąd skóry, pajęczki naczyniowe, skaza krwotoczna i inne.

Objawy neurologiczne chW (18) (42)

1. Drżenie, występuje u około 55% pacjentów z neurologiczną postacią chW, ma charakter drżenia spoczynkowego, zamiarowego lub pozycyjnego, często o charakterze „uderzania skrzydłami” (ang. wing-beating), początkowo może mieć charakter jedno lub obustronny i głównie zlokalizowanego w kończynach górnych, z czasem staje się najczęściej obustronnym i może obejmować kończyny dolne, głowę i całe ciało;

2. Dystonia, stanowi pierwszy objaw u 11–65% pacjentów z neurologiczną postacią chW, może mieć charakter ogniskowy, segmentalny, wielogniskowy lub uogólniony. W przebiegu chW często obserwuje się tzw. risus sardonicus, zaburzenia mimiki twarzy spowodowane dystonicznym skurczem mięśnia śmiechowego; typowa jest także dystonia języka, gardła, krtani powodująca dyzartrię, zaburzenia połykania oraz ślinotok;
3. Parkinsonizm jako pierwsze neurologiczne objawy chW występuje u 19–62% pacjentów, zwykle jako symetryczne bradykinezja, sztywność, hipomimia, zaburzenia postawy i chodu, ślinotok i mikrografia;
4. Płasawica występuje u 6–16% pacjentów z objawami neurologicznymi;
5. Ataksja mózdkowa występuje jako pierwszy objaw u około 30% pacjentów z postacią neurologiczną; obserwuje się ataksję chodu, makrografię, dysdiadochokinezę oraz drżenie zamiarowe;
6. Dyzartria występuje u 97% pacjentów z neurologicznymi objawami choroby, wyróżnia się postaci: ataktyczną (mózdkową), dystoniczną (hiperkinetyczną), parkinsonowską (hipokinetyczną) i mieszaną;
7. Dysfagia występuje u około 50% pacjentów z postacią neurologiczną, może obejmować każdą fazę połykania;
8. Ślinotok występuje u 68% chorych z postacią neurologiczną i u 32–46% wszystkich pacjentów z chW.

Najczęściej używana klasyfikacja objawów neurologicznych w chW obejmuje podział na postaci dystoniczną, drżawkową, sztywnościowo-drżawkową, oraz sztywnościową (43).

Objawy psychiatryczne chW

Zaburzenia psychiatryczne są pierwszymi objawami chW u około 10-25% pacjentów, natomiast w jej przebiegu pojawiają się u niemal wszystkich chorych (44). Zdarza się, że mało specyficzne, łagodne zaburzenia poznawcze i emocjonalne mogą o wiele lat poprzedzić wystąpienie klinicznie jawnych objawów neurologicznych (45). Objawy psychopatologiczne mogą też występować jako objawy względnie izolowane, ich rozwój jest związany z uszkodzeniem struktur mózgowych, ale również, choć w mniejszym stopniu, z niewydolnością wątroby (45).

Najczęściej obserwowane są zaburzenia zachowania (irytacja, agresja, zachowania antyspołeczne), zaburzenia afektywne (depresja, mania), zaburzenia poznawcze (najczęściej łagodne), rzadziej objawy psychotyczne (46). W badaniu Seniów i wsp. wykazano łagodne zaburzenia wszystkich funkcji poznawczych, w tym funkcji wykonawczych, pamięci i przetwarzania wzrokowo-przestrzennego, u pacjentów z neurologiczną postacią chW, natomiast pacjenci bezobjawowi neurologicznie nie wykazywali żadnych deficytów w porównaniu z grupą kontrolną (47). Depresja rozwija się u 20–60% pacjentów z chW, stanowi szczególnie istotny problem, ponieważ wiąże się z wysokim ryzykiem prób samobójczych (18). Cięższe zaburzenia psychiczne są obserwowane częściej u pacjentów z objawami neurologicznymi, rzadziej rozwijają się u chorych z postacią wątrobową, zwłaszcza jeśli uszkodzenie wątroby nie jest zaawansowane (48).

Objawy psychopatologiczne mogą rozwijać się na różnych etapach choroby, według Svetel i wsp., nawet przy właściwym leczeniu, częstość występowania objawów psychiatrycznych u pacjentów z chW może sięgać 70% (44). Objawy psychiatryczne mogą utrzymywać się pomimo stosowania farmakoterapii, szczególnie dotyczy to depresji, która często wymaga dodatkowego leczenia psychiatrycznego. Natomiast zaburzenia poznawcze i zaburzenia zachowania mają tendencję do ustępowania przy systematycznej, dobrze prowadzonej terapii przeciwmiedziowej (49).

Objawy okulistyczne chW

Objawy okulistyczne są częste w chW. Typowym dla choroby jest pierścień Kaysera-Fleischera (K-F), pierścień utworzony przez złogi miedzi w błonie Descemeta rogówki. Może być widoczny gołym okiem, ale jego obecność zazwyczaj potwierdzana jest badaniem w lampie szczelinowej lub badaniem optycznej koherentnej tomografii (OCT, ang. optical-coherence tomography). Pierścień K-F występuje u blisko 100% pacjentów z postacią neurologiczną, 40-50% pacjentów z postacią wątrobową i 20-30% osób z postacią asymptomatyczną. Po leczeniu usuwającym miedź, pierścień K-F zwykle zanika (50). Rzadszym objawem jest zaćma słonecznikowa, która stwierdzana jest u około 17% pacjentów, głównie z nasilonymi objawami uszkodzenia wątroby. Dochodzi do odkładania się miedzi pod przednią torebką soczewki w postaci centralnie położonego dysku z promieniście odchodzącymi włóknami (przypomina słonecznik) (51).

Inne objawy

ChW może również prowadzić do objawów uszkodzenia innych narządów i układów, w tym osteoporozy (52), anemii hemolitycznej, trombocytopenii, leukopenii (50), kardiomiopatii i zaburzeń rytmu serca (53), zaburzeń miesiączkowania i obniżonej płodności (54), aminoacydurii, hiperkalciurii i nefrokalcynozy (55), a także hiperpigmentacji przednich powierzchni kończyn dolnych (56).

1.1.4. Diagnostyka

Diagnostyka chW opiera się na stwierdzeniu charakterystycznych objawów klinicznych (omówionych powyżej), nieprawidłowości w metabolizmie miedzi (obniżony poziom Cp i miedzi całkowitej w surowicy, zwiększony poziom tzw. wolnej miedzi (NCC) w surowicy i podwyższone wydalanie miedzi w dobowej zbiorce moczu) oraz badaniach genetycznych (42). Pomimo pozornie prostego schematu postępowania, diagnostyka chW jest często wyzwaniem, trudności diagnostyczne są związane z szerokim zakresem możliwych objawów klinicznych, możliwymi fałszywie dodatnimi lub fałszywie ujemnymi wynikami badań metabolizmu miedzi w innych jednostkach chorobowych oraz trudnościami w interpretacji badań metabolizmu miedzi oraz badań genetycznych (18). Opóźnienia diagnostyczne stanowią powszechny problem, prowadzą do opóźnienia właściwej terapii i zmniejszenia szansy na poprawę kliniczną. Pacjenci z postacią neurologiczną dłużej oczekują na postawienie właściwej diagnozy, np. w badaniu przeprowadzonym w Niemczech okres od wystąpienia pierwszych objawów do rozpoznania w postaci wątrobowej wynosił 14 miesięcy, a neurologicznej 44 miesiące (57).

Badania metabolizmu miedzi

Ceruloplazmina

Cp jest głównym białkiem transportującym miedź w surowicy krwi, jest syntetyzowana w wątrobie jako nieaktywna apoceruloplazmina. U osób dorosłych stężenie Cp wynosi przeciętnie 0,2–0,5 g/l, u pacjentów z chW ta wartość jest zwykle obniżona poniżej 0,2 g/l. Badania wskazują, że 95% pacjentów homozygotycznych w stosunku do mutacji w genie *ATP7B*, ale również 20% bezobjawowych, heterozygotycznych nosicieli mutacji, ma obniżone stężenie Cp < 0,2 g/l (2). W przypadku dzieci z chW, nawet u 15–36% chorych występują prawidłowe wartości Cp.

Prawidłowe wartości stwierdza się także u około 50% pacjentów ze zdekompensowaną niewydolnością wątroby (41).

Obniżony poziom Cp stwierdza się również w przypadku innych niż chW jednostek chorobowych – choroby Menkesa, przewlekłych chorób wątroby innego pochodzenia, zespołów złego wchłaniania, enteropatii wysiękowych, zespołów nefrytycznych, wrodzonych zaburzeń glikozylacji, aceruloplazminemii, a także u zdrowych niemowląt (< 6. miesiąca życia) (41). Cp jest białkiem ostrej fazy, jej poziom w surowicy wzrasta w trakcie infekcji, przy przyjmowaniu środków antykoncepcyjnych oraz sterydów (42).

W interpretacji wyników badania Cp w surowicy istotna jest także metoda oznaczania – enzymatyczna lub nefelometryczna. Metody nefelometryczne, oparte o reakcje immunologiczne, dają zwykle wyniki wyższe niż metody enzymatyczne, ponieważ uwzględniają zarówno apoceruloplazminę, jak i holoceruloplazminę (31).

Całkowity poziom miedzi

Całkowity poziom miedzi w surowicy jest obniżony u pacjentów z chW, norma wynosi 70-140 µg/dl. Całkowity poziom miedzi w surowicy odzwierciedla poziom białka transportowego – Cp, z którą prawidłowo związane jest około 90% miedzi w krwi.

Wolna miedź, niezwiązana z Cp (NCC, ang. non-ceruloplasmin-bound copper)

Wolna miedź, niezwiązana z Cp, to frakcja toksyczna, potencjalnie odkładająca się w tkankach, która jest typowo podwyższona w chW. Jej wartość szacujemy pośrednio, wykonując obliczenie:

$$\text{NCC } (\mu\text{g/dl}) = \text{Cu w surowicy } (\mu\text{g/dl}) - \text{Cp } (\text{mg/dl}) \times 3,14$$

Wartości prawidłowe NCC mieszczą się w zakresie 5–15 µg/dl, u osób z chW są zwykle wyższe niż 15 µg/dl. Ograniczenie w stosowaniu tego parametru wynika z pośredniej metody jego szacowania, z czym jest związane ryzyko uzyskiwania fałszywie ujemnych wyników, zwłaszcza w przypadku stosowania immunologicznej metody oznaczania stężenia Cp w surowicy. Według aktualnych wytycznych, oznaczenie NCC nie jest zalecane w diagnostyce chW, ale może być wykorzystane w monitorowaniu leczenia przeciwmiedziowego (41).

Obecnie proponowana jest również metoda bezpośrednia oznaczania wolnej miedzi, czyli oznaczanie miedzi wymienialnej (CuEXC, ang. exchangeable copper) i jej pochodnej, relatywnie wymienialnej miedzi (REC, ang. relative exchangeable copper).

CuEXC to frakcja miedzi niezwiązanej z Cp, związanej z albuminami i innymi białkami, która w obecności substancji silnie chelatujących, np. EDTA (ang. ethylenediaminetetraacetic acid), może być wydzielona z surowicy metodą ultrafiltracji. REC to stosunek CuEXC do miedzi całkowitej, jest wyrażony w procentach (58). Opisywano, że przy zastosowaniu punktu odcięcia 18,5% pozwala rozróżnić pacjentów z chW od osób zdrowych i od heterozygotycznych nosicieli mutacji w genie *ATP7B* oraz osób z innymi przewlekłymi chorobami wątroby (59) (60) (61). Metoda wydaje się obiecująca, ale możliwość jej zastosowania w rutynowej diagnostyce wymaga dalszych badań i szczegółowej weryfikacji (31).

Dobowe wydalanie miedzi w moczu

Dobowe wydalanie miedzi w moczu stanowi najlepszy, najdokładniejszy parametr w diagnostyce przesiewowej w kierunku chW, jednak przeprowadzenie dokładnej zbiórki moczu może być nieraz trudne. Norma wynosi 0-50 µg/dobę, u osób chorych wydalanie miedzi w moczu wzrasta zwykle powyżej 100 µg/dobę. Istnieje możliwość niespecyficznego podwyższenia wydalania miedzi w moczu w przypadku ciężkiej niewydolności wątroby lub cholestazy. Z drugiej strony, u 16–23% pacjentów z chW, najczęściej dzieci lub pacjentów bezobjawowych, wydalanie miedzi w moczu przyjmuje wartości prawidłowe lub zbliżone do normy (41).

Badanie wydalania miedzi w moczu po obciążeniu D-p (500 mg, podane dwukrotnie, co 12 godzin) jest stosowane wyłącznie w diagnostyce pediatrycznej, wzrost wydalania miedzi powyżej 1600 µg/dobę jest uznawany za dodatni (31).

Ocena zawartości miedzi w wątrobie

Ocena zawartości miedzi w wątrobie jest procedurą inwazyjną, materiał jest pobierany przez biopsję lub operacyjnie. W przypadku osób z chW stężenie miedzi wzrasta powyżej 250 µg/g suchej tkanki, norma to 15-55 µg/g. Podwyższenie zawartości miedzi w wątrobie obserwuje się również w przypadku pierwotnego zapalenia dróg żółciowych (PBC, ang. primary biliary cholangitis), atrezji dróg żółciowych, pierwotnego stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (PSC, ang. primary sclerosing cholangitis), cholestazy zewnątrzwątrobowej, autoimmunologicznego zapalenia wątroby (AIH, ang. autoimmune hepatitis) oraz zatrucia miedzią (62) (41).

Badania radioizotopowe

Badania radioizotopowe stanowią cenne uzupełnienie diagnostyki chW w przypadkach niejednoznacznych, gdy podstawowe badania metabolizmu miedzi nie pozwalają potwierdzić lub wykluczyć chW. Badanie polega na dożylnym podaniu izotopu miedzi ^{64}Cu i oznaczeniu radioaktywności surowicy po 2, 24 i 48 godzinach. U osób z chW miedź nie jest wbudowywana w Cp i uwalniana do krwioobiegu tak jak u osób zdrowych, ale pozostaje w wątrobie. U osób zdrowych stosunek radioaktywności po 24 i 48 godzinach do radioaktywności po 2 godzinach, czyli wyjściowej, wynosi około 1. U osób z chW stosunek radioaktywności 24h/2h nie przekracza 0,36, natomiast 48h/2h nie przekracza 0,4. Badanie cechuje się wysoką czułością i swoistością, ale ograniczeniem jego stosowania jest trudna dostępność izotopu miedzi. W Polsce badanie to jest wykonywane w przypadkach wątpliwych, w II Klinice Neurologicznej, Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie (IPiN) (63).

Badania genetyczne

Choroba Wilsona jest spowodowana mutacją genu *ATP7B*, zlokalizowanego na chromosomie 13, obecnie znanych jest 800 wariantów patogennych, które mogą wywoływać tę chorobę (42). Duża liczba możliwych mutacji niezwykle utrudnia diagnostykę, rutynowo stosowane testy komercyjne nie pozwalają wykluczyć wszystkich mutacji, natomiast sekwencjonowanie całego genu jest wciąż kosztowne. Stosowane tradycyjnie panele genetyczne opierają się na kilku najczęstszych mutacjach występujących w danych populacjach, np. w Polsce dominuje mutacja p.His1069Gln (H1069Q), częste są również mutacje p.Gln1351Ter, p.Trp779Ter i c.3402delC, podobna sytuacja występuje w innych krajach północnej Europy (20).

Preferowaną techniką jest bezpośrednia analiza całego genu *ATP7B*, w tym jego regionu promotorowego, ze zwróceniem uwagi na granice intronów/eksonów i możliwe występowanie dużych delecji. Jeśli taka strategia nie przynosi identyfikacji patogennych wariantów, zwłaszcza w przypadku, gdy dane kliniczne silnie sugerują chW, można wykonać sekwencjonowanie całego eksomu (WES, ang. whole-exome sequencing) lub całego genomu (WGS, ang. whole-genome sequencing), za pomocą technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. next-generation sequencing) (64). Technologia NGS szybko zyskuje na popularności, jednak również posiada swoje ograniczenia, np. mutacje w regionach nieulegających translacji, duże delecje całych

eksonów, duże insercje i rzadkie rekombinacje genetyczne mogą nie zostać wykryte. Istotny jest również relatywnie wysoki koszt (31).

Poważny problem diagnostyczny stanowią pacjenci, będący nosicielami dwóch różnych mutacji, tzw. złożone heterozygoty, w takim przypadku istnieje ryzyko pominięcia drugiej, rzadszej mutacji. Trzeba też pamiętać, że nawet u kilku procent pacjentów z chW, diagnozowanych w ośrodkach referencyjnych, nie wykryto patogenicznej mutacji (42).

W związku z genetycznym podłożem choroby, istnieje konieczność poinformowania pacjenta o ryzyku choroby u krewnych, zwłaszcza u rodzeństwa, ponieważ ryzyko choroby wynosi w ich przypadku 25%.

Diagnostyka obrazowa

W diagnostyce chW istotne znaczenie odgrywa również diagnostyka obrazowa, zwłaszcza badanie rezonansu magnetycznego (MRI, ang. magnetic resonance imaging) mózgu. Nieprawidłowości w badaniu MRI mózgu stwierdza się u blisko 100% pacjentów z postacią neurologiczną chW, u 40–75% chorych z postacią wątrobową oraz 20-30% chorych bezobjawowych (18).

Typowe dla chW zmiany w MRI mózgu to zmiany hiperintensywne w sekwencjach T2-zależnych, zwykle symetryczne, zlokalizowane w jądrach podstawy – skorupach i jądrach ogoniastych, wzgórzach, śródmózgowiu, moście. Często występuje także zanik mózgu, pnia mózgu i mózdzku, który może być widoczny także u pacjentów z lekkimi objawami neurologicznymi, lecz silniej wyrażony jest w cięższych przypadkach (18). Spektakularne obrazy MRI spotykane w chW to widoczne w sekwencjach T2-zależnych, „duża panda” w śródmózgowiu oraz „mała panda” w moście, jednak występują one u mniej niż 20% pacjentów z postacią neurologiczną (18).

W 2020 roku zaproponowano półilościową skalę do oceny nasilenia zmian w obrazie MRI mózgu, która zawiera ocenę zarówno zmian odpowiadających ostrej toksyczności (zmiany hiperintensywne w sekwencjach T2-zależnych oraz FLAIR [ang. fluid attenuated inversion recovery] w jądrach podkorowych, wzgórzach, śródmózgowiu, moście i innych strukturach), jak również zmiany świadczące o przewlekłym uszkodzeniu (zmiany hipointensywne w sekwencjach T2-zależnych, gradientowych oraz SWI [ang. susceptibility weighted imaging] w jądrach podkorowych, wzgórzach i jądrach zębatych) oraz zaniki mózgu (oceniane w sekwencjach T1-zależnych). Skala ta może być

wykorzystana do oceny zaawansowania choroby oraz monitorowania terapii przeciwmiedziowej w praktyce klinicznej i badaniach klinicznych (65).

Leipzig score

Wsparciem w prowadzeniu diagnostyki chW jest algorytm Leipzig score – system punktacji objawów opracowany na International Meeting on Wilson Disease and Menkes Disease, Leipzig 2002, po raz pierwszy opublikowany w 2003 roku (66).

Tabela I. System oceny punktowej w diagnostyce chW (tzw. Leipzig score) opracowany w czasie International Meeting on Wilson Disease and Menkes Disease, Leipzig 2002.

Obecność pierścienia K-F	Tak Nie	2 pkt 0 pkt
Objawy neurologiczne lub typowe zmiany w MRI mózgu	Ciężkie Łagodne Nieobecne	2 pkt 1 pkt 0 pkt
Anemia hemolityczna (Coombs – negatywna)	Tak Nie	2 pkt 1 pkt
Wydalenie Cu ²⁺ w moczu	> 2 x GGN lub norma, ale > 5 x GGN po obciążeniu D-p 1-2 x GGN Norma	2 pkt 1 pkt 0 pkt
Zawartość miedzi w biopsji wątroby	Norma < 5 x norma > 5 x norma Pozytywne barwienie hepatocytów przez rodaninę*	-1 pkt 1 pkt 2 pkt 1 pkt
Poziom Cp w surowicy	< 0,1 g/L 0,1-0,2 g/L Norma (>0,2 g/L)	2 pkt 1 pkt 0 pkt
Analiza mutacji	Mutacje stwierdzone na 2 chromosomach Mutacja stwierdzona na 1 chromosomie Nie stwierdzono mutacji	4 pkt 1 pkt 0 pkt
<p>≥ 4 pkt – rozpoznanie chW; 3 pkt – chW możliwa, wskazane poszerzenie diagnostyki; ≤ 2 pkt – małe prawdopodobieństwo chW.</p>		

GGN – górna granica normy

* uwzględnia się tylko przy braku oceny zawartości miedzi w biopsji wątroby.

Źródło: Liver European Association for Study of. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. Journal of hepatology. 2012, 56(3), strony 671–685. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.11.007> (41).

1.1.5. Leczenie

Choroba Wilsona może być skutecznie leczona farmakologicznie poprzez stosowanie leków powodujących ujemny bilans miedzi w organizmie. W terapii stosowane są dwie grupy leków – leki chelatujące, zwiększające wydalanie miedzi z moczem (BAL, D-p, trientyna, sól sodowa kwasu dimerkaptopropanosulfonowego i kwas dimerkaptobursztynowy) oraz sole cynku zmniejszające wchłanianie miedzi z przewodu pokarmowego.

Dimerkaprol

Pierwszym lekiem zastosowanym w leczeniu chW był dimerkaprol (BAL, ang. British anti-Lewisite), związek odkryty w latach 40. XX wieku, a w 1948 roku po raz pierwszy zastosowany u pacjentów z chW. Podawano 3-procentowy olejowy roztwór BAL, w postaci iniekcji domięśniowych, w schemacie 6 dni/1 miesiąc, a po wprowadzeniu leków doustnych, był stosowany jako terapia alternatywna przy pogorszeniach lub braku efektu po leczeniu D-p, w schemacie 20 iniekcji/4 tygodnie, przez 2–3 cykle. Z uwagi na liczne działania niepożądane (bolesne wstrzyknięcia domięśniowe, ropnie w miejscach wstrzyknięć, odczyny gorączkowe) oraz upowszechnienie leków doustnych obecnie jest bardzo rzadko używany (67).

D-penicylamina

D-penicylamina (D-p, D-3,3-dimetylocysteina) to najpowszechniej stosowany lek chelatujący miedź, została wprowadzona do leczenia chW w 1956 roku, jako pierwszy lek podawany doustnie (68). D-p wiąże się w surowicy z tzw. wolną miedzią, niezwiązaną z Cp, powodując jej wydalanie z moczem, ponadto zmniejsza powinowactwo miedzi do białek i polipeptydów, usuwając ten metal z tkanek oraz indukuje syntezę metalotionein w wątrobie, które neutralizują miedź wewnątrzkomórkową (69).

D-p stosowana jest zwykle w dawce dobowej 1000 – 1500 mg, u dzieci 20 mg/kg/dobę, podawanej w 2-3 dawkach podzielonych, na pusty żołądek, 30-60 minut przed, lub 2 godziny po posiłku, ponieważ spożycie z posiłkiem zmniejsza wchłanianie leku o 50% (41). Leczenie należy rozpoczynać bardzo powoli, z uwagi na ryzyko nieodwracalnego pogorszenia stanu neurologicznego (10-50% pacjentów), związanego z toksycznym działaniem uwolnionej do krwiobiegu wolnej miedzi. Lek powinien być wprowadzany od dawki początkowej 125 mg/dobę, zwiększanej o 125 mg/dobę w odstępach co 3-4 dni.

Podczas prawidłowego leczenia dochodzi zazwyczaj do normalizacji lub znacznej poprawy testów wątrobowych oraz ustąpienia klinicznych objawów niewydolności wątroby w ciągu pierwszych 2-6 miesięcy. U pacjentów z objawami neurologicznymi poprawa ich jest wolniejsza i może zachodzić do 3 lat od rozpoczęcia leczenia. Leczenie wymaga regularnego monitorowania metabolizmu miedzi, badania kontrolne powinny być wykonywane nie rzadziej niż co 12 miesięcy (69). Po rozpoczęciu terapii wydalanie miedzi z moczem wzrasta w ciągu 24h do 1000 $\mu\text{g}/\text{dobę}$, w trakcie przewlekłego leczenia obniża się do 200-500 $\mu\text{g}/\text{dobę}$, a wydalanie miedzi niższe niż 200 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ wymaga weryfikacji czy doszło do niedoboru miedzi w wyniku zbyt intensywnego leczenia (ang. overtreatment) czy pacjent nie stosuje się do zaleceń dotyczących właściwego przyjmowania leku. Parametrem różnicującym jest poziom NCC w surowicy, wartości poniżej 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ wskazują na konieczność zmniejszenia dawki leku, natomiast powyżej 15 $\mu\text{g}/\text{dl}$ wskazują na nieprzestrzeganie zaleceń (ang. non-compliance) i niewłaściwe przyjmowanie leku przez pacjenta (70). Ważnym badaniem, umożliwiającym stwierdzenie czy leczenie D-p jest efektywne, jest oznaczenie dobowego wydalania miedzi z moczem po odstawieniu leku na 48 godzin. U pacjentów prawidłowo leczonych wartości dobowego wydalania miedzi powinny ulec normalizacji i wynosić 0–50 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ (71) (69).

Stosowanie D-p wiąże się z licznymi działaniami niepożądanymi, poważne działania niepożądane, które wymagają odstawienia leku występują u 15-30% pacjentów (41). Wczesne działania niepożądane rozwijają się w ciągu pierwszych 3 tygodni leczenia, zaliczamy do nich gorączkę, wysypkę skórą, limfadenopatię, neutropenię z trombocytopenią, białkomocz. W przypadku wystąpienia wczesnych reakcji nadwrażliwości D-p powinna być odstawiona i zamieniona na lek alternatywny. Późne działania niepożądane rozwijają się po 3 tygodniach, do kilku lat od rozpoczęcia leczenia, obejmują nefrotoksyczność, zespół toczniopodobny, zespół Goodpasture'a, małopłytkowość, aplazję szpiku, elastosis perforans serpingosa, pemfigoid, liszaj płaski, aftowe zapalenie jamy ustnej, miastenię, zapalenie wielomięśniowe (70) (41).

Trientina

Trientina, podobnie jak D-p, należy do grupy leków chelatujących miedź, ale cechuje się rzadszym występowaniem działań niepożądanych, po raz pierwszy została zastosowana w leczeniu chW w 1969 roku (72). Trientina ma strukturę podobną do poliamin, jest dostępna jako dichlorowodorek trietylenotetraminy lub tetrachlorowodorek

trietylenotetraminy. Tetrachlorowodorek, w odróżnieniu od dichlorowodoru trietylenotetraminy, wykazuje większą stabilność, nie wymaga przechowywania w niskiej temperaturze (31). Trientyna bardzo słabo wchłania się z przewodu pokarmowego, powinna być przyjmowana na czczo – na godzinę przed posiłkiem lub 2 godziny po posiłku, w dawce 750-1500 mg/dobę, w 2-3 dawkach podzielonych. U dzieci dawka dobową to 20 mg/kg masy ciała. Podobnie jak D-p, lek należy włączać powoli z uwagi na ryzyko pogorszenia stanu neurologicznego. Do działań niepożądanych trientyny należą zapalenie błony śluzowej żołądka, anemia syderoblastyczna, zespół toczniopodobny, utrata smaku. Trientyna ma właściwość chelatowania żelaza, przy czym tworzą się toksyczne kompleksy, z tego powodu nie wolno podawać pacjentom leczonym trientyną preparatów żelaza (70). W monitorowaniu terapii, podobnie jak w przypadku D-p, stosowana jest ocena parametrów metabolizmu miedzi – wydalania miedzi w dobowej zbiorce moczu oraz stężenia NCC (41).

Sole cynku

Sole cynku powodują zmniejszenie wchłaniania miedzi w przewodzie pokarmowym, w Polsce powszechnie stosowany jest siarczan cynku (ZS), ale w innych krajach także inne związki (octan, glukonian cynku; preparaty różnią się zawartością elementarnego cynku). Po raz pierwszy zostały zastosowane w leczeniu chW w latach 60. XX wieku (70). Cynk indukuje syntezę wiążących miedź metalotionein w enterocytach, miedź związana z metalotioneinami jest wydalana ze złuszczającymi się enterocytami wraz z kałem. Dodatkowo, cynk indukuje syntezę metalotionein w wątrobie, związanie miedzi zmniejsza jej toksyczność i ogranicza uszkodzenie wątroby (41).

Lek jest stosowany w dawce dobowej 150 mg cynku elementarnego w trzech dawkach podzielonych (41) (70), w przypadku dzieci poniżej 5. roku życia dawka to 50 mg cynku w dwóch dawkach podzielonych, powyżej 5. roku życia i z masą ciała < 50 kg dawka to 75 mg cynku w trzech dawkach podzielonych, a powyżej 5. roku życia i z masą ciała > 50 kg dawka jak u osób dorosłych (73).

Wyniki przeprowadzonych badań retrospektywnych i metaanaliz wskazują, że cynk jest równie skuteczny jak leki chelatujące w terapii chW, posiada przy tym nieliczne działania niepożądane, do najczęstszych należą objawy dyspeptyczne oraz choroba wrzodowa żołądka, rzadziej dochodzi do bezobjawowego podwyższenia aktywności enzymów trzustkowych, neuropatii, mielopatii, niedokrwistości i neutropenii (74) (75).

W monitorowaniu leczenia oznacza się dobowe wydalanie miedzi z moczem i stężenie NCC. Jest zalecane by w długotrwałym leczeniu (> 1 roku) dobowe wydalanie miedzi z moczem wynosiło poniżej 75 µg/dobę, a poziom NCC mieścił się w granicach 5–15 µg/dl; możliwe jest również oznaczanie dobowego wydalania cynku z moczem, ale brakuje ściśle określonego zakresu normy (70) (41).

Preparaty cynku są zalecane jako lek pierwszego wyboru u pacjentów z objawami neurologicznymi, a także w terapii podtrzymującej oraz w przypadku pacjentów w okresie przedobjawowym. Kontrowersje budzi skuteczność cynku jako leku pierwszego rzutu u chorych z postacią wątrobową, ponieważ wyniki niektórych badań retrospektywnych wskazywały, że u pacjentów z objawami wątrobowymi leczonych cynkiem, częściej niż u chorych leczonych D-p, dochodzi do pogorszenia funkcji wątroby (76) (77). W związku z tym wytyczne hepatologiczne zalecają stosowanie soli cynku jako leczenia podtrzymującego w terapii pacjentów objawowych, ewentualnie jako leki pierwszego rzutu u pacjentów z objawami neurologicznymi oraz chorych bezobjawowych (70) (41).

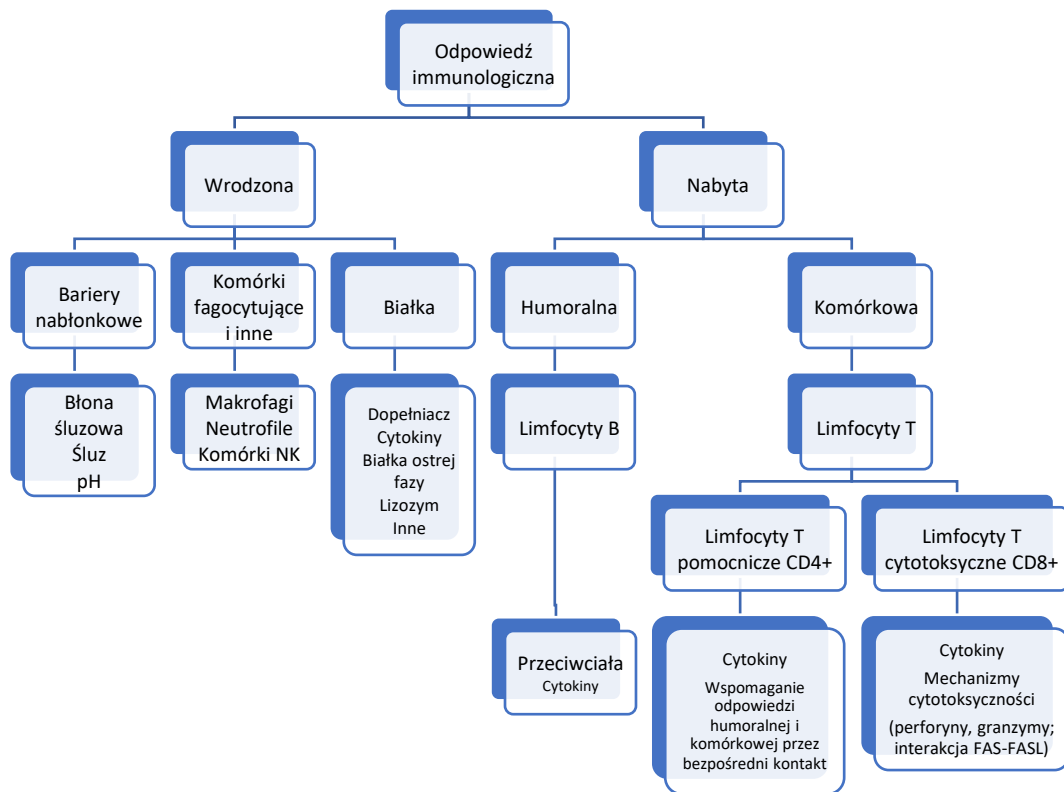
1.2. Zjawisko autoimmunizacji

1.2.1. Zarys budowy i funkcji układu immunologicznego

Układ immunologiczny to złożony system, którego rolą jest ochrona organizmu przed patogennymi drobnoustrojami, toksynami, komórkami nowotworowymi. Specyficznymi cechami układu immunologicznego są zdolność do rozpoznania obcej struktury – antygeny oraz pamięć immunologiczna, która pozwala na szybsze i efektywniejsze usunięcie niepożądanego antygeny przy ponownym z nim kontakcie. Te cechy sprawiają, że układ immunologiczny, wraz z układem nerwowym i hormonalnym, jest odpowiedzialny za utrzymanie homeostazy organizmu.

Do układu immunologicznego zaliczamy narządy i naczynia limfatyczne, komórki uczestniczące w reakcjach immunologicznych, przeciwciała, cytokiny itp. Odpowiedź immunologiczna dzieli się na dwie składowe – odpowiedź wrodzoną i nabytą. Odporność wrodzona jest starsza pod względem filogenetycznym, jej elementy obecne są już u bezkręgowców. Cechą charakterystyczną odporności wrodzonej jest natychmiastowa odpowiedź na wszelkie czynniki infekcyjne i toksyczne, aktywuje się nawet bez wcześniejszego kontaktu z nimi, nie ma charakteru swoistego antygenowo.

Odporność nabyta ma charakter reakcji swoistej antygenowo, kontakt z rozpoznawanym antygenem wywołuje wytwarzanie antygenowo swoistych komórek oraz immunoglobulin (78). Schemat organizacji układu immunologicznego jest przedstawiony na **Rycinie 1**.



Rycina 1. Schemat organizacji układu immunologicznego

Źródło: opracowanie własne.

1.2.2. Budowa i rola przeciwciał

Przeciwciała, inaczej immunoglobuliny, to główne glikoproteiny układu odpornościowego, są wytwarzane przez komórki plazmatyczne powstające z limfocytów B. Biorą udział w wiązaniu antygeny, aktywacji układu dopełniacza, procesie opsonizacji oraz reakcjach cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał, przez co mają bardzo istotne znaczenie w obronie organizmu przed patogenami (79).

Przeciwciała są zbudowane z czterech łańcuchów polipeptydowych, dwóch łańcuchów ciężkich (H, heavy), o masie 50 kDa i dwóch łańcuchów lekkich (L, light), o masie 25 kDa, połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi (80). W każdym łańcuchu ciężkim i lekkim wyróżniamy części zmienne (V, variable) oraz stałe (C, constant), swoistość przeciwciała jest zależna od konfiguracji przestrzennej części zmiennych (81).

Wyróżniamy pięć typów łańcuchów ciężkich: α (alfa), δ (delta), ϵ (epsilon), γ (gamma), μ (mi), i w związku z tym odpowiednio pięć klas immunoglobulin: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM (81). Łańcuchy lekkie mogą występować w dwóch typach: κ (kappa) i λ (lambda). Poza formą monomeryczną, zbudowaną z czterech łańcuchów polipeptydowych, występują również formy polimeryczne (IgA, IgM) (81). Fragment przeciwciała wiążący antygen jest nazywany paratopem, jest on dopasowany przestrzennie do determinanty antygenowej, czyli epitopu (82). Najczęściej określone przeciwciało wiąże jeden określony antygen, jednak część przeciwciał jest polireaktywna tzn. każdy z fragmentów wiążących antygen (Fab) może związać więcej niż jeden antygen (83). Siłę wiązania pojedynczej determinanty antygenowej przez miejsce wiążące antygen przeciwciała nazywamy powinowactwem (ang. affinity). Najczęściej antygen posiada wiele determinant antygenowych, a przeciwciała posiadają więcej niż jedno miejsce wiążące antygen, dlatego o sile wiązania antygeny przez przeciwciało, czyli awidności (ang. avidity), decyduje powinowactwo oraz liczba fragmentów wiążących antygen (84).

1.2.3. Mechanizm powstawania autoimmunizacji

Autoimmunizacja to odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko autoantygenowi, czyli własnemu antygenowi organizmu. Najczęściej taka odpowiedź jest hamowana dzięki zjawisku autotolerancji i nie wywołuje choroby z autoimmunizacji. Odpowiedź autoimmunizacyjna obejmuje działanie autoreaktywnych limfocytów T uszkadzających własne tkanki oraz wytwarzanie autoprzeciwciał przez autoreaktywne limfocyty B (85).

Autoprzeciwciała to immunoglobuliny, które reagują przeciwko prawidłowym białkom gospodarza, mogą mieć charakter naturalny lub patologiczny (86). Naturalne autoprzeciwciała są zwykle obecne w niskim mianie jako przeciwciała klasy IgM (87), nie wiążą dopełniacza i zazwyczaj mają słabe powinowactwo do rozpoznawanych antygenów, są wieloreaktywne i nie mają związku ze stanami chorobowymi, występują częściej u kobiet niż u mężczyzn, a ich swoistość pozostaje stabilna wraz ze starzeniem się organizmu (86). Naturalne autoprzeciwciała mogą wiązać produkty naturalnej śmierci komórek lub obce antygeny przypominające autoantygeny, w ten sposób mogą zapobiegać powstawaniu autoreaktywnych komórek immunologicznych i pełnią funkcję ochronną (87) (88). Patologiczne autoprzeciwciała są syntetyzowane w wyniku swoistej antygenowo aktywacji limfocytów B i ekspansji klonalnej komórek plazmatycznych,

zwykle są obecne w surowicy w wysokich mianach, jako izotypy wiążące dopełniacz, mają wysokie powinowactwo do antygeny i mogą wywoływać objawy choroby autoimmunologicznej (87). Autoprzeciwciała jednak mogą występować zarówno u osób zdrowych, jak i w chorobach wywołanych przez mechanizmy inne niż immunologiczne (89) (90).

Tolerancja na własne antygeny jest utrzymywana dzięki mechanizmom centralnym, czyli eliminacji autoreaktywnych limfocytów podczas ich dojrzewania w centralnych narządach limfatycznych oraz dzięki mechanizmom obwodowym. Pierwszy, zasadniczy etap w eliminacji autoreaktywnych limfocytów T zachodzi w trakcie ich dojrzewania w grasicy, w procesie apoptozy giną limfocyty T, które mają zdolność wiązania się z dużym powinowactwem z autoantygenami prezentowanymi przez komórki nabłonkowe rdzenia grasicy i komórki dendrytyczne. W przypadku limfocytów B, gdy dojrzewające w szpiku kostnym limfocyty rozpoznają z dużym powinowactwem autoantygeny, dochodzi do ponownej rekombinacji genów immunoglobulinowych, częściej łańcucha lekkiego niż ciężkiego, czyli tzw. redagowania receptora i zmiany jego swoistości oraz utraty zdolności wiązania autoantygeny. Autoreaktywne limfocyty, które przekroczyły barierę mechanizmów tolerancji centralnej, są hamowane przez mechanizmy tolerancji obwodowej, do których zaliczamy delecję klonalną, sekwestrację antygeny, anergię limfocytów, aktywną supresję przez limfocyty regulatorowe. W przypadku limfocytów B stan anergii jest w pełni odwracalny, limfocyty B zdolne do rozpoznania autoantygenów krążą w organizmie, a stan tolerancji może ulec przełamaniu.

Postulowane są różne mechanizmy, w których dochodzi do przełamania autotolerancji. Może to wystąpić w wyniku mimikry molekularnej, w której infekcja patogenem prowadzi do odpowiedzi immunologicznej wobec antygenów zbliżonych budową do antygenów własnych organizmu i w rezultacie dochodzi do reakcji krzyżowych (91). Klasycznym przykładem mimikry antygenowej jest posiadanie wspólnych epitopów przez paciorkowce grupy A oraz glikoproteiny serca, co prowadzi do rozwoju gorączki reumatycznej po infekcji paciorkowcowej (92) lub związek zespołu Guillaina-Barrégo z poprzedzającym zakażeniem *Campylobacter jejuni*, którego lipooligosacharydy ściany komórkowej posiadają wspólne epitopy z gangliozydami, które są składnikami błony komórek nerwowych (93). W alternatywnym mechanizmie, uszkodzenie tkanek może prowadzić do uwolnienia antygenów normalnie ukrytych, izolowanych od układu immunologicznego, w rezultacie inicjując odpowiedź autoimmunizacyjną, przykładem jest zjawisko rozwoju autoimmunologicznego zapalenia

mózgu z przeciwciałami przeciwko receptorowi dla glutaminianu (anty-NMDAR, przeciw receptorowi N-metylo-D-asparaginowemu), po zapaleniu wirusowym wywołanym przez Herpes simplex (94). Innym mechanizmem, który może być odpowiedzialny za indukcję nieprawidłowej odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciwko układowi nerwowemu jest ektopowa ekspresja antygenów neuronalnych w komórkach nowotworowych (antygenów onkoneuronalnych), co odpowiada za rozwój zespołów paranowotworowych, np. teratoma jajnika, nowotwór związany z zapaleniem mózgu z przeciwciałami anty-NMDAR, zawiera dojrzałą lub niedojrzałą tkankę nerwową (95). Należy zauważyć, że mimo iż antygeny onkoneuronalne występują często, tylko u niewielkiej części chorych na nowotwory (< 1%) rozwijają się zespoły paranowotworowe (96). Ponadto, działanie czynników egzogennych np. infekcji, leków, promieniowania ultrafioletowego może prowadzić do zmiany struktury antygenów własnych, które aktywują limfocyty autoreaktywne (89).

1.2.4. Znaczenie autooprzeciwciał, choroby z autoimmunizacji

Szacuje się, że choroby autoimmunologiczne dotyczą blisko 7% światowej populacji, a liczba zachorowań rośnie (85). Najwięcej zachorowań przypada między 40. a 50. rokiem życia, kobiety stanowią około 80% wszystkich chorych (97), choroby cechuje przewlekły przebieg, z okresami zaostrzeń i remisji (98). Choroby z autoimmunizacji dzieli się na narządowo swoiste, w przypadku których autooprzeciwciała reagują z antygenami swoistymi dla określonej tkanki, np. choroba Hashimoto, choroba Gravesa-Basedowa, choroba Addisona, miastenia, stwardnienie rozsiane, pęcherzyca zwykła, oraz układowe, z autooprzeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom powszechnie występującym w organizmie, np. toczeń rumieniowaty układowy (SLE), twardzina układowa, zapalenie skórno-mięśniowe, zespół Sjögrena (85).

Uważa się, że choroby autoimmunologiczne powstają w wyniku współdziałania czynników genetycznych i środowiskowych, polimorfizmy w genach zaangażowanych w regulowanie odpowiedzi immunologicznej skutkują wadliwym działaniem regulacyjnym lub obniżonym progiem aktywacji limfocytów, a czynniki środowiskowe stymulują aktywację autoreaktywnych limfocytów, które wymknęły się spod mechanizmów tolerancji i rozpoznają antygeny własnego organizmu (99). Na udział czynników genetycznych wskazuje częstsze występowanie zaburzeń autoimmunologicznych u bliźniąt. W stwardnieniu rozsianym zgodność u bliźniąt

monozygotycznych wynosi około 25%, w porównaniu z około 5% u bliźniąt dzygotycznych (100), w miastennii zgodność wynosi około 35% u bliźniąt monozygotycznych, natomiast około 5% u bliźniąt dzygotycznych (101). Uważa się, że geny układu zgodności tkankowej (MHC, ang. major histocompatibility complex) mają większy udział w ryzyku wystąpienia choroby autoimmunologicznej niż jakiegokolwiek inne loci, jednocześnie locus MHC jest najbardziej polimorficzny w ludzkim genomie. Przykładem silnej predyspozycji genetycznej związanej z układem MHC jest zapalenie mózgu z przeciwciałami anti-LGI1 (białko bogate w leucynę nieaktywne w glejakach, typu 1; ang. leucine-rich glioma inactivated protein 1), które wykazuje silne powiązanie z HLA-DR7, obecnym u 88% pacjentów, a jedynie u 19,6% osób zdrowych (102), natomiast miastenia związana z przeciwciałami anti-MUSK jest ściśle powiązana z haplotypem HLADR14-DQ5 (103).

Oznaczanie autoprzeciwciał jest użyteczne w diagnostyce, prognozowaniu przebiegu, a w niektórych przypadkach także monitorowaniu chorób autoimmunologicznych (104). Odpowiedź autoimmunizacyjna cechuje się złożonością, u pacjentów, u których zdiagnozowano tę samą chorobę, mogą występować różne izotypy autoprzeciwciał, autoprzeciwciała mogą także różnić się powinowactwem i awidnością (104). Rozwój pełnoobjawowych chorób autoimmunologicznych często poprzedza faza subkliniczna, w której zachodzi dysregulacja układu immunologicznego i możliwe jest wykrycie markerów serologicznych, choć nie obserwuje się jeszcze objawów choroby. Po upływie miesięcy lub lat, następuje przełamanie autotolerancji i obserwujemy manifestację kliniczną choroby autoimmunologicznej. W badaniach przeprowadzonych u amerykańskich żołnierzy, u których zdiagnozowano SLE, stwierdzono, że przeciwciała przeciwjądrowe (ANA, ang. antinuclear antibodies) były obecne u 78% osób, a przeciwciała anti-Ro u 47% osób, na 10 lat przed pojawieniem się pierwszych objawów choroby. Na 2,5 roku przed rozpoznaniem choroby, u 55% osób wykrywano przeciwciała przeciw dwuniciowemu DNA (anty-dsDNA), natomiast na kilka miesięcy przed ujawnieniem się choroby pojawiały się przeciwciała przeciw rybonukleoproteinie (anty-RNP) i przeciwciała anti-Smith (anty-Sm). W późniejszym okresie choroby nowe autoprzeciwciała pojawiały się bardzo rzadko (105).

Testy diagnostyczne wykrywające autoprzeciwciała cechuje wybitna odwrotna zależność między czułością i swoistością. Z tego powodu rekomendacje często zalecają dwuetapową strategię diagnostyczną z wykorzystaniem różnych technik laboratoryjnych. W pierwszym etapie stosuje się test przesiewowy, który powinien cechować się dużą

czułością, ale w związku z tym mniejszą swoistością, czyli większą liczbą wyników fałszywie dodatnich. W drugim etapie przeprowadza się test potwierdzenia, który powinien charakteryzować się dużą swoistością, czyli wskazywać obecność ściśle określonych autoprzeciwciał, ale przy większej ilości wyników fałszywie ujemnych. Przy interpretacji wyniku badania autoprzeciwciał istotne jest określenie ich miana, czyli najwyższego rozcieńczenia badanego płynu ustrojowego, przy którym badane przeciwciało jest nadal wykrywalne. Im większe miano autoprzeciwciał, tym większa swoistość diagnostyczna analizowanego testu (106).

ANA stanowią jedne z najczęściej badanych autoprzeciwciał w diagnostyce układowych chorób tkanki łącznej, obejmują zróżnicowaną grupę przeciwciał skierowanych przeciwko wielu antygenom wewnątrzkomórkowym, zlokalizowanym w jądrze komórkowym, składnikach otoczki jądrowej, aparacie wrzeciona mitotycznego i cytozolu (107). Nazewnictwo przeciwciał z grupy ANA pochodzi od biochemicznych właściwości antygeny docelowego (np. anty-dsDNA, anty-dwuniciowe DNA), nazwy choroby związanej z występowaniem przeciwciała (np. anty-SS-A, antygen A związany z zespołem Sjögrena) lub nazwiska pierwszego pacjenta (np. anty-Sm, Smith) (108). Charakterystyka najistotniejszych klinicznie przeciwciał przeciwjądrowych jest zawarta w **Tabeli II**. Badanie w kierunku ANA powinno być wykonywane tylko u pacjentów z objawami choroby autoimmunologicznej, ponieważ ANA w niższych mianach mogą występować w wielu schorzeniach o podłożu innym niż autoimmunologiczne (infekcje wirusowe, choroby wątroby, zespół przewlekłego zmęczenia, nowotwory) oraz u osób zdrowych, szczególnie u kobiet w ciąży, kobiet po 40. roku życia, osób starszych (109). ANA są wykrywane u osób zdrowych, w mianie 1:40 nawet u 31,7% badanych, 1:80 u 13,3%, 1:160 u 5,0% i 1:320 u 3,3% (110). Objawy kliniczne, które są uznawane za wskaźniki dużego ryzyka układowej choroby tkanki łącznej i wskazanie do diagnostyki ANA to: objawy ciężkiego zmęczenia, objawy zespołu Raynauda, objawy zapalenia stawów, gorączka o nieznanym przyczynie oraz stosowanie leków związanych z ryzykiem rozwoju toczenia indukowanego lekami (DIL) (109). Złotym standardem jest wykrywanie ANA za pomocą testu immunofluorescencji pośredniej (IIF) z wykorzystaniem komórek HEp-2 (ang. human laryngeal epidermoid carcinoma cell line type 2) (111). Typy świecenia w IIF odzwierciedlają topograficzne rozmieszczenie docelowych autoantygenów i mogą wskazywać na swoistości przeciwciał (107).

Tabela II. Charakterystyka najistotniejszych klinicznie przeciwciał przeciwjądrowych

Autoprzeciwciało	Częstość występowania w chorobach tkanki łącznej	Znaczenie kliniczne
Anty-dsDNA	> 95% w aktywnym SLE z zajęciem nerek 50-70% w aktywnym SLE bez zajęcia nerek < 40% w nieaktywnym SLE	Kryterium rozpoznania SLE Marker prognostyczny dla SLE (marker zajęcia nerek, aktywności choroby, zastosowanie w monitorowaniu terapii)
Anty-Sm	5–10% w SLE	Wysoce specyficzne dla SLE Kryterium rozpoznania SLE
Anty-RNP	100% w MCTD (mieszana choroba tkanki łącznej) 13–32% w SLE	Kryterium serologiczne MCTD
Anty-SS-A	60–96% w pierwotnym zespole Sjögrena 40–60% we wtórnym zespole Sjögrena 25–60% w SLE 60–100% w SCLE (podostra skórna postać tocznia rumieniowatego) 90% w toczniu noworodkowym	Kryterium rozpoznania pierwotnego zespołu Sjögrena Związane z manifestacjami pozagruczołowymi Wykrywane u matek noworodków z toczniem noworodkowym
Anty-Ro-52	17–63% w zespole Sjögrena 23% w SLE 20% w twardzinie układowej W chorobach innych niż układowe choroby tkanki łącznej (28% w PBC, 17% w AIH)	Występuje w różnych chorobach autoimmunologicznych
Anty-SS-B	40–70% w pierwotnym zespole Sjögrena 5–50% we wtórnym zespole Sjögrena 19–30% w SLE 25–80% w SCLE 70% w toczniu noworodkowym	Zwykle występują razem z przeciwciałami anty-SS-A
Anty-Scl-70	65% w uogólnionej twardzinie układowej	Kryterium rozpoznania twardziny układowej Wskazuje na szybciej postępującą uogólnioną postać twardziny układowej
Anty-PM-Scl	24–55% w zespole nakładania zapalenie wielomięśniowe/twardzina 8–12% w idiopatycznych miopatiach zapalnych 1–16% w twardzinie układowej	Marker diagnostyczny dla zespołu nakładania zapalenie wielomięśniowe/twardzina
Anty-PCNA	3% w SLE	

Anty-Jo-1	24–30% w idiopatycznych miopatiach zapalnych	Kryterium rozpoznania idiopatycznych miopatii zapalnych Związane ze śródmiąższowym włóknieniem płuc
Anty-CENP-B	57–82% w zespole CREST 3–12% w twardzinie ograniczonej rozsianej	Kryterium rozpoznania twardziny układowej Związane z zespołem CREST
Anty-nukleosomy	56–90% w SLE	Wysoce specyficzne dla SLE
Anty-histony	92–95% w DIL 50–80% w SLE	Wysoka specyficzność dla DIL
Anty-białko rybosomalne-P	10–35% w SLE	Wysoce specyficzne dla SLE

Źródło: na podstawie Tešija Kuna A, Đerek L, Drvar V i wsp. Assessment of antinuclear antibodies (ANA): National recommendations on behalf of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine. *Biochem Med (Zagreb)*. 2021;31(2):020502. <https://doi.org/10.11613/BM.2021.020502> (108)

W diagnostyce reumatologicznej, poza najczęściej badanymi przeciwciałami ANA, wykorzystuje się szerszy zakres testów immunologicznych. Do istotnych z klinicznego punktu widzenia i często oznaczanych autoprzeciwciał, należą między innymi przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych (ANCA, ang. anti-neutrophil cytoplasmic antibodies). Przeciwciała ANCA stanowią serologiczny marker układowych zapaleń naczyń, wyróżnia się dwa główne typy ANCA, cANCA (PR3-ANCA), które reagują z proteinazą-3 i wykazują cytoplazmatyczny typ świecenia oraz pANCA (MPO-ANCA), które reagują z mieloperoksydazą i wykazują okołojądrowy typ świecenia. cANCA są obserwowane w ziarniniakowości z zapaleniem naczyń, natomiast pANCA w mikroskopowym zapaleniu naczyń oraz eozynofilowej ziarniniakowości z zapaleniem naczyń (112). Przeciwciała ANCA, zwłaszcza p-ANCA, mogą występować u osób zdrowych, szczególnie w starszym wieku, a także w innych układowych chorobach tkanki łącznej, autoimmunologicznych chorobach wątroby, chorobach zapalnych jelit, infekcjach, nowotworach, mukowiscydozie i celiakii. Zapalenia naczyń związane z obecnością ANCA opisywano u pacjentów stosujących niektóre leki - propylotiouracyl, hydralazynę, interferon, D-p, minocyklinę (113).

1.2.5. Autoimmunizacja polekowa

Działania niepożądane leków są najczęstszą przyczyną chorób jatrogennych, szacuje się, że niepożądane reakcje polekowe mogą występować w 5-15% podejmowanych prób terapeutycznych. Reakcje polekowe można podzielić na dwie podstawowe grupy – reakcje, które są przewidywalne (typu A, zależne od dawki, farmakologiczne) i reakcje, które są nieprzewidywalne (typu B, niezależne od dawki, idiosynkratyczne) (114).

Przewidywalne reakcje polekowe wynikają z farmakologicznego działania leku, wywołują ten sam efekt u większości osób, mechanizm działania jest zwykle dobrze zdefiniowany, a krzywa odpowiedzi na dawkę jest przewidywalna, np. uspokajające działanie leków przeciwhistaminowych pierwszej generacji.

Reakcje idiosynkratyczne są często zmienne, nie występują u wszystkich pacjentów, ich mechanizm może być bardziej złożony, z uwzględnieniem działania leku oraz czynników gospodarza (np. podatność genetyczna, ogólny stan zdrowia, choroby współistniejące, inne stosowane leki oraz narażenia środowiskowe). Reakcje idiosynkratyczne można dalej podzielić na związane i niezwiązane z układem immunologicznym. Wśród reakcji niepożądanych związanych z układem immunologicznym wyróżnia się te, które są związane z przeciwciałami IgE i te, które związane z nimi nie są. Reakcje z udziałem IgE to reakcje alergiczne lub reakcje nadwrażliwości. Autoimmunizacja wywołana lekami nie jest związana z przeciwciałami IgE, może być związana z wytwarzaniem autoprzeciwciał i/lub reakcją typu komórkowego, skierowaną przeciw własnym antygenom. Obecność autoprzeciwciał nie zawsze koreluje z występowaniem objawów klinicznych, które z kolei mogą być obecne u pacjentów bez wykrywalnych autoprzeciwciał. U większości pacjentów z autoprzeciwciałami, powstałymi w wyniku stosowania leków, nie rozwijają się kliniczne objawy choroby autoimmunologicznej (114). Wiele leków, w tym powszechnie stosowanych, posiada właściwość indukowania autoprzeciwciał, jednak tylko kilka z nich ma definitywnie potwierdzony związek z chorobą autoimmunologiczną. Wytwarzanie autoprzeciwciał i indukowanie objawów choroby autoimmunologicznej może wynikać z szeregu mechanizmów, które mogą obejmować supresję centralnej lub obwodowej tolerancji, zakłócenia transkrypcji genów w limfocytach T i B, zaburzenia równowagi cytokin i receptorów cytokinowych, modyfikację struktury chromatyny oraz modyfikację antygeny.

Toczeń polekowy (DIL, ang. drug-induced lupus erythematosus) jest zespołem toczniopodobnym związanym czasowo z ciągłą ekspozycją na lek (trwającą od 1 miesiąca do nawet ponad dekady), który ustępuje po zaprzestaniu stosowania leku. DIL stanowi najczęstszą formę jatrogenie indukowanej choroby autoimmunologicznej, do licznej grupy leków powiązanych z DIL należą hydralazyna, prokainamid, izoniazyd, metyldopa, chinidyna, minocyklina, D-p i chlorpromazyna. Lekami o najwyższym ryzyku są prokainamid (20%) i hydralazyna (5-8%) (115). Oprócz DIL, obserwuje się także, że ekspozycja na niskie stężenia niektórych leków (antybiotyków, niesteroidowych leków przeciwzapalnych, leków przeciwpadaczkowych i estrogenów), przez stosunkowo krótki czas, może nasilić współistniejący SLE, który w tym przypadku nie ustępuje lub nawraca po odstawieniu leku (115). Nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych obserwowane w DIL obejmują podwyższone markery stanu zapalnego i dodatnie miano przeciwciał ANA. Autoprzeciwciała w toczniu polekowym są zwykle skierowane przeciwko histonom, natomiast przeciwciała przeciwko chromatynie są związane z rozwojem kłębuszkowego zapalenia nerek związanego z toczniem (114).

Działania niepożądane D-p związane z wywoływaniem zaburzeń autoimmunologicznych zostały zaprezentowane w rozdziale: 1.3 Zaburzenia immunologiczne w chW.

1.2.6. Znaczenie zjawisk autoimmunologicznych w neurologii

Zaburzenia układu nerwowego o podłożu autoimmunologicznym mogą dotyczyć każdej części układu nerwowego, zarówno OUN – mózgu i rdzenia kręgowego, jak również obwodowego układu nerwowego – nerwów obwodowych oraz złącza nerwowo-mięśniowego i mięśni szkieletowych. Rozwój neuroimmunologii sprawił, że grupa schorzeń układu nerwowego, posiadająca u podłoża nieprawidłową odpowiedź immunologiczną przeciwko własnym antygenom organizmu, stale rośnie, dla części z tych zaburzeń autoantygen nie został jeszcze zdefiniowany. Do schorzeń neurologicznych o podłożu autoimmunologicznym należą m.in. choroby demielinizacyjne, takie jak stwardnienie rozsiane, zapalenie nerwów wzrokowych i rdzenia kręgowego (NMO, ang. neuromyelitis optica), zespoły paraneoplastyczne, autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego, neuropatie demielinizacyjne, miastenia itd. Zmiany patologiczne w OUN mogą również wynikać z zajęcia układu nerwowego wtórnie do układowych zaburzeń autoimmunologicznych, takich jak SLE (92).

Zaburzenia OUN wywołane przez przeciwciała charakteryzują się obecnością autoprzeciwciał skierowanych przeciwko specyficznym antygenom neuronalnym lub glejowym. Wciąż odkrywane są nowe autoprzeciwciała przeciwneuronalne, ale w praktyce klinicznej zdarzają się "seronegatywne" zaburzenia autoimmunologiczne OUN, ponieważ nie wszystkie przeciwciała zostały zidentyfikowane, a niekiedy przyczyną zaburzeń mogą być dominujące mechanizmy komórkowe (116).

Dobrze poznane schorzenia neurologiczne, których patomechanizm jest związany z wytwarzaniem patogennych autoprzeciwciał to miastenia i zespół miasteniczny Lamberta-Eatona (LEMS, ang. Lambert-Eaton myasthenic syndrome). W tym przypadku przeciwciała są skierowane przeciwko receptorom błon komórkowych lub kanałom jonowym zaangażowanym w transmisję w złączy nerwowo-mięśniowym; przeciwciała wiążą się z zewnątrzkomórkowymi epitopami, a wymiana plazmy prowadzi do wyraźnych korzyści klinicznych. Zarówno badania *in vitro*, jak i bierny transfer przeciwciał wskazują, że czynnikiem patogennym są przeciwciała klasy IgG (117).

Objawy miastenii zwykle pojawiają się po okresie dojrzewania, coraz częściej są rozpoznawane także u pacjentów w starszym wieku (>50 lat). Choroba ma charakter przewlekły, a spontaniczne remisje są rzadkie. Najczęstsze objawy to osłabienie i męczliwość mięśni, często dotknięte są mięśnie gałkoruchowe z towarzyszącą diplopią i ptozą, a także mięśnie twarzy, mięśnie opuszkowe, mięśnie oddechowe i mięśnie kończyn. Osłabienie mięśni nasila się przy powtarzaniu czynności i poprawia się podczas odpoczynku lub stosowania inhibitorów acetylocholinoesterazy, które zwiększają ilość acetylocholiny (ACh) w szczelinie synaptycznej na złączy nerwowo-mięśniowym (117). Autoprzeciwciała przeciwko receptorom dla ACh są wykrywane u większości pacjentów z miastenią, są uważane za bezpośrednio patogenne, bardzo rzadko występują u osób zdrowych lub w innych jednostkach chorobowych. Osłabienie mięśni w miastenii jest spowodowane utratą receptorów dla ACh w złączy nerwowo-mięśniowym, prawdopodobnie również morfologicznym uszkodzeniem płytki motorycznej. W konsekwencji depolaryzacja postsynaptyczna nie osiąga krytycznego progu pobudzenia do otwarcia bramkowanych napięciowo kanałów sodowych i zainicjowania potencjału czynnościowego we włóknie mięśniowym. U poszczególnych pacjentów, miano przeciwciał przeciw receptorom ACh koreluje z nasileniem objawów, natomiast miano przeciwciał bardzo różni się między pacjentami i na ich podstawie nie można oceniać nasilenia choroby (117).

Odkrycia w zakresie roli autoprzeciwciał w patogenezie miastennii były kluczowe dla poznania kolejnych kanałopatii o podłożu autoimmunologicznym. Kolejnym poznany zaburzeniem o podłożu autoimmunologicznym, w którym osłabienie mięśni stanowi dominujący objaw, jest zespół miasteniczny Lamberta-Eatona (LEMS). LEMS to rzadkie, autoimmunologiczne zaburzenie złącza nerwowo-mięśniowego, które jest związane z utratą funkcjonalnych kanałów wapniowych typu P/Q (VGCCs, ang. voltage-gated calcium channels) na presynaptycznych zakończeniach nerwowych. W około 60% przypadków występuje jako zaburzenie paranowotworowe, najczęściej u pacjentów z drobnokomórkowym rakiem płuca, pozostałe przypadki mają etiologię idiopatyczną. U pacjentów z tym schorzeniem obserwuje się postępujące osłabienie mięśni proksymalnych, któremu często towarzyszy ogólne zmęczenie i objawy autonomiczne (118). Objawy kliniczne LEMS bardzo często poprzedzają wykrycie drobnokomórkowego raka płuca, dlatego ważne jest staranne prowadzenie badań przesiewowych w kierunku nowotworu po rozpoznaniu LEMS, w 96% przypadków drobnokomórkowy rak płuca był rozpoznawany w ciągu roku (119).

Duże znaczenie dla rozwoju neuroimmunologii miało odkrycie, że u pacjentów z zapaleniem nerwów wzrokowych i rdzenia kręgowego (NMO, ang. neuromyelitis optica), chorobie cechującej się zmianami demielinizacyjnymi w rdzeniu kręgowym i nerwach wzrokowych, występują autoprzeciwciała przeciwko akwaporynie 4 (AQP4), co pozwoliło na wyróżnienie tej jednostki chorobowej od stwardnienia rozsianego (120). Kolejnym istotnym krokiem była identyfikacja przeciwciał skierowanych przeciw receptorom NMDA, które wywołują autoimmunologiczne zapalenie mózgu (95), co przyniosło nowe spojrzenie na całą grupę zaburzeń OUN. Opisano kolejne autoprzeciwciała i związane z nimi zaburzenia układu nerwowego, okazało się, że autoimmunologiczne zapalenia mózgu są co najmniej równie powszechne jak zapalenia o podłożu infekcyjnym (121). Jest wysoce prawdopodobne, że w następnych latach zostaną odkryte kolejne autoprzeciwciała związane z chorobami neurologicznymi.

1.2.7. Przeciwciała przeciwneuronalne

Przeciwciała przeciwneuronalne są klasyfikowane na podstawie lokalizacji komórkowej ich docelowych antygenów, wewnątrzkomórkowej (przeciwciała onkoneuronalne, ONA, ang. onconeural antibodies) lub na powierzchni komórek (przeciwciała przeciw neuronalnym antygenom powierzchniowym, NSAbs, ang. neuronal surface antibodies).

ONA, których występowanie często związane jest z nowotworami, wiążą się z antygenami jądrowymi lub cytoplazmatycznymi (np. Hu, Ma i Yo), wywoływane przez nie zaburzenia neurologiczne są przede wszystkim mediowane przez cytotoksyczne limfocyty T, a przeciwciałom przypisuje się rolę biomarkera toczącego się procesu nowotworowego. Ta grupa zaburzeń słabo reaguje na immunoterapię i cechuje się złym rokowaniem. Charakterystyka najistotniejszych klinicznie przeciwciał ONA jest zawarta w **Tabeli III**.

Tabela III. Charakterystyka najistotniejszych klinicznie przeciwciał onkoneuronalnych

Przeciwciało	Rok identyfikacji	Zespół/objawy kliniczne	Związek z nowotworem
anty-Hu	1985	Neuropatia czuciowa, gastropareza, limbiczne zapalenie mózgu, zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego	Drobnokomórkowy rak płuca
anty-Yo	1990	Paranowotworowe zwyrodnienie mózdzku	Rak jajnika, rak trzonu macicy, rak piersi
anty-CV2	1996	Paranowotworowe zwyrodnienie mózdzku, limbiczne zapalenie mózgu, poliradikuloneuropatia, retinopatia, mielopatia	Drobnokomórkowy rak płuca, grasiczak
anty-Ri	1991	Opsoklonie/mioklonie, paranowotworowe zwyrodnienie mózdzku, dystonia, parkinsonizm	Rak piersi, drobnokomórkowy rak płuca
anty-Ma2/Ta	1999	Limbiczne zapalenie mózgu, zapalenie pnia mózgu	Nowotwór germinalny jąder, niedrobnokomórkowy rak płuca

anty- amfifizyna	1993	Zespół sztywnego człowieka, limbiczne zapalenie mózgu, poliradikuloneuropatia, mielopatia	Rak piersi, drobnokomórkowy rak płuca
-----------------------------	------	--	---

Źródło: Sechi E, Flanagan EP. Antibody-Mediated Autoimmune Diseases of the CNS: Challenges and Approaches to Diagnosis and Management. *Front Neurol.* 2021;12:673339. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.673339> (116)

Przeciwciała NSAbs rzadziej mają związek z nowotworem, są bezpośrednio patogenne po związaniu się z antygenami docelowymi [np. przeciwciała przeciw receptorowi N-metylo-D-asparaginowemu (anty-NMDAR), przeciwciała przeciw receptorom kwasu γ -aminomasłowego (anty-GABAR), przeciwciała przeciwko receptorowi kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (anty-AMPAR), przeciwciała przeciw metabotropowemu receptorowi glutaminianu-5 (anty-mGluR5), przeciwciała przeciw białku związanemu z kontaktyną, typu 2 (CASPR2)] i zwykle dobrze reagują na immunoterapię (116). W tej grupie możemy dalej wyodrębnić przeciwciała przeciw receptorom jonotropowym [NMDAR, AMPAR, GABAAR, GlyR (receptor glicyny)], kanałom jonowym [DPPX (białko podobne do peptydazy dipeptydylowej, typu 6), VGCCs (kanały wapniowe zależne od potencjału)], receptorom metabotropowym [GABABR, mGluR1 i mGluR5 (metabotropowy receptor glutaminianu 1 i 5)], białkom związanym z adhezją komórkową lub organizacją synaps [Caspr2, LGI1 (białko bogate w leucynę nieaktywne w glejakiach, typu 1)] (122). NSAbs są rzadko wykrywane u osób zdrowych, częstość ich detekcji za pomocą standardowych testów wynosi średnio 0,23%, co sugeruje ich wysoką specyficzność oraz dużą przydatność diagnostyczną (123). Charakterystyka najczęściej występujących NSAbs została zawarta w **Tabeli IV**.

Tabela IV. Charakterystyka najczęściej wykrywanych przeciwciał przeciw antygenom powierzchniowym

Przeciwciało	Rok identyfikacji	Zespół/objawy kliniczne	Związek z nowotworem
Anty-NMDAR	2007	Limbiczne zapalenie mózgu, zaburzenia zachowania, psychoza, amnezja, napady padaczkowe, dysautonomia	Teratoma jajnika (20–40%)
Anty-LGI1	2010	Limbiczne zapalenie mózgu, zaburzenia funkcji poznawczych, napady padaczkowe, dystonia twarzowo-ramieniowa, neuromiotonia	Grasiczak (<10%)
Anty-AMPA	2009	Limbiczne zapalenie mózgu, zaburzenia pamięci, napady padaczkowe	Drobnokomórkowy rak płuca, rak piersi, rak jajnika (~50%)
Anty-CASPR2	2010	Limbiczne zapalenie mózgu, neuromiotonia, zespół Morvana, ból neuropatyczny	Grasiczak (<10%)
Anty-GABAAR	2014	Napady padaczkowe, psychoza	Grasiczak, drobnokomórkowy rak płuca, chłoniak niezwojnowy (<20%)
Anty-GABABR	2010	Limbiczne zapalenie mózgu, zaburzenia pamięci, napady padaczkowe	Drobnokomórkowy rak płuca (~50%)
Anty-mGluR5	2011	Limbiczne zapalenie mózgu, zaburzenia pamięci, splątanie, psychoza	Chłoniak Hodgkina
Anty-GlyR	2008	Zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego, sztywność, mioklonie, zespół sztywnego człowieka, napady padaczkowe	Grasiczak, chłoniak (<10%)

Źródło: Prüss H. Autoantibodies in neurological disease. Nat Rev Immunol. 2021;21(12):798-813. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00543-w> (124)

Choroby neurologiczne związane z występowaniem przeciwciał przeciwn neuronalnych charakteryzują się szerokim zakresem objawów klinicznych, takich jak upośledzenie pamięci, zaburzenia zachowania, psychoza, drgawki, zaburzenia ruchowe lub dysfunkcje wegetatywne.

Ryzyko rozwoju autoimmunizacji wobec antygenów neuronalnych jest związane z dysregulacją centralnej i obwodowej negatywnej selekcji limfocytów B, z potencjalnie zaburzonymi mechanizmami tolerancji, w tym delecji klonalnej, edycji receptora limfocytów B (BCR) i anergii (124). U pacjentów z NMO obserwuje się podwyższoną częstość autoreaktywnych limfocytów B, które niedawno wyemigrowały ze szpiku kostnego, wskazuje to na zaburzenia tolerancji centralnej (125). Punkty kontrolne tolerancji obwodowej, które występują podczas dojrzewania limfocytów B w śledzionie oraz po aktywacji przez antygen, w ośrodkach rozmnażania grudek chłonnych, nie są w pełni poznane. W ośrodkach rozmnażania grudek chłonnych limfocyty B podlegają klonalnej proliferacji, zmianie klasy i dojrzewaniu powinowactwa wytwarzanych przeciwciał i stają się limfocytami B pamięci lub komórkami plazmatycznymi (128). U pacjentów z zapaleniem mózgu z przeciwciałami anti-GABAAR (129), przeciwciałami anti-LGI1 (130) lub z NMO (125), limfocyty B pamięci i komórki plazmatyczne wykazują rozległą hipermutację somatyczną. Natomiast przeciwciała u pacjentów z zapaleniem mózgu anti-NMDAR są często niezmutowane. "Mutacja wsteczna" autoprzeciwciał anti-NMDAR do sekwencji germinalnych nie powodowała utraty zdolności wiązania z antygenem (131), do czego dochodziło w przypadku przeciwciał anti-LGI1 (130) i anti-AQP4 (125). Prawdopodobnie, somatyczne hipermutacje prowadzą do autoreaktywności przeciwko LGI1 i AQP4 de novo, z nieautoreaktywnych prekursorów limfocytów B. Przeciwciała anti-AQP4 po mutacji wstecznej traciły zdolność wiązania z AQP4, ale nadal były autoreaktywne i polireaktywne, co sugeruje, że pochodziły z puli autoreaktywnych naiwnych limfocytów B, związanych z wadliwymi mechanizmami tolerancji (124).

Autoprzeciwciała przeciwn neuronalne są wysoce specyficzne wobec rozpoznawanych antygenów, w przypadku przeciwciał skierowanych przeciw receptorom jonotropowym, istnieje na ogół silna preferencja dla specyficznych podjednostek receptora, np. autoprzeciwciała anti-NMDAR rozpoznają podjednostkę GluN1, powodując internalizację tych receptorów, inne podtypy NMDAR, pozbawione podjednostki GluN1 nie są rozpoznawane przez autoprzeciwciała (132). Podobnie, receptory GABAAR i GlyR cechuje różnorodność podjednostek składowych, a

autoprzeciwciała przeciwn neuronalne wiążą się w OUN tylko z określonymi podjednostkami (122).

Patogenne oddziaływanie autoprzeciwciał na układ nerwowy zachodzi na drodze zróżnicowanych mechanizmów. W przypadku przeciwciał przeciwko receptorom jonotropowym powszechnie jest sieciowanie (łączenie krzyżowe) i internalizacja receptorów, np. przeciwciała anty-NMDAR powodują szybkie zmniejszenie liczby receptorów NMDAR na powierzchni neuronów w mechanizmie ich internalizacji (133). Aktywacja dopełniacza wydaje się mieć znaczenie tylko w kilku typach autoimmunologicznych encefalitów (124). Autoprzeciwciała mogą też wywoływać bezpośrednie pobudzanie lub hamowanie receptorów, np. przeciwciała anty-GABABR nie zmieniały ekspresji receptorów synaptycznych, ale blokowały ich funkcję (134), podobny mechanizm patogenności stwierdzono także w przypadku blokowania przez autoprzeciwciała receptora GlyR (135). Przeciwciała mogą także zaburzać interakcje białko-białko zakłócając prawidłowe funkcjonowanie neuronów, np. przeciwciała anty-LGI1 blokują interakcję LGI1 z jego receptorami ADAM22 i ADAM23, zakłócając transsynaptyczny kompleks białkowy ADAM22-ADAM23 (130). Autoprzeciwciała skierowane przeciw antygenom glejowym [np. MOG (glikoproteina mieliny i komórek gleju skąpodrzewiastego), AQP4, GFAP (kwaśne białko włókienkowe gleju)] są głównie związane z demielinizacją w OUN i zapaleniem okołonaczyniowym, ale także mogą pośrednio prowadzić do ubytku neuronów poprzez uszkodzający wpływ na ich docelowe komórki - oligodendrocyty lub astrocyty (116). W przypadku przeciwciał anty-MOG oraz przeciwciał anty-AQP4 stwierdzono istotną rolę cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał, wiązanie przeciwciała IgG z receptorem na fagocytach i komórkach NK prowadzi do degranulacji i zniszczenia struktury, z którą związało się przeciwciało (124).

1.2.8. Autoimmunologiczne zapalenia mózgu

Autoimmunologiczne zapalenie mózgu jest jedną z najczęstszych form zapalenia mózgu o etiologii nieinfekcyjnej, wywołaną przez autoprzeciwciała skierowane przeciw antygenom neuronalnym, takim jak struktury powierzchniowe, np. receptory lub kanały jonowe (przeciwciała przeciw neuronalnym antygenom powierzchniowym, NSAbs) lub antygeny wewnątrzkomórkowe (przeciwciała onkoneuronalne, ONA) (136).

Spektrum rozpoznawanych przypadków autoimmunologicznych zapaleń mózgu gwałtownie zwiększyło się w ostatnich piętnastu latach, w dużej mierze dzięki

zidentyfikowaniu wielu nowych przeciwciał przeciwneuronalnych. W związku z tym diagnoza autoimmunologicznego zapalenia mózgu stanowi istotne wyzwanie ze względu na szeroki zakres objawów klinicznych, objawy, które często naśladują klasyczne choroby psychiatryczne, oraz niespecyficzną prezentację w badaniach dodatkowych, np. możliwy brak nieprawidłowości w obrazowaniu MRI mózgu, niespecyficzne wyniki badań elektroencefalograficznych (EEG) oraz brak zidentyfikowanych przeciwciał przeciwneuronalnych we krwi lub płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) u części pacjentów. Wczesne rozpoznanie jest kluczowe z uwagi na możliwość leczenia przyczynowego i osiągnięcia pełnego wyleczenia (137).

Objawy kliniczne autoimmunologicznego zapalenia mózgu są bardzo zróżnicowane i w dużej mierze zależą od rodzaju przeciwciał przeciwneuronalnych i ich specyficznych antygenów docelowych. Cechy kliniczne obejmują ostry lub podostry początek, szybko postępujących objawów neurologicznych i neuropsychiatrycznych, zaburzenia funkcji poznawczych, ruchy mimowolne, napady padaczkowe, zaburzenia snu, niestabilność autonomiczną i zaburzenia świadomości (138). Przeciwciała przeciwneuronalne mają też istotne znaczenie w diagnostyce pacjentów psychiatrycznych, w wielu przypadkach zaburzenia psychiatryczne związane z autoprzeciwciałami nie wiążą się z występowaniem klarownych objawów leżącego u podstaw zapalenia mózgu (139).

Zgodnie z kryteriami diagnostycznymi możliwego autoimmunologicznego zapalenia mózgu, w rekomendacjach z 2016 r. (136), diagnoza może być postawiona, gdy spełnione są wszystkie trzy poniższe kryteria:

1. Podostry początek (szybki postęp objawów, trwający krócej niż 3 miesiące) deficytów pamięci operacyjnej (utrata pamięci krótkotrwałej), zaburzeń stanu psychicznego lub objawów psychiatrycznych.
2. Co najmniej jedno z następujących:
 - Napady padaczkowe, których nie można wytłumaczyć wcześniej rozpoznaną padaczką
 - Pleocytoza PMR (liczba leukocytów większa niż pięć komórek na mm³)
 - Obraz MRI sugerujący zapalenie mózgu
3. Wykluczenie alternatywnych przyczyn.

Do alternatywnych przyczyn, które należy wziąć pod uwagę zaliczamy etiologię infekcyjną (wirusowe zapalenie mózgu, zakażenia grzybicze, gruźlica), choroby

reumatyczne (SLE, choroba Behçeta), zaburzenia toksyczno-metaboliczne (nadużywanie substancji psychoaktywnych, encefalopatia Wernickego), zaburzenia naczyniowe (zespół odwracalnej tylnej leukoencefalopatii), choroby nowotworowe (leptomeningitis, glejak, pierwotny lub wtórny chłoniak mózgu), szybko postępujące choroby neurodegeneracyjne (choroba Creutzfeldta-Jakoba), pierwotne choroby psychiczne (schizofrenia, zaburzenia afektywne), zaburzenia mitochondrialne (MELAS), choroby metaboliczne (encefalopatia Hashimoto), zapalenie naczyń, złośliwy zespół neuroleptyczny i zespół serotoninowy (137).

Postępowanie w przypadku rozpoznania autoimmunologicznego zapalenia mózgu powinno obejmować diagnostykę w kierunku toczącego się procesu nowotworowego i ewentualnie jego leczenie oraz immunoterapię. Najczęściej początkowo włączane jest leczenie steroidami (metyloprednizolon, 1000 mg dziennie przez 3-5 dni, następnie doustna steroidoterapia) oraz dożylnymi immunoglobulinami (IVIg, 2 g/kg w ciągu 3-5 dni) lub plazmaferezami. W przypadku zaburzeń z autoprzeciwciałami klasy IgG4 (LGI1 lub Caspr2) zmniejszanie dawki steroidów powinno być bardzo powolne, a IVIg mogą być nieprzydatne. W leczeniu stosuje się także rytuksymab oraz cyklofosfamid (122).

Najczęściej występujące postacie autoimmunologicznego zapalenia mózgu:

1. Zapalenie mózgu z przeciwciałami anty-NMDAR

Zapalenie mózgu z przeciwciałami anty-NMDAR występuje najczęściej u młodych kobiet, mediana wieku wynosi 20 lat, choć dotknięte mogą też być małe dzieci, mężczyźni i osoby starsze. Klasycznie choroba manifestuje się objawami psychotycznymi, zaburzeniami pamięci, trudnościami w uczeniu się i zapamiętywaniu nowych informacji, napadami padaczkowymi, w bardziej zaawansowanych przypadkach rozwijają się zaburzenia ruchowe, dystonia, w ciężkich przypadkach katatonia oraz śpiączka z zaburzeniami autonomicznymi i niestabilnością ciśnienia tętniczego i rytmu serca. W przeciwieństwie do zapaleń mózgu spowodowanych przez inne autoprzeciwciała, to zaburzenie występuje relatywnie często u dzieci, które stanowią około połowę pacjentów (122). Objawy u dzieci są generalnie podobne do tych u dorosłych, choć istnieją pewne cechy szczególne. U dzieci częściej niż u dorosłych występują zaburzenia ruchowe, takie jak dystonia, częściej również występują napady padaczkowe. Wczesnym objawem może być niepewny chód, który rzadko obserwuje się u dorosłych, oraz regresja mowy lub mutyzm. U dzieci istnieje także większe ryzyko

trwałych zaburzeń rozwoju poznawczego (140). U około połowy pacjentek stwierdza się potworniaka jajnika, inne rodzaje nowotworów zdarzają się rzadko.

2. Zapalenie mózgu z przeciwciałami anti-LGI1

Zapalenie mózgu wywołane przez przeciwciała anti-LGI1 jest drugim pod względem częstości występowania rodzajem autoimmunologicznego zapalenia mózgu, występuje głównie u osób w wieku dojrzałym, mediana wieku wynosi 60 lat, częściej u mężczyzn, którzy stanowią około 2/3 pacjentów (141). Typowymi objawami są zaburzenia funkcji poznawczych i napady padaczkowe, choroba rozwija się w sposób podostry, w niektórych przypadkach przez kilka miesięcy, przez co objawy bywają mylnie rozpoznawane jako otępienie, opóźniając właściwą diagnozę (142). Charakterystyczne dla tej choroby są napady padaczkowe o typie napadów dystonicznych twarzowo-ramiennych (FBDS, ang. faciobrachial dystonic seizures), które manifestują się jako kilkusekundowe epizody jednostronnych ruchów ramienia, barku i twarzy. FBDS mogą stanowić pierwszy objaw zapalenia mózgu wywołanego przez przeciwciała anti-LGI1, a pacjenci mogą mieć nawet setki napadów dziennie. Napady słabo reagują na leczenie przeciwpadaczkowe, ale szybko ustępują po włączeniu immunoterapii, szczególnie efektywne jest leczenie steroidami (122).

3. Zapalenie mózgu z przeciwciałami anti-AMPA

Choroba jest znacznie rzadsza niż zapalenie mózgu z przeciwciałami anti-NMDAR, średnia wieku chorych jest wyższa (ok. 60 lat), współistniejące nowotwory to najczęściej rak płuca, rak piersi lub grasiczak, rzadko potworniak jajnika. Najczęstszymi objawami zapalenia mózgu z przeciwciałami anti-AMPA są dezorientacja, zaburzenia pamięci, halucynacje, urojenia, pobudzenie i napady padaczkowe, powszechna jest także hiponatremia. Nierzadko, u pacjentów występuje także niedowład połowiczny i spastyczność.

4. Zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego z przeciwciałami anti-GlyR

Przeciwciała przeciwko GlyR są związane z zespołem PERM (postępujące zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego ze sztywnością i miokloniami, ang. Progressive Encephalomyelitis with Rigidity and Myoclonus). Pacjenci, najczęściej osoby w średnim wieku, prezentują sztywność mięśni osiowych i kończyn, wygórowane reakcje na bodźce, częste upadki, zaburzenia gałkoruchowe, zaburzenia poznawcze, napady padaczkowe. U części chorych stwierdza się współistnienie nowotworów, m.in. grasiczaka lub chłoniaka.

Zespół PERM związany z przeciwciałami anti-GlyR wykazuje podobieństwo do zespołu sztywnego człowieka z przeciwciałami anti-GAD65. Pacjenci z przeciwciałami anti-GlyR mają szybszą progresję objawów, większe prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń gałkoruchowych oraz zaburzeń poznawczych, ale z drugiej strony to zaburzenie często bardzo dobrze odpowiada na immunoterapię, co nie jest typowe dla przeciwciał anti-GAD65.

5. Zapalenie mózgu z przeciwciałami anti-GABAAR

Autoprzeciwciała przeciwko GABAAR wywołują zapalenie mózgu charakteryzujące się ciężkimi napadami padaczkowymi i zmianami w obrazie MRI mózgu w postaci obszarów hiperintensywnych w sekwencji T2, zlokalizowanych korowo i podkorowo. Choroba najczęściej dotyka dzieci i młodych dorosłych, występują różne rodzaje napadów, które są zwykle odporne na leczenie przeciwpadaczkowe, może także rozwinąć się zespół sztywnego człowieka lub zespół opsoklonie-mioklonie. Pacjenci zwykle reagują pozytywnie na terapię immunologiczną, która prowadzi również do ustępowania zmian w MRI mózgu.

1.2.9. Zespoły paraneoplastyczne

Za początek badań nad zespołami neurologicznymi u chorych z nowotworami można uznać opisanie w 1938 roku przez Brouwer i Biemond przypadku pacjentki z degeneracją mózdzku i rakiem jajnika, autorzy postulowali, że zwyrodnienie mózdzku może być związane z nowotworem zlokalizowanym w innym miejscu ciała (137). W 1981 roku Newsom-Davis wykazał autoimmunologiczny mechanizm neurologicznych zaburzeń paranowotworowych poprzez skuteczne leczenie trzech przypadków zespołu LEMS za pomocą wymiany osocza i immunosupresji steroidami (143).

Neurologiczne zespoły paranowotworowe stanowią objawy ze strony ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, złącza nerwowo-mięśniowego lub mięśni szkieletowych, spowodowane pośrednim wpływem choroby nowotworowej. Wynikają z odpowiedzi immunologicznej kierowanej przeciwko komórkom nowotworowym, które mogą wykazywać ekspresję antygeny neuronalnego, a powstające limfocyty T i autoprzeciwciała wchodzą w reakcję krzyżową z tkanką nerwową. Autoprzeciwciała zazwyczaj nie są bezpośrednio patogenne, ponieważ najczęściej są skierowane przeciw antygenom wewnątrzkomórkowym, uważa się, że cytotoksyczność limfocytów T jest bardziej prawdopodobnym mechanizmem odpowiedzialnym za

uszkodzenie układu nerwowego (117). Do najczęstszych zespołów klinicznych należą podostra neuronopatia czuciowa, zwyrodnienie mózdzku i limbiczne zapalenie mózgu. Nowotwory złośliwe, które najczęściej występują w powiązaniu z neurologicznymi zespołami paranowotworowymi to drobnokomórkowy rak płuca, rak piersi i rak jajnika.

1.2.10. Autoprzeciwciała w chorobach neurodegeneracyjnych

Autoprzeciwciała są wykrywane u pacjentów z powoli postępującym pogorszeniem funkcji poznawczych lub zaburzeniami ruchowymi naśladującymi klasyczne choroby neurodegeneracyjne. W tej grupie znajdują się zarówno przypadki, gdy objawy są spowodowane przez autoprzeciwciała, a nietypowe objawy kliniczne, naśladujące chorobę neurodegeneracyjną, prowadzą do opóźnienia diagnozy i nieprawidłowego leczenia, ale także sytuacje, gdy potwierdzona i pewna jest diagnoza klasycznych chorób neurodegeneracyjnych, a autoprzeciwciała mogą rozwijać się wtórnie (124).

Przeciwciała anty-LGI1 mogą wywoływać encefalopatię o obrazie klinicznym choroby Alzheimer (144), a przeciwciała specyficzne wobec napięciowych kanałów potasowych mogą prowadzić do objawów przypominających otępienie czołowo-skroniowe (145), przeciwciała przeciw receptorom GABAB mogą powodować objawy naśladujące stwardnienie zanikowe boczne (ALS) (146). Autoprzeciwciała (anty-Hu, anty-GABAB1/B2R, anty-NMDAR, anty-Caspr2) w PMR i autoimmunologiczne zapalenie mózgu w badaniu autopsyjnym były wykrywane u pacjentów, u których podejrzewano chorobę Creutzfeldta-Jakoba (147).

1.3. Zaburzenia immunologiczne w chorobie Wilsona

Wiedza dotycząca statusu immunologicznego pacjentów z chW pozostaje wciąż mocno ograniczona. W związku z mechanizmem choroby, związanym z gromadzeniem się nadmiaru miedzi w organizmie, można się spodziewać bezpośredniego, toksycznego wpływu miedzi na układ odpornościowy, a także wpływu uszkodzenia wątroby, typowego dla chW, oraz skutków ubocznych stosowanego leczenia.

Badania nad stanem immunologicznym pacjentów z chW przeprowadzone w latach 70-tych wykazały nieprawidłowości immunologiczne u wcześniej nieleczonych pacjentów z chW. Obserwowano nasilenie odpowiedzi humoralnej, podwyższony

poziom IgG i IgM, podwyższone miano przeciwciał skierowanych przeciw antygenowi Kunina, a także osłabienie odporności komórkowej, osłabienie odpowiedzi na 1-chloro-2,4-dinitrobenzen i *Escherichia coli* w testach skórnych, osłabienie transformacji limfocytów po stymulacji konkanawaliną A (Con A), oczyszczoną pochodną białkową tuberkuliny (PPD), *Candida albicans* i streptokinazą oraz mniejszą syntezę czynnika hamującego migrację makrofagów (MIF, ang. macrophage migration inhibitory factor). Podobne, lecz mniej nasilone, zaburzenia odpowiedzi immunologicznej były obserwowane u pacjentów z marskością wątroby z innych przyczyn. Leukocyty pacjentów z chW wykazywały osłabione zdolności bakteriobójcze, a w testach *in vitro* obecność jonów miedzi oddziaływała hamująco na parametry odporności komórkowej (148). Po leczeniu D-p odpowiedź immunologiczna w dużej mierze uległa normalizacji, co może być spowodowane poprawą funkcji wątroby i zmniejszeniem poziomu toksycznej wolnej miedzi (149).

Miedź, podobnie jak większość innych pierwiastków śladowych, posiada aktywność biologiczną jako kofaktor dla wielu enzymów, np. dysmutazy ponadtlenkowej Cu,Zn-SOD, oksydazy cytochromu c, Cp, β -hydroksylazy dopaminy, tyrozyminy, aminooksydazy. Przy niedoborze miedzi obserwuje się neutropenię, niższa jest także liczba limfocytów T, a ich proliferacja indukowana mitogenami jest upośledzona, podobnie upośledzona jest funkcja limfocytów B i komórek NK (150). Miedź jest niezbędna do indukowanego stresem uwalniania czynnika wzrostu fibroblastów 1 (FGF-1) i interleukiny 1 α (IL-1 α), a także transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β), czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α) i interleukiny 1 β (IL-1 β) (151) (152).

W chW mutacja w genie *ATP7B* powoduje dodatni bilans miedzi oraz jej gromadzenie w tkankach, w konsekwencji dochodzi do uszkodzenia oksydacyjnego wywołanego przez miedź. Nadmiar miedzi wiąże się także z wzrostem poziomu cytokin i odpowiedzią zapalną nasilającą uszkodzenie tkanek (153). Uważa się, że neurozapalenie może odgrywać ważną rolę w patogenezie chW (154) (155). Chociaż OUN często uważano za uprzywilejowany immunologicznie i izolowany od obwodowego układu odpornościowego, mediatory immunologiczne uwalniane na obwodzie mogą przenikać przez barierę krew-mózg (BBB, ang. blood-brain barrier) (156), wykazując bezpośrednią neurotoksyczność i prowadząc do aktywacji mikrogleju i astrocytów (157). U pacjentów z chW stwierdzono w surowicy podwyższony poziom interleukiny 6 (IL-6), TNF- α i interferonu gamma (IFN- γ), co może wskazywać na trwający proces zapalny. Nie

odnotowano istotnego statystycznie związku między stężeniem badanych cytokin w surowicy, a nasileniem objawów chW (153).

Uszkodzenie wątroby, o różnym stopniu nasilenia, jest typowe dla chW. Wątroba, poza rolą w procesach metabolicznych i detoksyfikacyjnych, pełni także istotne funkcje immunologiczne, kluczowe znaczenie mają wytwarzanie białek osocza oraz prezentacja antygenów limfocytom T (158). Choroby wątroby wiążą się z zaburzeniami procesów odpornościowych. Według Prytz i wsp., istnieje korelacja między uszkodzeniem wątroby a wysokim poziomem przeciwciał w surowicy krwi u pacjentów z marskością wątroby, co ma związek ze zmniejszonym usuwaniem antygenów (159). Zaawansowana marskość wątroby, niezależnie od etiologii, prowadzi do dysfunkcji układu immunologicznego, obniżonej odporności i ogólnoustrojowej reakcji zapalnej. Dochodzi do aktywacji krążących komórek układu odpornościowego oraz podwyższenia poziomu cytokin prozapalnych w surowicy, co wynika ze stymulacji przez DAMPs (struktury molekularne związane z uszkodzeniem, ang. damage-associated molecular patterns), uwolnione z podlegających martwicy hepatocytów oraz PAMPs (struktury molekularne związane z patogenem, ang. pathogen-associated molecular patterns), uwalniane w przewodzie pokarmowym (160).

Ponadto, D-p, powszechnie stosowana w leczeniu chW, jest zaliczana do leków, które mogą indukować syntezę autoprzeciwciał. Istnieją doniesienia, wskazujące na indukcję przez D-p syntezy przeciwciał ANA, ANCA, anti-MuSK i anti-ACHR (161) (162) (163). Opisywano, związane z terapią D-p, przypadki toczenia i wielu innych chorób autoimmunologicznych, w tym miastenii, pemfigoidu, błoniastego kłębuszkowego zapalenia nerek, zapalenia wielomięśniowego i zapalenia skórno-mięśniowego (164). W badaniach na modelu zwierzęcym obserwowano, że D-p wywoływała aktywację makrofagów poprzez interakcję z grupami aldehydowymi (165), eksperymentalne obniżenie liczby makrofagów znacząco zmniejszało częstość występowania choroby autoimmunologicznej. Takrolimus, inhibitor limfocytów T, może zapobiegać wystąpieniu choroby autoimmunologicznej, odwrócić trwający proces chorobowy i zapobiega nawrotom choroby po ponownej ekspozycji na D-p w modelu mysim, co wskazuje na udział limfocytów T w mechanizmie tych zaburzeń. Prawdopodobnie, interakcja obu typów komórek jest ważna w wywoływaniu przez D-p chorób autoimmunologicznych (166). Istnieją także dane z badań eksperymentalnych wskazujące na istotne znaczenie limfocytów Th17 w rozwoju indukowanych przez D-p zaburzeń autoimmunologicznych (167).

2. Założenia i cele pracy

Choroba Wilsona wykazuje duże zróżnicowanie fenotypowe, zarówno pod względem charakteru i nasilenia objawów klinicznych, wieku ich wystąpienia oraz reakcji na zastosowane leczenie. Przyczyny tej zmienności nadal pozostają niejasne. Choć choroba ma podłoże jednogenne, to bezpośrednie korelacje genotyp-fenotyp są trudne do uchwycenia (26), w związku z tym prawdopodobne jest znaczenie interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi, metabolicznymi i dietetycznymi (168). W ostatnich latach mechanizmy zmienności fenotypowej w chW stały się przedmiotem dużego zainteresowania.

Minione dekady, wraz z intensywnym rozwojem neuroimmunologii, dostarczyły dowodów na istotną rolę układu immunologicznego w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, zarówno poprzez rozwój reakcji zapalnej, jak i odpowiedzi autoimmunologicznej. U pacjentów z zaburzeniami neurodegeneracyjnymi, w tym chorobą Alzheimera i chorobą Parkinsona zidentyfikowano autoprzeciwciała o swoistości wobec antygenów neuronalnych (169) (170). Pozostaje niejasne czy ta aktywacja układu immunologicznego bierze udział w patogenezie zaburzeń neurologicznych czy jest zjawiskiem wtórnym, odpowiedzią na uszkodzenie tkanek układu nerwowego.

W leczeniu chW stosowane są leki, które powodują usuwanie nadmiaru miedzi z organizmu, terapia musi być stosowana dożywotnio i ściśle monitorowana. Stosowane leki, szczególnie D-p, wiążą się z ryzykiem rozwoju szeregu działań niepożądanych. Do działań niepożądanych D-p zaliczamy indukowanie zaburzeń autoimmunologicznych, opisano przypadki tocznia indukowanego lekami, zapalenia naczyń, miastenii, kłębuszkowego zapalenia nerek, nabytego pęcherzowego oddzielania się naskórka (171) (172) (173) (174) (175). U pacjentów z chW leczonych D-p zaobserwowano podwyższone miana ANA, natomiast nie stwierdzono związku między obecnością ANA a objawami klinicznymi choroby oraz częstością jawnych klinicznie zaburzeń autoimmunologicznych (176).

Wiedza o zaburzeniach immunologicznych w chW jest nadal niepełna, a pytanie czy aktywacja układu immunologicznego, w tym reakcja autoimmunologiczna, ma związek z obrazem klinicznym i przebiegiem chW stanowi interesujące zagadnienie badawcze. Istotne jest również rozważenie możliwego związku stosowanego leczenia z

wytwarzaniem autoprzeciwciał oraz zasadności monitorowania autoprzeciwciał w kontrolowaniu bezpieczeństwa terapii u pacjentów z chW, zwłaszcza leczonych D-p.

Celami pracy są:

- 1) Zbadanie częstości występowania autoprzeciwciał (ANA, ANCA, NSAbs i ONA) u pacjentów z chW.
- 2) Określenie, czy istnieje zależność między obecnością autoprzeciwciał a objawami klinicznymi i przebiegiem chW.
- 3) Stwierdzenie, czy leczenie stosowane w chW wpływa na syntezę autoprzeciwciał i występowanie chorób o podłożu autoimmunologicznym.

3. Materiał i metody

3.1. Grupa badana

Do badania włączono grupę 88 pacjentów z chW, leczonych w II Klinice Neurologicznej Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie (IPiN), oraz grupę kontrolną 100 zdrowych ochotników.

Rozpoznanie chW było stawiane na podstawie laboratoryjnego potwierdzenia zaburzeń metabolizmu miedzi, obecności pierścienia Kaysera-Fleischera, analizy genetycznej w kierunku znanych mutacji genu *ATP7B*, a w przypadkach wątpliwych, także badania z miedzią radioaktywną ^{64}Cu , wykonywanego w IPiN, jak wcześniej opisywano (177).

Do oceny neurologicznej zastosowano część II i III skali Unified Wilson's Disease Rating Scale (UWDRS) (178). Skala UWDRS, skonstruowana do oceny klinicznej pacjentów z chW, składa się z trzech części obejmujących: stan świadomości (część I, pojedyncza pozycja), czynności dnia codziennego (na podstawie skali Barthela, część II, pozycje 2-11), oraz szczegółowe badanie neurologiczne (część III, pozycje 12-34). Maksymalna liczba punktów za pierwszą część wynosi 3 punkty, za drugą 39 punktów, a za ostatnią 143 punkty (178).

Na podstawie wyników badania klinicznego oraz badań dodatkowych (laboratoryjne próby wątrobowe, badanie ultrasonograficzne wątroby oraz MRI mózgu) pacjentów klasyfikowano do trzech grup w zależności od postaci klinicznej: wątrobowej, neurologicznej lub bezobjawowej (179).

Po postawieniu diagnozy włączano leczenie D-p lub ZS w standardowych dawkach, przy czym decyzja o wyborze leku była podejmowana indywidualnie przez lekarza prowadzącego i opierała się na doświadczeniu klinicznym oraz preferencjach pacjenta (180). Pacjenci włączeni do badania byli leczeni przez minimum 6 miesięcy. W podgrupie 36 pacjentów dostępne były również dane kliniczne oraz próbki surowicy pobrane w momencie rozpoznania choroby, przechowywane w banku materiału biologicznego, w Pracowni Neuroimmunologii IPiN.

Grupę kontrolną stanowiło 100 zdrowych ochotników dobranych pod względem wieku i płci, u których nie stwierdzono chW, chorób wątroby, chorób neurologicznych lub psychicznych, przewlekłych chorób zapalnych ani chorób zakaźnych.

Badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej, a od każdego uczestnika uzyskano świadomą pisemną zgodę. Komisja Etyczna IPiN zatwierdziła zarówno protokół badania, jak i formularz świadomej zgody (4/2018).

3.2. Pobieranie próbek i oznaczanie przeciwciał

Próbki krwi pobierane były podczas rutynowych badań, w czasie pobytu pacjentów w klinice lub w czasie kontrolnych wizyt ambulatoryjnych. Oceniany był wówczas stan kliniczny oraz wykonywane badania laboratoryjne (podstawowe badania oceniające morfologię krwi, funkcje wątroby i nerek oraz metabolizm miedzi).

Próbki krwi żyłnej do celów obecnego badania pobierano rano, po 30 minutach odwirowywano (15 minut, 18-25°C, 1500 x g), a do czasu badania przechowywano w temperaturze -70°C. Próbki surowicy były badane za pomocą standaryzowanych testów immunofluorescencji pośredniej (IIFT, ang. indirect immunofluorescence test) i Western Blot, przy użyciu komercyjnych zestawów zgodnie z protokołami producenta (Euroimmun, Lubeck, Niemcy).

Badano przeciwciała o następującej swoistości:

- ANA [nRNP / Sm, Sm, SSA, Ro-52, SSB, Scl-70, PM-Scl, PCNA, Jo-1, CENP-B, dsDNA, nukleosomy, histony, białko rybosomalne-P, przeciwciała przeciwmitochondrialne typu M2 (AMA-M2) i DFS-70] za pomocą techniki IIFT i Western blot;
- ANCA (pANCA i cANCA) za pomocą techniki IIFT;
- NSAbs (NMDAR, AMPA1R, AMPA2R, LGI1, CASPR2 i GABABR) - metodą IIFT;
- ONA (anty-Hu, anty-Yo, anty-Ri, anty-amfifizyna, anty-CV2, anty-Ma2/Ta, anty-rekoweryna, anty-SOX1, anty-Zic4, anty-tityna, anty-GAD65 i anty-Tr) - metodą Western blot.

Obecność autoprzeciwciał arbitralnie uznawano za dodatnią, jeśli wykrywano je w mianie:

- $\geq 1:10$ w przypadku ANCA i NSAbs,
- $\geq 1:100$ w przypadku ANA,
- wykrywalne w badaniu jakościowym (rozcieńczenie 1:101) w przypadku ONA.

3.3. Analiza statystyczna

Wyniki dla zmiennych jakościowych przedstawiono w postaci liczby i wartości procentowej. Zmienne ciągłe przedstawiono jako wartość średnią i odchylenie standardowe (SD) lub medianę i rozstęp międzykwartyłowy (IQR), w zależności od normalności rozkładu, ocenianej za pomocą testu Shapiro-Wilka. Zmienne ciągłe porównywano za pomocą testu t-Studenta lub testu U Manna-Whitneya w zależności od ich rozkładu (w przypadku porównania dwóch grup) lub testu Kruskala-Wallisa (w przypadku porównania trzech grup). Zmienne jakościowe poddawano analizie za pomocą testu Chi-kwadrat. Do porównania zmiennych zależnych wykorzystano, dla zmiennych ciągłych, zależnie od ich rozkładu, test t-Studenta dla zmiennych zależnych lub test Wilcoxon, a dla zmiennych jakościowych test McNemara. Poziom istotności przyjęty w niniejszej pracy wynosił $p < 0,05$. Obliczenia wykonano przy użyciu oprogramowania Statistica 13.1 (Dell Inc., Tulsa, OK, USA).

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka grupy badanej

Do badania włączono 88 pacjentów z chW, 40 mężczyzn (45,5%) i 48 kobiet (54,5%). U 58 osób (65,9%) występowała postać neurologiczna, u 24 osób (27,3%) postać wątrobową, natomiast 6 osób (6,8%) było bezobjawowych. Stan neurologiczny chorych z postacią neurologiczną, oceniany według skali UWDRS, wynosił średnio UWDRS II $9,05 \pm 1,78$ punktów i UWDRS III $31,09 \pm 4,28$ punktów. Średni wiek badanych to $38,4 \pm 10,7$ lat, który nie różnił się istotnie od osób z grupy kontrolnej (**Tabela V**). Średnia wieku pacjentów z postacią neurologiczną chW ($39,78 \pm 11,25$ lat) była wyższa niż pacjentów z postacią wątrobową ($32,75 \pm 8,84$ lat), $p=0,008$. Mediana wieku, w którym postawiono diagnozę wynosiła 28,00 lat (IQR=15,00), przy czym dla chorych z postacią neurologiczną rozpoznanie było stawiane później (mediana 29,00 lat, IQR=14,00), niż w przypadku pacjentów z postacią wątrobową (mediana 24,00 lata, IQR=11,00), $p=0,012$.

47 osób (53,4%) było leczonych D-p, a 41 osób (46,6%) ZS. Mediana czasu leczenia wynosiła dla całej grupy badanej 2,25 roku (IQR=8,17); 2,58 roku (IQR=3,50) w przypadku grupy leczonej D-p i 2,08 roku (IQR=9,92) dla grupy leczonej ZS, $p=0,664$. Nie obserwowano istotnej różnicy w długości czasu leczenia między podgrupami z neurologiczną (mediana 2,88 roku, IQR=8,63), wątrobową (mediana 2,08 roku, IQR=5,48) i bezobjawową (mediana 2,00 lata, IQR=0,00) postacią chW ($p=0,739$).

Zgodnie z oczekiwaniami u pacjentów z chW w badaniach laboratoryjnych stwierdzono nieprawidłowości świadczące o patologii wątroby. Transaminaza asparaginianowa (AST), transaminaza alaninowa (ALT), transpeptydaza gamma-glutamylowa (GGTP), bilirubina i INR były istotnie podwyższone w porównaniu z osobami zdrowymi (**Tabela VI**).

W wyodrębnionej podgrupie 36 pacjentów, dla których dysponowano danymi klinicznymi i próbkami surowicy uzyskanymi w trakcie stawiania rozpoznania oraz w trakcie terapii, 47,2% osób ($n=17$) przyjmowało D-p, mediana czasu leczenia wynosiła 2,00 lata (IQR=0,08); a 52,8% osób ($n=19$) otrzymywało ZS, mediana czasu leczenia to 2,00 lata (IQR = 0,25); $p=0,06$. Kontrolne badania laboratoryjne wykonane w trakcie leczenia wykazały istotną poprawę testów czynnościowych wątroby oraz parametrów hematologicznych (**Tabela VII**).

Współistniejące choroby autoimmunologiczne odnotowano w dokumentacji medycznej 4 pacjentów, u 3 osób stwierdzono niedoczynność tarczycy, a u 1 osoby reumatoidalne zapalenie stawów. W tej grupie dwie osoby były leczone D-p, dwie pozostałe ZS; trzy osoby miały objawy wątrobowe, a jedna objawy neurologiczne chW. W jednym przypadku choroba autoimmunologiczna była znana przed rozpoznaniem chW, a w pozostałych trzech przypadkach diagnoza była stawiana, gdy pacjenci byli w trakcie leczenia chW.

Mutację H1069Q wykryto u 84,1% pacjentów (n=74), 48,9% pacjentów (n=43) było homozygotami dla tej mutacji, 21,6% pacjentów (n=19) było heterozygotami złożonymi, a w 13,6% przypadków (n=12) wykryto mutację tylko na jednym allelu; u 14 pacjentów (15,9%) zidentyfikowano mutacje inne niż H1069Q (**Tabela VIII**).

Tabela V. Charakterystyka grupy badanej

	Pacjenci z chW, n=88	Grupa kontrolna, n=100	P
Wiek, lata	38,4 ± 10,7	37,6 ± 9,8	0,605
Płeć (mężczyźni)	40 (45,5%)	49 (49,0%)	0,627
Postać kliniczna chW			
Neurologiczna	58 (65,9%)	-	-
Wątrobowa	24 (27,3%)	-	
Asymptomatyczna	6 (6,8%)	-	
Leczenie			
D-p	47 (53,4%)	-	-
ZS	41 (46,6%)	-	-
Czas leczenia, lata			
Ogółem	2,25 (8,04)	-	-
D-p	2,58 (3,50)		
ZS	2,08 (9,92)		

Dane przedstawiono w postaci średniej i odchylenia standardowego lub mediany i rozstępu międzykwartylowego, lub liczby i wartości procentowej.

Skróty: chW, choroba Wilsona; D-p, D-penicylamina; ZS, siarczan cynku.

Tabela VI. Podstawowe parametry biochemiczne

	Pacjenci z chW, n=88	Grupa kontrolna, n=100	<i>p</i>
Leukocyty, x10⁹/l	4,91 (2,54)	6,20 (1,75)	0,001
Erytrocyty, x10⁹/l	4,67 (0,64)	4,60 (0,70)	0,526
Hemoglobina, g/dl	13,90 (1,90)	13,85 (2,00)	0,613
Hematokryt, %	40,80 (5,50)	41,25 (6,20)	0,135
Płytki krwi, x10⁹/l	160,56 ± 69,40	225,03 ± 39,27	0,000
ALP, IU/l	79,00 (33,30)	58,00 (19,00)	0,000
AST, IU/L	25,00 (16,10)	19,90 (7,25)	0,007
ALT, IU/L	25,70 (19,10)	16,20 (12,20)	0,009
GGTP, IU/L	27,70 (39,35)	16,10 (12,90)	0,002
Bilirubina, mg/dL	0,77 (0,53)	0,59 (0,29)	0,000
Kreatynina, mg/dl	0,78 (0,31)	0,79 (0,22)	0,288
Albumina, g/dl	4,24 (0,60)	4,79 (0,32)	0,000
INR	1,14 (0,17)	1,06 (0,09)	0,000
Żelazo, µg/dl	113,50 (74,00)	103,50 (52,00)	0,846
Ferrytyna, µg/l	76,00 (113,30)	47,50 (82,00)	0,103
TIBC, µg/dl	320,50 (87,50)	338,00 (53,50)	0,104

Dane przedstawiono w postaci mediany i rozstępu międzykwartyłowego lub średniej i odchylenia standardowego.

Skróty: ALP, fosfataza alkaliczna; AST, aminotransferaza asparaginianowa; ALT, aminotransferaza alaninowa; chW, choroba Wilsona; D-p, D-penicylamina; GGTP, transpeptydaza gamma-glutamylowa; INR, międzynarodowy współczynnik znormalizowany; TIBC, całkowita zdolność wiązania żelaza; ZS, siarczan cynku.

Wartości *p* oznaczone pogrubioną czcionką oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami <0,05.

Tabela VII. Parametry laboratoryjne przy rozpoznaniu oraz w trakcie leczenia u pacjentów z chW (n=36), mediana czasu leczenia 2,00 lata (IQR=0,08).

	D-p n=17 (47,2%)			ZS n=19 (52,8%)		
	Przy rozpoznaniu	W trakcie leczenia	<i>p</i>	Przy rozpoznaniu	W trakcie leczenia	<i>p</i>
Leukocyty, x10 ⁹ /l	4,76 ± 1,26	4,72 ± 1,55	0,804	5,66 ± 2,06	5,71 ± 1,92	0,761
Erytrocyty, x10 ⁹ /l	4,19 ± 0,69	4,80 ± 0,52	0,002	4,29 ± 0,55	4,61 ± 0,59	0,013
Płytki krwi, x10 ⁹ /l	124,63 ± 73,83	144 ± 57,98	0,055	156,95 ± 66,90	166,44 ± 64,08	0,138
Hemoglobina, g/dl	13,00 (2,80)	14,50 (2,2)	0,009	13,40 (0,90)	13,40 (3,00)	0,571
Hematokryt, %	37,90 (6,85)	41,60 (5,65)	0,007	39,10 (3,60)	39,70 (7,30)	0,557
ALP, IU/l	113,62 ± 47,26	72,45 ± 19,03	0,032	91,21 ± 31,47	90,07 ± 23,21	0,480
AST, IU/l	50,75 (52,25)	21,30 (10,80)	0,001	35,00 (14,90)	23,70 (20,10)	0,049
ALT, IU/l	51,50 (37,55)	22,70 (19,05)	0,001	37,00 (44,60)	30,00 (36,10)	0,160
GGTP, IU/l	61,20 (91,95)	18,30 (26,10)	0,007	75,60 (72,50)	42,00 (44,00)	0,000
Bilirubina, mg/dl	0,94 (1,36)	0,77 (0,40)	0,071	0,85 (0,51)	0,70 (0,55)	0,346
INR	1,25 (1,06)	1,10 (0,07)	0,003	1,2 (0,17)	1,12 (0,14)	0,016
Kreatynina, mg/dl	0,84 (0,19)	0,80 (0,19)	0,139	0,66 (0,24)	0,57 (0,24)	0,795
Albumina, g/dl	4,15 (1,74)	4,50 (0,55)	0,011	3,99 (0,52)	4,37 (0,70)	0,063
Żelazo, µg/dl	131,66 ± 32,24	111,51 ± 42,61	0,042	120,19 ± 52,33	61,65 ± 22,79	0,078
Ferrytyna, µg/l	207,50 (323,80)	81,00 (108,00)	0,049	125,00 (101,90)	19,00 (28,51)	0,109
TIBC, µg/dl	244,00 (110,00)	309,00 (44,00)	0,500	291,15 (107,00)	418,00 (76,40)	0,180

Dane przedstawiono w postaci średniej i odchylenia standardowego lub mediany i rozstępu międzykwartylowego. Skrótów: ALP, fosfataza alkaliczna; AST, aminotransferaza asparaginianowa; ALT, aminotransferaza alaninowa; GGTP, transpeptydaza gamma-glutamylowa; INR, międzynarodowy współczynnik znormalizowany; TIBC, całkowita zdolność wiązania żelaza.

Wartości *p* oznaczone pogrubioną czcionką oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami <0,05.

Tabela VIII. Mutacje w genie *ATP7b* w badanej grupie pacjentów z chW

	H1069Q n=74 (84,09%)	Inne niż H1069Q n=14 (15,91%)
Homozygoty	43 (48,86%)	4 (4,55%)
Złożone heterozygoty	19 (21,59%)	3 (3,41%)
Mutacja na jednym allelu	12 (13,64%)	3 (3,41%)
Nie wykryto mutacji	-	4 (4,55%)

Dane przedstawiono w postaci liczby przypadków i wartości procentowej.

4.2. Częstość występowania autoprzeciwciał w badanej grupie pacjentów

Częstość występowania wszystkich badanych autoprzeciwciał była wyższa u pacjentów z chW w porównaniu z osobami zdrowymi i wynosiła odpowiednio – ANA 21,59% vs 11,00% ($p=0,048$), ANCA 28,41% vs 15,00% ($p=0,025$), NSAbs 9,09% vs 2,00% ($p=0,031$), ONA 13,64% vs 5,00% ($p=0,039$) (**Tabela IX**).

U kobiet w porównaniu z mężczyznami obserwowano częstsze występowanie przeciwciał ANA, zarówno w grupie chorych (31,25% vs 10,00%, $p=0,016$), jak i w grupie kontrolnej (17,65% vs 4,08%, $p=0,030$). W przypadku pozostałych analizowanych przeciwciał nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania przeciwciał w zależności od płci. Częstość ANCA u kobiet i mężczyzn wynosiła odpowiednio, w grupie pacjentów z chW 35,42% vs 20,00%, $p=0,110$, natomiast w grupie kontrolnej 19,61% vs 10,20%, $p=0,188$. NSAbs wykryto u kobiet i mężczyzn z częstością odpowiednio, u pacjentów z chW 8,33% vs 10,00%, $p=0,787$, a u osób zdrowych 0,00% vs 4,08%, $p=0,145$. Częstość ONA wynosiła u kobiet i mężczyzn odpowiednio w grupie chorych 14,58% vs 12,50%, $p=0,777$ oraz w grupie kontrolnej 1,96% vs 8,16%, $p=0,155$.

Szczegółową częstość występowania wykrytych autoprzeciwciał przedstawiono w tabeli (**Tabela X**), przy czym ze względu na małą liczebność podgrup nie przeprowadzono analiz statystycznych.

Tabela IX. Częstość autooprzeciwciał u pacjentów z chW i u osób zdrowych

	Pacjenci z chW, n=88	Grupa kontrolna, n=100	<i>p</i>
ANA	19 (21,59%)	11 (11,00%)	0,048
ANCA	25 (28,41%)	15 (15,00%)	0,025
NSAbs	8 (9,09%)	2 (2,00%)	0,031
ONA	12 (13,64%)	5 (5,00%)	0,039

Dane przedstawiono jako liczbę i wartość procentową. Skróty: ANA, przeciwciała przeciwjądrowe; ANCA, przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów; chW, choroba Wilsona; NSAbs, przeciwciała przeciwko neuronalnym antygenom powierzchniowym; ONA, przeciwciała onkoneuronalne.

Wartości *p* oznaczone pogrubioną czcionką oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami <0,05.

Tabela X. Szczegółowa częstość występowania zidentyfikowanych autooprzeciwciał

	Pacjenci z chW		Grupa kontrolna	
	Przeciwciało	<i>n</i>	Przeciwciało	<i>n</i>
ANA	nRNP / Sm	1	PCNA	2
	Ro-52	1	Jo-1	1
	Scl-70	2	AMA-M2	1
	PCNA	3	DFS-70	8
	CENP-B	1		
	dsDNA	8		
	Histony	1		
	Rybosomalne biało-P	2		
	AMA-M2	2		
	DFS-70	4		
ANCA	p-ANCA	18	p-ANCA	8
	c-ANCA	7	c-ANCA	7
NSAbs	NMDA	7	NMDA	1
	LGI1	1	CASPR2	1
ONA	Ma2/Ta	1	Hu	1
	Zic4	1	Yo	2
	Rekoweryna	1	Rekoweryna	1
	GAD65	2	Tityna	1

	Yo	4		
	Tityna	2		
	Anty-ampifizyna	1		

Dane przedstawiono jako liczbę przypadków. Skróty: ANA, przeciwciała przeciwjądrowe; ANCA, przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów; NSAbs, przeciwciała przeciwko neuronalnym antygenom powierzchniowym; ONA, przeciwciała onkoneuronalne.

4.3. Zależność między obecnością autoprzeciwciał a postacią kliniczną i przebiegiem chW

Różnice w częstości występowania autoprzeciwciał między pacjentami z neurologiczną i wątrobową postacią chW nie osiągnęły istotności statystycznej, ale u pacjentów z postacią neurologiczną autoprzeciwciała występowały istotnie częściej w porównaniu z osobami zdrowymi: ANA (24,14% vs 11,00%, $p = 0,029$), ANCA (32,76% vs 15,00%, $p = 0,009$) i ONA (15,52% vs 5,00%, $p = 0,025$), natomiast nie zaobserwowano takiej zależności w przypadku pacjentów z postacią wątrobową (**Tabela XI**).

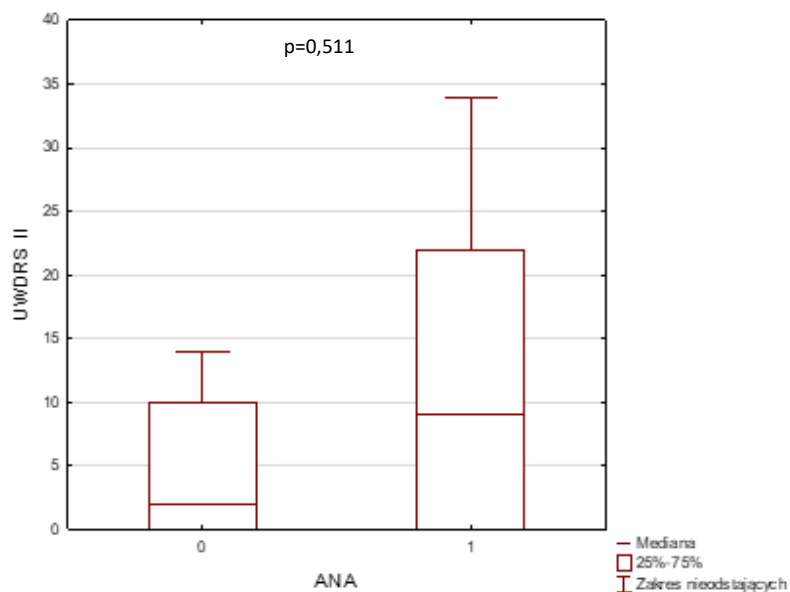
Przy analizie stanu neurologicznego pacjentów ocenionego w skali UWDRS, obecność ANCA wiązała się z tendencją do wyższej punktacji UWDRS II (mediana 10,00, IQR=20,00) w porównaniu z chorymi, u których nie wykryto ANCA (mediana 2,00, IQR=8,00), różnica nie osiągnęła jednak istotności statystycznej, $p=0,071$ (**Rycina 3**); punktacja UWDRS III wynosiła odpowiednio – w grupie z przeciwciałami ANCA mediana 38,00 (IQR=46,00), a w grupie bez ANCA mediana 20,00 (IQR=24,00), $p=0,209$ (**Rycina 7**). Nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy obecnością ANA, NSAbs i ONA, a stanem neurologicznym wyrażonym w punktacji UWDRS (**Ryciny 2-13**).

Tabela XI. Występowanie autoprzeciwciał w zależności od postaci klinicznej chW

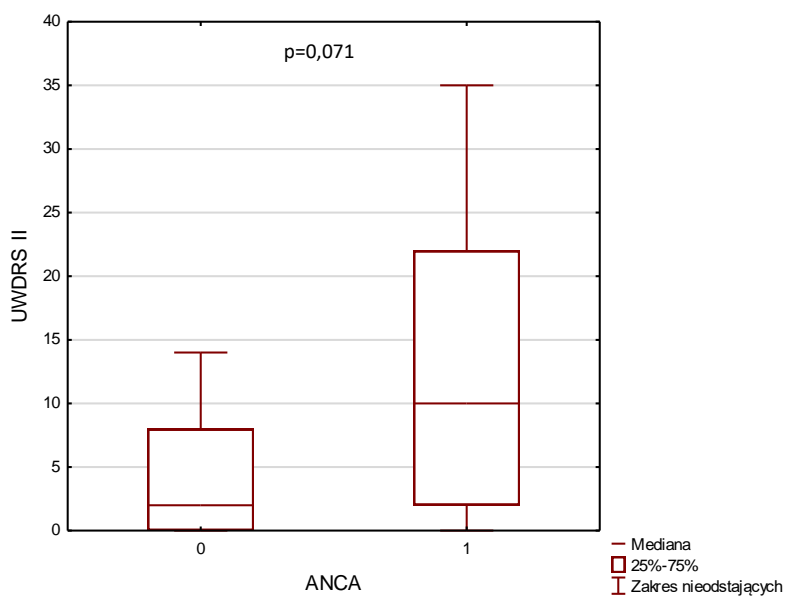
	Postać kliniczna chW			Grupa kontrolna, n = 100	P*
	Wątrobowa, n=24	Neurologiczna, n=58	Bezobjawowa, n=6		
ANA, n (%)	2 (8,33%)	14 (24,14%)	3 (50,00%)	11 (11,00%)	a 0,702 b 0,029 c 0,006
ANCA, n (%)	5 (20,83%)	19 (32,76%)	1 (16,67%)	15 (15,00%)	a 0,485 b 0,009 c 0,912
NSAbs, n (%)	2 (8,33%)	4 (6,90%)	2 (33,33%)	2 (2,00%)	a 0,115 b 0,121 c 0,000
ONA, n (%)	2 (8,33%)	9 (15,52%)	1 (16,67%)	5 (5,00%)	a 0,525 b 0,025 c 0,230

Dane przedstawiono jako liczbę i wartość procentową. Skróty: ANA, przeciwciała przeciwjądrowe; ANCA, przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów; chW, choroba Wilsona; NSAbs, przeciwciała przeciwko neuronalnym antygenom powierzchniowym; ONA, przeciwciała onkoneuronalne.

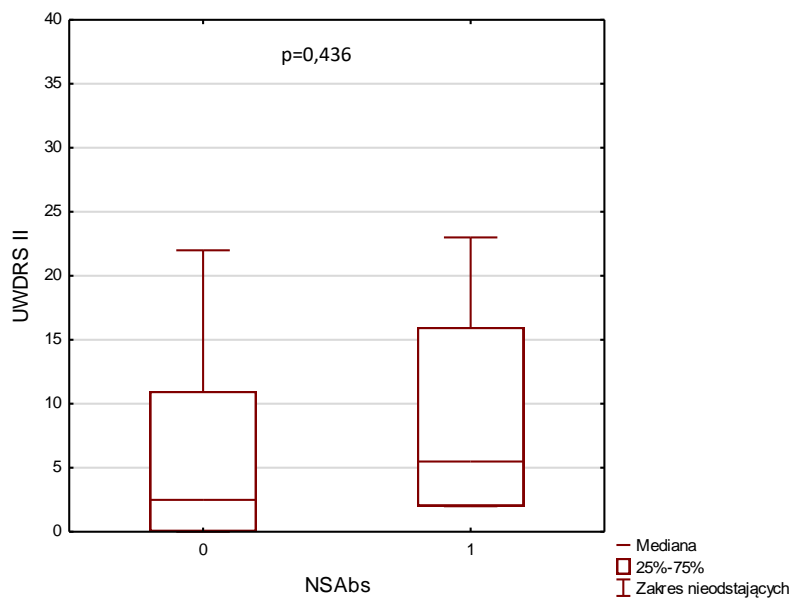
*a, p przy porównaniu między pacjentami z postacią wątrobową chW a grupą kontrolną
b, p przy porównaniu między pacjentami z postacią neurologiczną chW a grupą kontrolną
c, p przy porównaniu między bezobjawowymi pacjentami z chW a grupą kontrolną
Wartości p oznaczone pogrubioną czcionką oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami <0,05.



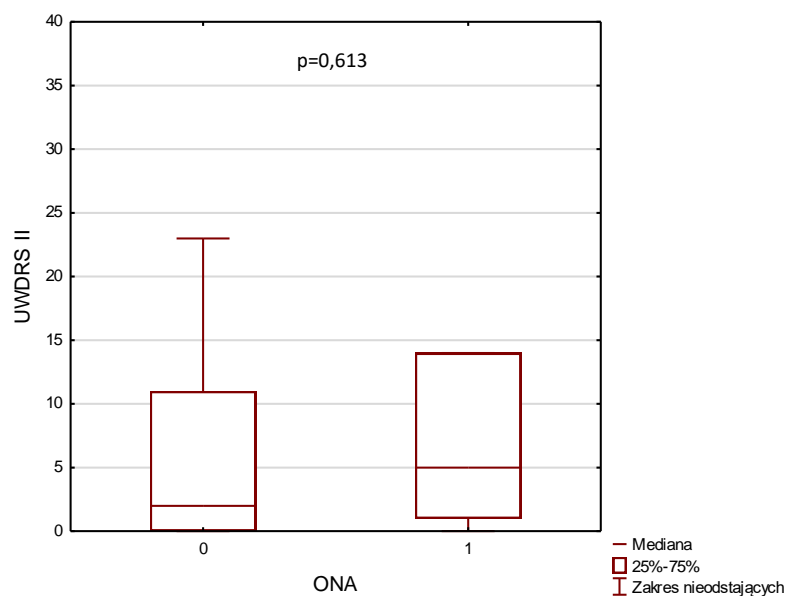
Rycina 2. Punkcja w skali UWDRS II u pacjentów z chW w zależności od obecności ANA



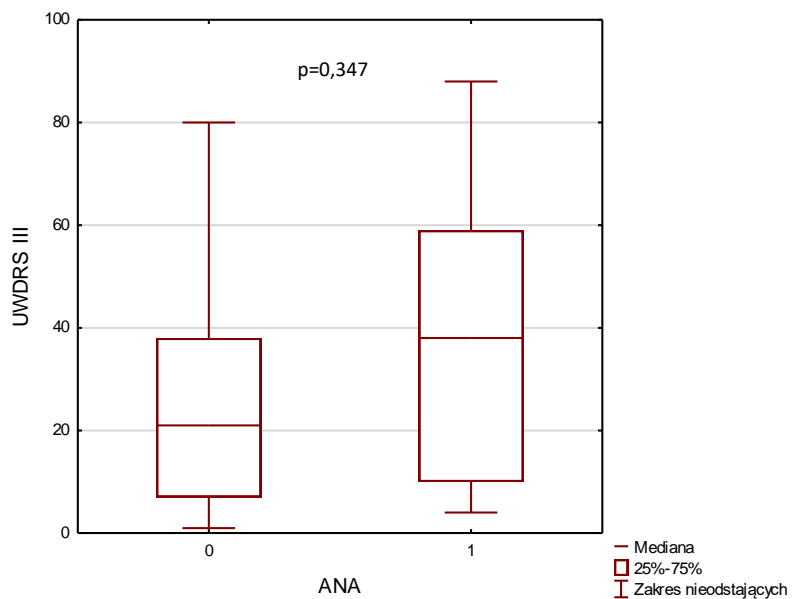
Rycina 3. Punkcja w skali UWDRS II u pacjentów z chW w zależności od obecności ANCA



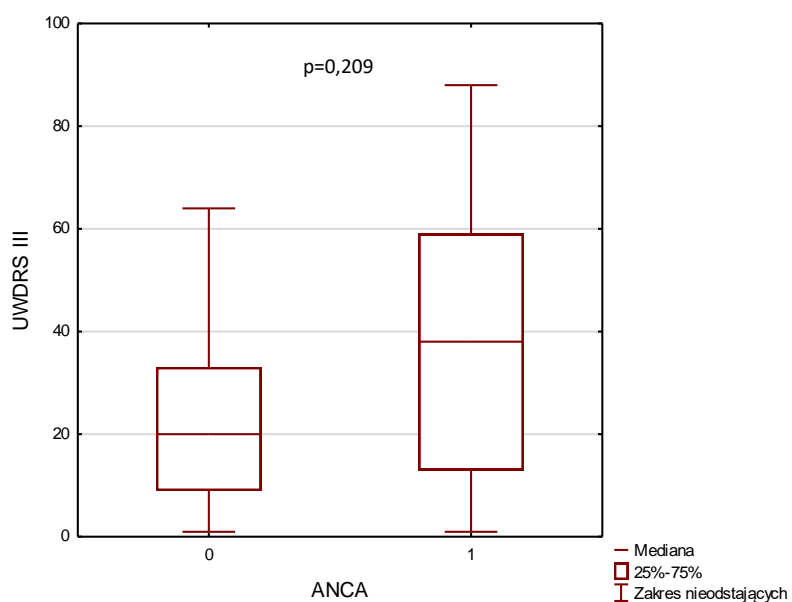
Rycina 4. Punkcja w skali UWDRS II u pacjentów z chW w zależności od obecności NSAbs



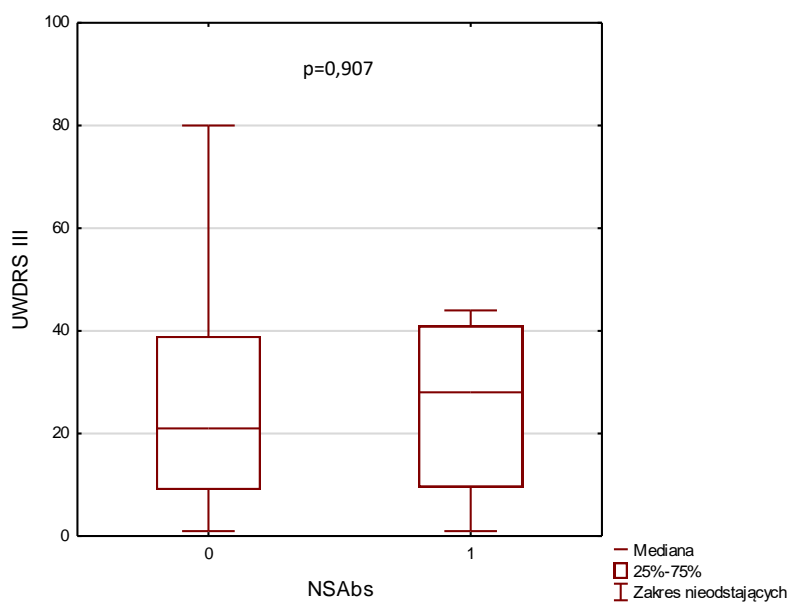
Rycina 5. Punkcja w skali UWDRS II u pacjentów z chW w zależności od obecności ONA



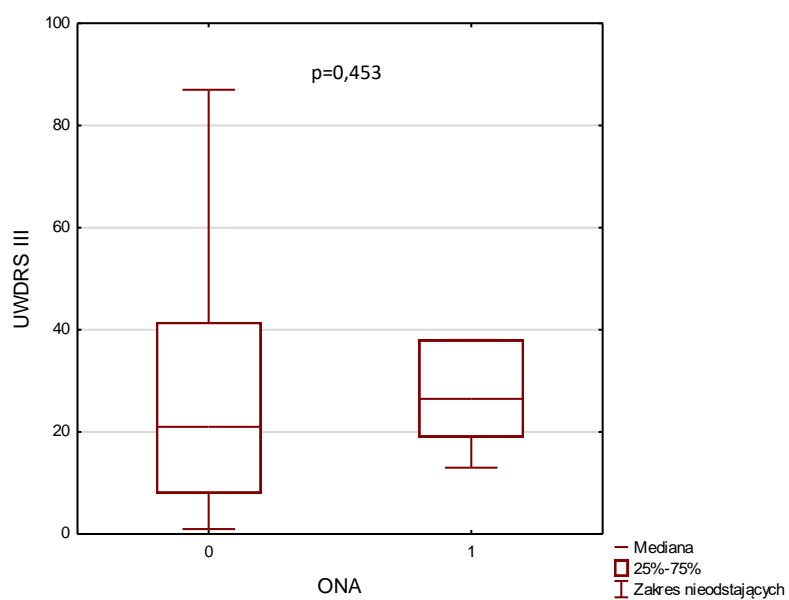
Rycina 6. Punkcja w skali UWDRS III u pacjentów z chW w zależności od obecności ANA



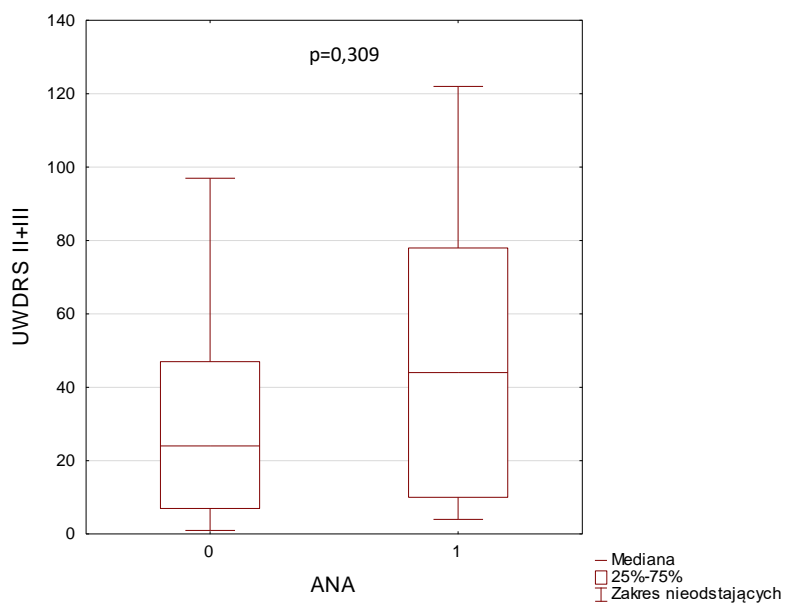
Rycina 7. Punkcja w skali UWDRS III u pacjentów z chW w zależności od obecności ANCA



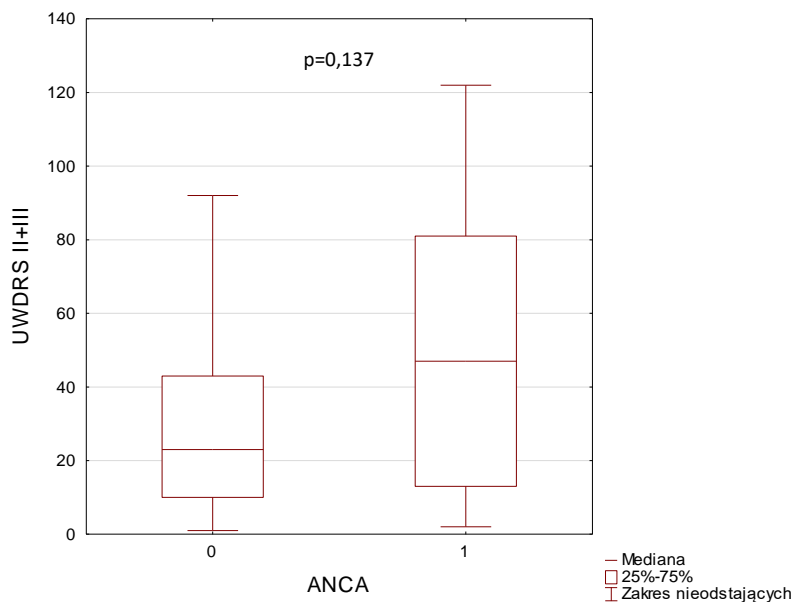
Rycina 8. Punkcja w skali UWDRS III u pacjentów z chW w zależności od obecności NSAbs



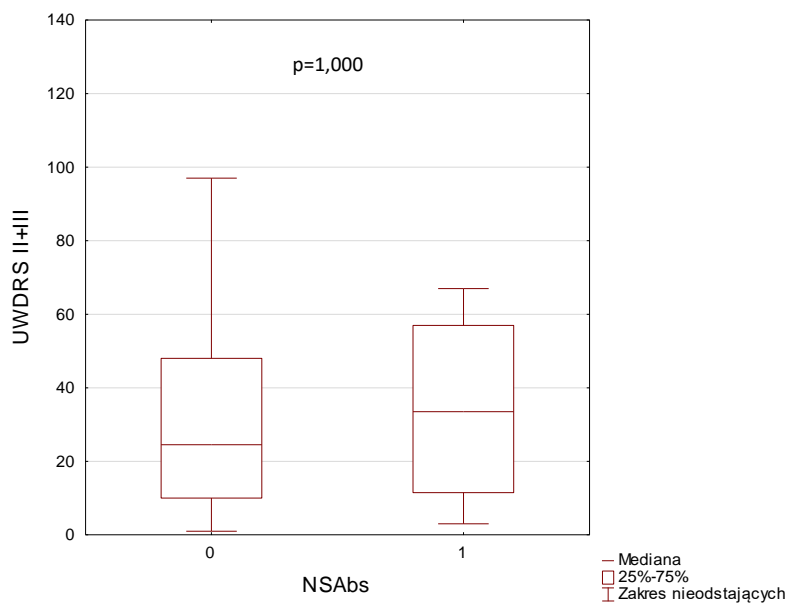
Rycina 9. Punkcja w skali UWDRS III u pacjentów z chW w zależności od obecności ONA



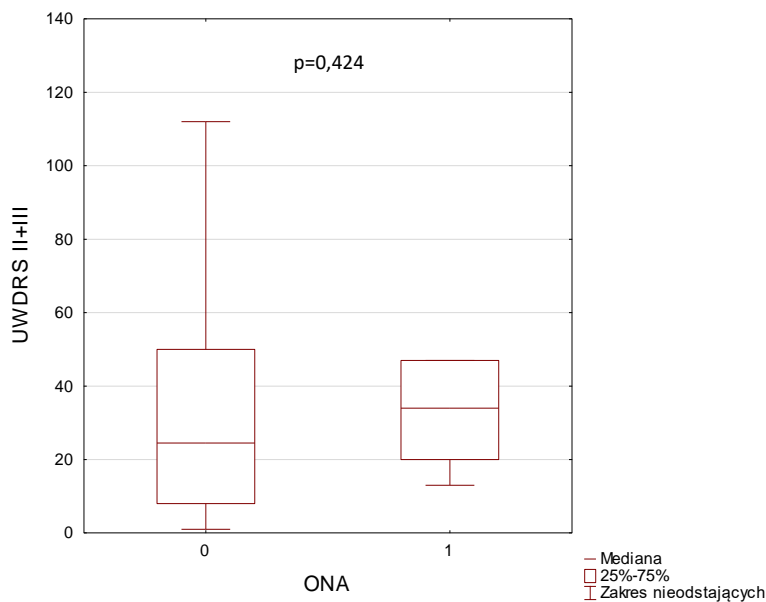
Rycina 10. Punkcja w skali UWDRS II + III u pacjentów z chW w zależności od obecności ANA



Rycina 11. Punkcja w skali UWDRS II + III u pacjentów z chW w zależności od obecności ANCA



Rycina 12. Punktacja w skali UWDRS II + III u pacjentów z chW w zależności od obecności NSAbs



Rycina 13. Punktacja w skali UWDRS II + III u pacjentów z chW w zależności od obecności ONA

4.4. Wpływ stosowanego leczenia na występowanie autoprzeciwciał

W podgrupie 36 pacjentów, dla których wykonano badanie w próbce surowicy pobranej w trakcie stawiania rozpoznania i ponownie, po 2 latach leczenia, obecność autoprzeciwciał nie zwiększyła się istotnie po 2 latach obserwacji, nie stwierdzono również różnicy w częstości autoprzeciwciał w zależności do stosowanego leczenia (**Tabela XII**).

Przy analizie obecności przeciwciał u pacjentów w trakcie leczenia (n=88), w grupie pacjentów leczonych D-p, częściej niż u osób zdrowych, obserwowano ANA (29,79% vs 11,00%, p=0,005), natomiast u pacjentów leczonych ZS, istotnie częściej niż u osób zdrowych, występowały ANCA, NSAbs i ONA (odpowiednio 31,71% vs 15,00%, p=0,024, 9,76% vs 2,00%, p=0,038, 21,95% vs 5,00%, p=0,002). Stwierdzono również istotne statystycznie różnice częstości występowania autoprzeciwciał pomiędzy grupami leczonymi D-p i ZS w przypadku ANA (29,79% vs 12,20%, p=0,045) i ONA (6,38% vs 21,95%, p=0,034) (**Tabela XIII**).

Tabela XII. Obecność autoprzeciwciał w momencie rozpoznania chW i po leczeniu (mediana czasu leczenia=2 lata)

	Ogółem n = 36			D-p n = 17			ZS n = 19		
	Przy rozpoznaniu	Podczas leczenia	p	Przy rozpoznaniu	Podczas leczenia	p	Przy rozpoznaniu	Podczas leczenia	p
ANA	3 (8,33%)	6 (16,67%)	0,450	1 (5,88%)	3 (17,65%)	0,617	2 (10,53%)	3 (15,79%)	1,000
ANCA	7 (19,44%)	7 (19,44%)	0,752	2 (11,76%)	1 (5,88%)	1,000	5 (26,32%)	6 (31,58%)	1,000
NSAbs	1 (2,78%)	3 (8,33%)	0,480	1 (5,88%)	1 (5,88%)	-	0 (0,00%)	2 (10,53%)	-
ONA	2 (5,56%)	3 (8,33%)	1,000	0 (0,00%)	0 (0,00%)	-	2 (10,53%)	3 (15,79%)	1,000

Dane przedstawiono jako liczbę i wartość procentową. Skróty: ANA, przeciwciała przeciwyjadrowe; ANCA, przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów; D-p, D-penicylamina; NSAbs, przeciwciała przeciwko neuronalnym antygenom powierzchniowym; ONA, przeciwciała onkoneuronalne; ZS – siarczan cynku.

Tabela XIII. Częstość występowania autoprzeciwciał w zależności od stosowanego leczenia

	Leczenie		Grupa kontrolna n=100	P*
	D-p n=47	ZS n=41		
ANA, n (%)	14 (29,79%)	5 (12,20%)	11 (11,00%)	a 0,005 b 0,839 c 0,045
ANCA, n (%)	12 (25,53%)	13 (31,71%)	15 (15,00%)	a 0,124 b 0,024 c 0,522
NSAbs, n (%)	4 (8,51%)	4 (9,76%)	2 (2,00%)	a 0,063 b 0,038 c 0,839
ONA, n (%)	3 (6,38%)	9 (21,95%)	5 (5,00%)	a 0,730 b 0,002 c 0,034

Dane przedstawiono jako liczbę i wartość procentową. Skróty: ANA, przeciwciała przeciwjądrowe; ANCA, przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów; D-p, D-penicylamina; NSAbs, przeciwciała przeciwko neuronalnym antygenom powierzchniowym; ONA, przeciwciała onkoneuronalne; ZS, siarczan cynku.

*a, p przy porównaniu między pacjentami z chW leczonymi D-p a grupą kontrolną
b, p przy porównaniu między pacjentami z chW leczonymi ZS a grupą kontrolną
c, p przy porównaniu między pacjentami z chW leczonymi D-p a leczonymi ZS
Wartości p oznaczone pogrubioną czcionką oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami <0,05.

4.5. Zależność między rodzajem mutacji w genie *ATP7b* a częstością występowania autoprzeciwciał

W grupie pacjentów będących nosicielami mutacji H1069Q odnotowano wyższą częstość autoprzeciwciał w porównaniu z pacjentami bez mutacji H1069Q, ale różnice te osiągnęły istotność statystyczną tylko w przypadku ANA (25,68% vs 0,00%, p=0,032) (**Tabela XIV**). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania autoprzeciwciał pomiędzy homozygotami H1069Q, heterozygotami złożonymi i nosicielami mutacji na jednym allelu (**Tabela XV**).

Tabela XIV. Zależność między rodzajem mutacji w genie *ATP7b* a częstością występowania autooprzeciwciał

	Mutacja H1069Q n=74 (84,09%)	Mutacje inne niż H1069Q n=14 (15,91%)	<i>p</i>
ANA	19 (25,68%)	0 (0,00%)	0,032
ANCA	24 (32,43%)	1 (7,14%)	0,054
NSAbs	7 (9,46%)	1 (7,14%)	0,782
ONA	11 (14,86%)	1 (7,14%)	0,440

Dane przedstawiono jako liczbę przypadków i wartość procentową. Skrót: ANA, przeciwciała przeciwjądrowe; ANCA, przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów; chW, choroba Wilsona; NSAbs, przeciwciała przeciwko neuronalnym antygenom powierzchniowym; ONA, przeciwciała onkoneuronalne.

Wartości *p* oznaczone pogrubioną czcionką oznaczają statystycznie istotne różnice między grupami <0,05.

Tabela XV. Częstość autooprzeciwciał u pacjentów z mutacją H1069Q

	Homozygoty n=43 (48,86%)	Złożone heterozygoty n=19 (21,59%)	Mutacja na jednym allelu n=12 (13,64%)	<i>p</i>
ANA, n (%)	10 (23,26%)	6 (31,58%)	3 (25,00%)	0,786
ANCA, n (%)	12 (27,91%)	8 (42,11%)	4 (33,33%)	0,544
NSAbs, n (%)	2 (4,65%)	4 (21,05%)	1 (8,33%)	0,125
ONA, n (%)	8 (18,60%)	1 (5,26%)	2 (16,67%)	0,389

Dane przedstawiono jako liczbę przypadków i wartość procentową. Skrót: ANA, przeciwciała przeciwjądrowe; ANCA, przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów; NSAbs, przeciwciała przeciwko neuronalnym antygenom powierzchniowym; ONA, przeciwciała onkoneuronalne.

5. Dyskusja

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały podwyższoną częstość występowania autoprzeciwciał u pacjentów z chW, wszystkie badane autoprzeciwciała były wykrywane u pacjentów z chW częściej niż u osób zdrowych. W analizie w podgrupach uwzględniających objawy kliniczne chW, stwierdzono, że postać neurologiczna, ale nie wątrobowa, jest związana z istotnym statystycznie zwiększeniem częstości ANA, ANCA i ONA w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednakże, w bezpośrednim porównaniu nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania przeciwciał między grupami z neurologiczną i wątrobową postacią chW. W grupie leczonej D-p przeciwciała ANA obserwowano istotnie częściej niż w grupie leczonej ZS, jednak nie towarzyszył temu wzrost częstości klinicznie jawnych chorób autoimmunologicznych. Choroby autoimmunologiczne współistniejące z chW stwierdzano rzadko, występowały z podobną częstością, zarówno u osób leczonych D-p, jak i ZS.

W chW dochodzi do nadmiernego gromadzenia miedzi w organizmie oraz uszkodzenia wielu tkanek i narządów, w tym najistotniejsze znaczenie ma uszkodzenie wątroby i mózgu (42). Czas wystąpienia objawów choroby i ich charakter różnią się znacząco u poszczególnych pacjentów (18). W badaniu własnym mediana wieku, w którym postawiono diagnozę chW, różniła się istotnie w zależności od postaci klinicznej choroby, postać neurologiczna była związana z późniejszym rozpoznaniem (mediana=29,00, IQR=14,00 lat) w porównaniu z postacią wątrobową (mediana=24,00, IQR=11,00 lat), $p=0,012$. Ta obserwacja pozostaje w zgodzie z wynikami badań innych autorów, np. w badaniu na grupie 163 pacjentów z chW z Niemiec stwierdzono, że postać neurologiczna, w porównaniu z postacią wątrobową, wiązała się z istotnie dłuższym czasem od wystąpienia objawów do postawienia diagnozy (44,4 vs 14,4 miesiące, $p = 0,004$), ponadto z wyższą średnią wieku pacjentów w momencie rozpoznania chW (23,9 vs 17,4 lat; $p = 0,001$) (57).

W chW mutacje w genie *ATP7B* prowadzą do przeładowania organizmu miedzią, nadmiar miedzi w wątrobie prowadzi do martwicy hepatocytów, przewlekłego stanu zapalnego i zwłóknienia wątroby. Uszkodzenie wątroby jest typowe dla chW, uważa się, że występuje u wszystkich pacjentów i stanowi pierwszy etap w rozwoju chW, po którym następuje uszkodzenie innych narządów, w tym OUN (42). Zgodnie z oczekiwaniami, w podstawowych badaniach laboratoryjnych u pacjentów z chW stwierdzono nieprawidłowości świadczące o patologii wątroby, podwyższenie AST, ALT, GGTP,

bilirubiny i INR, w porównaniu do osób zdrowych. W podgrupie pacjentów badanych przed rozpoczęciem leczenia, kontrolne badania laboratoryjne w trakcie terapii wykazały istotną poprawę testów wątrobowych oraz parametrów hematologicznych. Poprawa parametrów laboratoryjnych była silniej wyrażona u chorych leczonych D-p, przy czym w tej grupie chorych odchylenia w badaniach laboratoryjnych funkcji wątroby początkowych były większe.

Dostępne piśmiennictwo wskazuje na obecność dysregulacji immunologicznej u pacjentów z chW (148), zagadnienie to nie było jednak dotychczas szerzej badane. W ostatnich latach pojawiły się wyniki badań wskazujące na zwiększoną częstość występowania autooprzeciwciał w chW (176) (181) (182). Obecność autooprzeciwciał w chW może być związana z bezpośrednim toksycznym wpływem miedzi na układ immunologiczny lub stanowić rezultat uszkodzenia wątroby, typowego dla chW. W analizie tego zjawiska trzeba też brać pod uwagę możliwy wpływ powszechnie stosowanego leku – D-p, do której działań niepożądanych zaliczane jest wywoływanie zaburzeń o charakterze autoimmunologicznym, np. DIL (115). W badaniu na grupie 235 pacjentów z chW, Sessele i wsp. stwierdzili obecność ANA u 19% chorych, co stanowi wynik zbliżony do uzyskanego w niniejszej pracy (21,6%). We wspomnianej pracy stwierdzono brak istotnej statystycznie zależności między częstością ANA, a postacią kliniczną chW, ANA wykryto u 14,3% chorych z postacią neurologiczną oraz 21,4% chorych z postacią wątrobową. Nie obserwowano również istotnej zależności między stosowanym leczeniem D-p lub solami cynku, a częstością ANA (176). W badaniu własnym obserwowano nieco częstsze występowanie ANA w grupie leczonej D-p (29,8%) w porównaniu do grupy leczonej ZS (12,2%), uzyskany wynik znajduje się na granicy istotności statystycznej ($p=0,045$); ponadto w analizie w podgrupie, badanej przed zainicjowaniem leczenia oraz w jego trakcie, nie wykazano istotnego wpływu D-p na częstość ANA.

Wykrywanie ANA jest ważne w diagnostyce chorób autoimmunologicznych, takich jak choroby tkanki łącznej (183) i autoimmunologiczne zapalenie wątroby (184) (185), ale ANA można wykryć także nawet u 25% populacji ogólnej, częściej u kobiet i osób starszych (183). Obecność ANA może stanowić pierwszy serologiczny objaw aktywacji układu immunologicznego, prowadzącej do rozprzestrzeniania się autoagresji i w efekcie klinicznie jawnej choroby autoimmunologicznej. ANA pojawiają się zwykle na pierwszym etapie zaburzeń autoimmunologicznych, po którym dochodzi do

stopniowego wytwarzania kolejnych autoprzeciwciał, po czym następuje kliniczny początek choroby autoimmunologicznej (186).

W badaniu własnym współistniejące choroby autoimmunologiczne były obecne u 4,5% pacjentów z chW, ta częstość jest zbliżona do typowej dla populacji ogólnej krajów zachodnich (ok. 5-6%) (187). Nie zaobserwowano związku między wystąpieniem choroby autoimmunologicznej a stosowanym leczeniem D-p lub ZS, czy postacią kliniczną chW. Ponadto u pacjentów z towarzyszącymi chorobami autoimmunologicznymi nie wykryto obecności ANA, co pozostaje w zgodzie ze spostrzeżeniem Sessele i wsp. o braku korelacji między podwyższeniem miana ANA, a rozwojem chorób autoimmunologicznych u pacjentów z chW. Natomiast, w przytoczonej pracy, współistniejące zaburzenia autoimmunologiczne stwierdzono u 8,1% chorych, przy czym 5,5% miało wcześniej istniejące choroby autoimmunologiczne, a u 2,6% rozwinęły się one podczas długotrwałego przyjmowania D-p (176). Uważa się, że leczenie D-p wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób autoimmunologicznych, opisano przypadki DIL, zapalenia naczyń, miastenii, kłębuszkowego zapalenia nerek, nabytego pęcherzowego oddzielania się naskórka (171) (172) (173) (174) (175). W pracy własnej, u pacjentów z chW odnotowano przypadki autoimmunologicznego zapalenia tarczycy oraz reumatoidalnego zapalenia stawów, czyli najpowszechniej występujących chorób autoimmunologicznych, które nie są typowo związane z działaniami niepożądanymi D-p.

Częstość autoprzeciwciał w chW wydaje się zbliżona do częstości ich występowania w innych chorobach wątroby, takich jak niealkoholowe stłuszczenie wątroby (NAFLD) czy wirusowe zapalenie wątroby typu C (HCV). Uszkodzenie wątroby jest typowe dla chW, w różnym nasileniu występuje u wszystkich pacjentów, zarówno z postacią wątrobową, jak również neurologiczną (188) (41). Uszkodzenie mózgu następuje wtórnie, w związku z uwalnianiem wolnej miedzi, niezwiązanej z Cp, z przeciążonej wątroby do krążenia systemowego oraz jej odkładania w poszczególnych narządach, m.in. w mózgu. W pracy własnej częstość większości badanych autoprzeciwciał jest nieco większa u pacjentów z postacią neurologiczną, w porównaniu do pacjentów z postacią wątrobową, w bezpośrednim porównaniu różnica ta nie osiąga jednak istotności statystycznej. Trzeba też zwrócić uwagę, że grupy z postacią neurologiczną i wątrobową różniły się wiekiem – w grupie chorych z objawami neurologicznymi średnia wieku była wyższa, ponadto w tej grupie w późniejszym wieku następowało rozpoznanie i włączenie leczenia przeciwmiedziowego. Można

przypuszczać, że u chorych z postacią neurologiczną dysregulacja układu immunologicznego występowała od dłuższego czasu, prowadząc do głębszych zaburzeń immunologicznych i w związku z tym do zwiększonej częstości występowania autoprzeciwciał. Uszkodzenie wątroby, a zwłaszcza zaawansowana marskość wątroby, może prowadzić do związanej z marskością dysfunkcji immunologicznej, niedoboru odporności i ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, aktywacji krążących komórek odpornościowych i wzrostu stężenia cytokin prozapalnych w surowicy (160). Sugerowane jest, że występująca w chW martwica hepatocytów i ekspozycja układu odpornościowego na antygeny wewnątrzkomórkowe może skutkować wytwarzaniem autoprzeciwciał w niskim mianie. Obecność autoprzeciwciał może utrudniać różnicowanie między chW oraz AIH, ale w chW poziom immunoglobulin w surowicy nie jest podwyższony (189). Mimo, że są to przypadki rzadkie, należy rozważyć możliwość współistnienia autoimmunologicznej choroby wątroby, także, gdy rozpoznanie chW nie budzi wątpliwości. Opisywano przypadki nakładania się tych chorób, gdy korzystne jest leczenie skojarzone lekami usuwającymi nadmiar miedzi z organizmu oraz lekami immunosupresyjnymi (190).

Autoprzeciwciała, takie jak ANA, AMA i przeciwciała przeciw mięśniom gładkim (SMA) są charakterystyczne dla autoimmunologicznego zapalenia wątroby (AIH), obecność przeciwciał ANA oraz SMA, wraz z hipergammaglobulinemią i typowym obrazem histopatologicznym, należą do kryteriów diagnostycznych AIH (191). Jednakże, autoprzeciwciała w surowicy są często wykrywane także w innych przewlekłych chorobach wątroby, w tych przypadkach autoprzeciwciała mają charakter niespecyficzny i najczęściej nie wiążą się z obecnością autoimmunologicznej choroby wątroby (192).

Częstość ANA u pacjentów z HCV opisywano na ok. 20% (193) (194) (195) (196), choć część autorów wskazywała na częstość wyższą, ok 30-40% (197) (198). Kontrowersyjny jest związek ANA z nasileniem uszkodzenia wątroby u pacjentów z HCV, część autorów stwierdziło, że obecność ANA u pacjentów z HCV wiązała się z cięższym uszkodzeniem wątroby, większym nasileniem zmian marskich oraz podwyższonymi enzymami wątrobowymi (197) (199) (200), choć są też doniesienia o braku takiego związku (193) (196). W NAFLD ANA wykrywano u około 20% pacjentów, obecność ANA była związana z nasilonymi zmianami histopatologicznymi oraz biochemicznymi (201) (202) (203). Związek pomiędzy syntezą autoprzeciwciał, aktywnością choroby wątroby i predyspozycją genetyczną pozostaje niejasny. W

przypadku alkoholowej choroby wątroby, autoprzeciwciała wykrywano w surowicy u 69,6% pacjentów, najczęściej stwierdzano obecność ANA, których częstość (63,8%) była znacząco większa niż oczekiwana w populacji ogólnej (192). Choć alkohol nie jest bezpośrednio związany z indukowaniem chorób immunologicznych, to przewlekłe spożywanie alkoholu zwiększa syntezę prooksydantów i prowadzi do stresu oksydacyjnego (204), co zwiększa podatność na inne czynniki uszkodzające wątrobę. Rozwój reakcji autoimmunologicznej może być związany ze stresem oksydacyjnym, którego produkty stają się nowymi antygenami stymulującymi odpowiedź immunologiczną (205). W przypadku chW jednym z postulowanych mechanizmów wyjaśniających toksyczność komórkową miedzi jest jej zdolność do uczestniczenia w tworzeniu reaktywnych form tlenu (206). W warunkach obniżonej zdolności antyoksydacyjnej, wytwarzane w dużej ilości wolne rodniki mogą powodować oksydacyjne uszkodzenia komórek (24), co może mieć udział w zwiększonym wytwarzaniu autoprzeciwciał u pacjentów z chW.

W badaniu na grupie pediatrycznych pacjentów z chW, Jańczyk i wsp. przeanalizowali częstość występowania panelu autoprzeciwciał (ANA, SMA, AMA, przeciwciał przeciw komórkom okładzinowym żołądka, przeciwciał przeciw mikrosomom wątroby i nerki, ANCA oraz przeciwciał specyficznych dla celiakii) w powiązaniu z oceną nasilenia uszkodzenia wątroby. Spośród badanych autoprzeciwciał jedynie częstość występowania ANA była wyższa u dzieci z chW niż w grupie kontrolnej, zarówno w mianie 1:20 (70,6% vs 26,6%), jak i w mianie 1:160, (27,9% vs 2,7%), $p < 0,05$. Nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy obecnością autoprzeciwciał a rodzajem stosowanego leczenia, słuszczeniem lub sztywnością wątroby ocenianymi metodą elastografii dynamicznej, wynikami testów wątrobowych lub parametrów metabolizmu miedzi. Ponieważ nie zaobserwowano, by obecność autoprzeciwciał wiązała się z cięższym uszkodzeniem wątroby w przebiegu chW, autorzy sugerują, że zaburzenia autoimmunologiczne w chW mogą nie być bezpośrednio związane z uszkodzeniem wątroby (182).

W chW dochodzi do gromadzenia nadmiaru miedzi w organizmie i przedostawania się do krążenia systemowego toksycznej tzw. wolnej miedzi. Miedź jest pierwiastkiem śladowym, który bierze udział w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego. W badaniach in vitro, stwierdzono, że miedź indukuje wydzielanie IL-6 w hodowli komórkowej ludzkich keratynocytów i fibroblastów (207). U pacjentów z chW stwierdzono podwyższony poziom IL-6, TNF- α i interferonu- γ w surowicy, co może

wskazywać na toczący się proces zapalny (153). Zaobserwowano, że wyższe stężenia w surowicy IL-2, TNF- α , TNF- β , IL-13, TGF- β 1 i IL-23 były związane z nasileniem objawów neurologicznych u pacjentów z chW (154). Uważa się, że neurozapalenie może odgrywać ważną rolę w patogenezie chW (154) (155). Chociaż OUN często uważano za uprzywilejowany immunologicznie i izolowany od obwodowego układu odpornościowego, mediatory immunologiczne uwalniane na obwodzie mogą przenikać przez BBB (156), wykazując bezpośrednią neurotoksyczność i prowadząc do aktywacji mikrogleju i astrocytów (157). W chW uszkodzenie OUN przez NCC może rozpoczynać się od uszkodzenia BBB, które ułatwia dalsze przenikanie miedzi do mózgu (208). U pacjentów z neurologiczną postacią chW wykazano obecność uszkodzenia BBB, stwierdzono podwyższony wskaźnik albuminowy, tzn. stosunek stężenia albuminy w PMR do stężenia albuminy w surowicy; wskaźnik albuminowy ulegał normalizacji podczas terapii przeciwmiedziowej (209). Wyniki badań na grupie 171 pacjentów z chW wskazały na aktywację śródbłonna w chW, zaobserwowano podwyższone stężenia ICAM1 oraz korelację stężenia ICAM1 z nasileniem objawów neurologicznych, co wskazuje na upośledzenie BBB. W trakcie leczenia dochodziło do zmniejszenia stężenia ICAM1, co może odpowiadać ograniczeniu procesu zapalnego oraz częściowej naprawie BBB (210).

W wielu badaniach wykazano, że odpowiedź zapalna odgrywa istotną rolę nasilającą uszkodzenie neuronów w udarze mózgu, stwardnieniu rozsianym, chorobie Alzheimera, chorobie Parkinsona czy chorobie Huntingtona (211) (212) (213). W chorobie Alzheimera odnotowano zaburzenia w ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej, obejmujące zarówno mechanizmy odporności wrodzonej, jak i nabytej, w tym zmiany w dystrybucji oraz aktywacji limfocytów i makrofagów, obecność autoprzeciwciał, zaburzenia w układzie dopełniacza oraz nieprawidłowe wytwarzanie cytokin w PMR i surowicy. Wykazano również związek między układową autoimmunizacją i dużą częstością przeciwciał ANA a otępieniem czołowo-skroniowym (214) (215) (216). Zwiększone ryzyko wystąpienia otępienia i choroby Alzheimera zostało odnotowane w przypadku chorób autoimmunologicznych, takich jak zespół Sjogrena, sarkoidoza i inne (217) (218) (219). W chorobie Parkinsona obserwowano dysregulację układu immunologicznego i prozapalną aktywację limfocytów T, nie jest jednak jasne czy jest to reakcja antygenowo specyficzna, czy wskazująca na uogólnioną nadreaktywność układu immunologicznego. W przeprowadzonych dotychczas badaniach stwierdzono zwiększoną liczbę krążących limfocytów T specyficznych dla α -synukleiny

u części pacjentów z chorobą Parkinsona, potrzebne są dalsze badania, by określić czy inne antygeny układu nerwowego również mogą być celem odpowiedzi układu immunologicznego (220).

Przeciwciała ANCA są markerem serologicznym układowych zapaleń naczyń, ale mogą też, zwłaszcza p-ANCA, występować u osób zdrowych, szczególnie w starszym wieku, oraz w przebiegu innych układowych chorób tkanki łącznej, autoimmunologicznych chorób wątroby, zapalnych chorób jelit, infekcji oraz chorób nowotworowych (106). D-p, która jest stosowana w leczeniu chW, może, jako działanie niepożądane, indukować syntezę ANCA i zapalenie naczyń (221). Znane są przypadki, związanego z leczeniem D-p i przeciwciałami ANCA, zapalenia naczyń i kłębuszkowego zapalenia nerek u pacjentów z chW (162) (172) (174). W badanej grupie pacjentów nie stwierdzono przypadków zapalenia naczyń, przeciwciała ANCA występowały ze zbliżoną częstością u osób otrzymujących D-p (25,53%) i ZS (31,71%), obserwowane częstości ANCA u pacjentów z chW były wyższe w porównaniu z osobami zdrowymi (15,0%). Zaobserwowano tendencję częstszego występowania ANCA u pacjentów z postacią neurologiczną niż wątrobową chW oraz większego nasilenia objawów neurologicznych u pacjentów z dodatnimi przeciwciałami ANCA, zależności te nie osiągnęły jednak istotności statystycznej. Wykrycie ANCA w chorobach autoimmunologicznych, zwłaszcza w chorobach tkanki łącznej, często wiąże się z większą liczbą powikłań klinicznych i nieskutecznością leczenia, nawet jeśli nie ma objawów zapalenia naczyń. Można przypuszczać, że ANCA jest ostatecznym wyrazem dysregulacji immunologicznej, a nie czynnikiem sprawczym obserwowanego uszkodzenia narządów (222). Zapalenie naczyń nie należy do patomorfologicznych cech choroby Wilsona, znanych z pośmiertnych badań mózgu (223). Znaczenie zwiększonej częstości ANCA w chorobie Wilsona pozostaje niejasne, ale wydaje się odzwierciedlać dysregulację immunologiczną i stanowić zjawisko wtórne.

Duże zróżnicowanie objawów klinicznych u pacjentów z chW sugeruje obecność czynników modyfikujących. W związku z tym, rozważano czy takiego potencjału modyfikującego przebieg chW nie posiadają czynniki immunologiczne, w tym przeciwciała przeciwneuronalne. Wśród przeciwciał przeciwneuronalnych wyróżniane są przeciwciała przeciw neuronalnym antygenom powierzchniowym (NSAbs), odpowiedzialne za autoimmunologiczne zapalenia mózgu oraz przeciwciała onkoneuronalne (ONA), związane z zespołami paranowotworowymi.

Istnieją doniesienia wskazujące na stosunkowo częstą obecność NSAbs u pacjentów z powoli postępującymi zaburzeniami poznawczymi lub zaburzeniami ruchowymi naśladującymi choroby neurodegeneracyjne, np. chorobę Alzheimera (anty-LGI1) (144) (224), otępienie czołowo-skroniowe (anty-VGKC, ang. voltage-gated potassium channels) (145), stwardnienie zanikowe boczne (anty-GABAB) (146), chorobę Creutzfeldta-Jakoba (anty-GABAB1/B2, anty-NMDAR, anty-Caspr2, anty-Hu) (147). W badaniu przeprowadzonym na grupie 93 pacjentów z objawami parkinsonizmu lub demencji, NSAbs (GlyR, GABAAR, LGI1, CASPR2 i GABABR) wykryto u 13,8% (n = 13) pacjentów, w większości przypadków z niesklasyfikowaną, atypową postacią zaburzeń; NSAbs wykryto także u 2% (n = 1) osób zdrowych (225). W badaniu własnym NSAbs występowały częściej u pacjentów z chW (9,09%) niż w grupie kontrolnej (2,0%), ale nie stwierdzono istotnej różnicy w obecności NSAbs w zależności od postaci klinicznej lub zastosowanego leczenia, w związku z tym znaczenie kliniczne tych przeciwciał pozostaje niejasne.

Do grupy przeciwciał przeciwneuralnych należą również klasyczne ONA, które wykazują ponad 95% asocjacji z chorobami nowotworowymi, a ich obecność wraz z objawami neurologicznymi wskazuje z dużym prawdopodobieństwem na neurologiczne zespoły paranowotworowe (226). W badaniu własnym stwierdzono częstsze występowanie ONA u pacjentów z chW (13,64%) niż u osób zdrowych (5,0%) oraz tendencję, która nie osiągnęła istotności statystycznej, do częstszego występowania ONA w przypadku postaci neurologicznej (15,52%) niż postaci wątrobowej (8,33%). ONA są skierowane przeciw antygenom wewnątrzkomórkowym, uważa się, że ich znaczenie kliniczne wiąże się z rolą biomarkerów choroby nowotworowej, a nie z wywoływaniem lub nasilaniem objawów neurologicznych (124). Informację o przebytych nowotworze złośliwym odnotowano w dokumentacji medycznej 5 pacjentów z chW (rak endometrium, chłoniak Hodgkina, przewlekła białaczka limfocytowa, rak wątrobowokomórkowy i rak brodawkowy tarczycy), ale, poza jednym przypadkiem, nie wykryto u tych chorych obecności ONA.

Szybko powiększająca się wiedza o przeciwciałach przeciwneuralnych oraz mediowanych przez nie zaburzeniach i w związku z tym, poszerzające się spektrum obrazów klinicznych, mogą powodować dylemat diagnostyczny. Obecność nietypowego zespołu neuropsychiatrycznego wraz z dodatnim mianem przeciwciał nie zawsze pozwala wnioskować, że to przeciwciało jest przyczyną choroby, wykryte autoprzeciwciało może być jedynie niespecyficznym znaleziskiem lub fałszywie

dotatnim wynikiem badania (123). W wielu przypadkach przeciwciała NSAbs mogą mieć charakter wtórny do leżących u podstaw patologii neurodegeneracyjnych, np. przeciwciała przeciwneuronalne były wykryte u niewielkiej grupy pacjentów z potwierdzoną chorobą prionową (227) (228) (229). Jednak pacjenci z każdym schorzeniem neurologicznym mogą rozwijać przeciwciała w trakcie choroby, zwłaszcza ci z nagłym pogorszeniem objawów, przeciwciała mogłyby modulować przebieg leżącego u ich podstaw zaburzenia neurodegeneracyjnego (225). Wyniki własne nie potwierdziły hipotezy, że przeciwciała przeciwneuronalne mogą odgrywać istotną rolę w modyfikowaniu obrazu klinicznego chW, nie stwierdzono związku między ich obecnością a rozwojem i nasileniem objawów neurologicznych chW.

Za wystąpienie chW może odpowiadać kilkaset poznanych mutacji w genie *ATP7B*. Niektóre mutacje (mutacje typu zmiany ramki odczytu, nonsensowne) niszczą funkcję kodowanego białka, podczas gdy inne prawdopodobnie zmniejszają jego aktywność, ale nie znoszą jej całkowicie (mutacje zmiany sensu). W badanej grupie pacjentów najczęstszą rozpoznawaną mutacją w genie *ATP7B* jest mutacja typu zmiany sensu – H1069Q, wykryta u 84,09% pacjentów, a w układzie homozygotycznym występująca u 48,86% pacjentów. Mutacja H1069Q jest najczęściej występującą mutacją w Europie Środkowej, Wschodniej i Północnej, gdzie przynajmniej jeden allel z tą mutacją stwierdza się u około 50-80% pacjentów (18) (230) (20). Istnieją doniesienia wskazujące, że mutacja H1069Q wiąże się z łagodniejszymi zaburzeniami metabolizmu miedzi i późniejszą manifestacją kliniczną chW oraz częstszym występowaniem objawów neurologicznych w porównaniu z mutacjami nie-H1069Q (231) (232) (233) (234) (235). W innych badaniach nie stwierdzono zależności między genotypem a fenotypem, duże europejskie badanie obejmujące grupę 1357 pacjentów z chW, dzieci i dorosłych, gdzie częstość allelu H1069Q wynosiła 46,9%, nie potwierdziło związku pomiędzy mutacjami genu *ATP7B* a fenotypem klinicznym (27). W badaniu własnym pacjenci będący nosicielami mutacji H1069Q mieli wyższą częstość występowania autooprzeciwciał w porównaniu z pacjentami bez tej mutacji, ale różnice te osiągnęły istotność statystyczną tylko w przypadku ANA (25,68% vs 0,00%, $p=0,032$). Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania autooprzeciwciał pomiędzy nosicielami mutacji H1069Q w układzie homozygotycznym i heterozygotycznym. Opisywane różnice w częstości występowania autooprzeciwciał w zależności od rodzaju mutacji *ATP7B* posiadają słabą istotność statystyczną, grupa pacjentów nie-H1069Q była mało liczna, adekwatnie do niskiej częstości w populacji polskiej, w związku z tym

możliwy jest wpływ czynnika losowego. Wartościowych danych mogłoby dostarczyć przeprowadzenie badania obecności autoprzeciwciał na większej grupie pacjentów niebędących nosicielami mutacji H1069Q.

Podsumowując, na podstawie zaprezentowanych wyników można stwierdzić zwiększoną częstość występowania autoprzeciwciał u pacjentów z chW, ale bez towarzyszącego wzrostu częstości klinicznie jawnych chorób autoimmunologicznych. Obecność autoprzeciwciał nie ma związku z postacią kliniczną chW lub nasileniem objawów neurologicznych. Leczenie D-p, w porównaniu z ZS, jest związane z częstszym występowaniem ANA. Prawdopodobnie, obecność autoprzeciwciał stanowi zjawisko wtórne, wynikające z uszkodzenia wątroby oraz toksycznego wpływu miedzi na układ immunologiczny.

6. Ograniczenia badania

Choroba Wilsona należy do grupy chorób rzadkich, jej częstość występowania jest szacowana na ok. 1:30 000. IPIŃ w Warszawie jest najbardziej doświadczoną w diagnozowaniu i leczeniu tego schorzenia placówką w Polsce, jednak rzadkie występowanie choroby sprawia, że liczebność grupy badanej jest relatywnie mała (n=88). Mała liczebność grupy badanej wiąże się z niższą mocą statystyczną stosowanych testów statystycznych i trudnością wykazania różnic w częstości występowania autooprzeciwciał oraz ich związku z objawami klinicznymi i przebiegiem chW. W grupie pacjentów, u których oznaczono autooprzeciwciała w surowicy również przed rozpoczęciem leczenia oraz w trakcie terapii, nie stwierdzono istotnych różnic w występowaniu badanych przeciwciałach po 2 latach od rozpoczęcia leczenia, co sugeruje brak wpływu leczenia na autoimmunizację w chW, ale trzeba pamiętać, że na wyniki może mieć wpływ ograniczona liczba pacjentów (n=36). W analizie częstości występowania autooprzeciwciał w zależności od rodzaju mutacji w genie *ATP7B* istotne ograniczenie stanowi niewielka próba pacjentów nie-H1069Q, co odzwierciedla częstość poszczególnych mutacji *ATP7B* w Polsce. Mutacja H1069Q jest najczęstsza w Europie Środkowej, Wschodniej i Północnej, około 50-80% pacjentów jest nosicielami przynajmniej jednego allela z mutacją H1069Q (18) (20). Zasadne wydaje się przeprowadzenie badania obecności autooprzeciwciał w większej grupie pacjentów z innymi mutacjami niż H1069Q, które są bardziej rozpowszechnione w innych częściach świata.

Metodyka badania przeciwciał jest kolejnym potencjalnym ograniczeniem badania. Aby osiągnąć najwyższą czułość i swoistość, zalecaną praktyką jest potwierdzanie wyników za pomocą innej metodologii laboratoryjnej oraz badanie sparowanych próbek surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR). Badania przeciwciał ANA wykonano z zastosowaniem dwóch technik laboratoryjnych – IIFT i Western blot, natomiast ANCA i NSAb wyłącznie za pomocą IIFT, a ONA wyłącznie metodą Western blot. Ograniczenie do jednej techniki laboratoryjnej może wiązać się z mniejszą czułością i swoistością otrzymanych wyników, ale było związane z dostępnością komercyjnych testów diagnostycznych. Obecność autooprzeciwciał nie tylko w surowicy, ale również w PMR, zwiększyłaby swoistość badania i sugerowałaby autoimmunizację w OUN (236). W prezentowanej pracy autooprzeciwciała oznaczano wyłącznie w surowicy, ponieważ nie były dostępne do badania próbki PMR. Wykonanie

oznaczeń w PMR wymagałoby punkcji lędźwiowej, inwazyjnej procedury medycznej, która, w typowych przypadkach, nie znajduje wskazań u pacjentów z chW. Pacjenci uczestniczący w badaniu nie wykazywali objawów zaburzeń autoimmunologicznych, w związku z tym nie było celowe poszukiwanie autoprzeciwciał w PMR.

7. Wnioski

Na podstawie przedstawionego w niniejszej rozprawie doktorskiej badania można postawić następujące wnioski:

1. U pacjentów z chW dochodzi do dysregulacji układu immunologicznego i zwiększonej częstości wytwarzania autoprzeciwciał. W badanej grupie pacjentów z chW obserwowano częstsze niż w grupie kontrolnej występowanie wszystkich analizowanych autoprzeciwciał (ANA, ANCA, NSAbs i ONA).
2. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania autoprzeciwciał między grupami z neurologiczną i wątrobową postacią chW, a także nie potwierdzono zależności między obecnością autoprzeciwciał a nasileniem objawów neurologicznych u pacjentów z chW.
3. Leczenie D-p w porównaniu z ZS, było związane z częstszym występowaniem ANA, jednak nie towarzyszył temu wzrost częstości klinicznie jawnych chorób autoimmunologicznych. Częstość chorób autoimmunologicznych u pacjentów z chW jest zbliżona do obserwowanej w populacji ogólnej.
4. Rola autoprzeciwciał w patogenezie choroby Wilsona jest niejasna, prawdopodobnie ich występowanie stanowi zjawisko wtórne, wynikające z uszkodzenia wątroby oraz toksycznego wpływu miedzi na układ immunologiczny.
5. Chociaż nie stwierdzono wyraźnego związku między obecnością autoprzeciwciał a klinicznie jawnymi chorobami autoimmunologicznymi, pacjenci z chorobą Wilsona, zwłaszcza przyjmujący D-p, powinni być uważnie monitorowani pod kątem chorób autoimmunologicznych ze względu na podwyższoną częstość autoprzeciwciał.

8. Piśmiennictwo

1. **Wilson SA.** Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*. 1912;34:295-507.
2. **Litwin T, Członkowska A.** Choroba Wilsona – obraz kliniczny, diagnostyka i leczenie. *Postępy Nauk Medycznych*. 2012;25(1):34-44.
3. **Cumings JN.** The copper and iron content of brain and liver in the normal and in hepato-lenticular degeneration. *Brain*. 1948;71(Pt. 4):410-415.
<https://doi.org/10.1093/brain/71.4.410>.
4. **Cumings JN.** The effects of B.A.L. in hepatolenticular degeneration. *Brain*. 1951;74(1):10-22. <https://doi.org/10.1093/brain/74.1.10>.
5. **Holmberg CG, Laurell CB.** Investigations in serum copper; nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. *Acta Chem Scand*. 1947;1(10):944-950. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.01-0944>.
6. **Scheinberg IH, Gitlin D.** Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science*. 1952;116(3018):484-485. <https://doi.org/10.1126/science.116.3018.484>.
7. **Bearn AG, Kunkel HG.** Biochemical abnormalities in Wilson's disease. *J Clin Invest*. 1952;31:616.
8. **Frommer DJ.** Defective biliary excretion of copper in Wilson's disease. *Gut*. 1974;15(2):125-129. <https://doi.org/10.1136/gut.15.2.125>.
9. **Hall HC.** *La dégénérescence hépato-lenticulaire: maladie de Wilson, pseudo-sclérose*. Paryż: Masson, 1921.
10. **Frydman M.** Genetic aspects of Wilson's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 1990;5(4):483-490. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1990.tb01427.x>.
11. **Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, et al.** The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet*. 1993;5(4):327-337. <https://doi.org/10.1038/ng1293-327>.
12. **Sternlieb I, Scheinberg IH.** Prevention of Wilson's disease in asymptomatic patients. *N Engl J Med*. 1968;278(7):352-359.
<https://doi.org/10.1056/NEJM196802152780702>.
13. **Scheinberg IH, Sternlieb I.** *Wilson's disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1984.
<https://doi.org/10.1002/ana.410160531>.
14. **Beinhardt S, Leiss W, Stättermayer AF, et al.** Long-term outcomes of patients with Wilson disease in a large Austrian cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:683-689. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.09.025>.

15. **Poujois A, Woimant F, Samson S, et al.** Characteristics and prevalence of Wilson's disease: A 2013 observational population-based study in France. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2018;42(1):57–63. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2017.05.011>.
16. **Tai CS, Wu JF, Chen HL, et al.** Modality of treatment and potential outcome of Wilson disease in Taiwan: A population-based longitudinal study. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(5):421–426. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.05.008>.
17. **Cheung KS, Seto WK, Fung J, et al.** Epidemiology and natural history of Wilson's disease in the Chinese: A territory-based study in Hong Kong between 2000 and 2016. *World J Gastroenterol.* 2017;23(43):7716–7726. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i43.7716>.
18. **Członkowska A, Litwin T, Dusek P, et al.** Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018, 4(1), strony 21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0018-3>.
19. **Avan A, Członkowska A, Gaskin S, et al.** The Role of Zinc in the Treatment of Wilson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(16):9316. <https://doi.org/10.3390/ijms23169316>.
20. **Kluska A, Kulecka M, Litwin T, et al.** Whole-exome sequencing identifies novel pathogenic variants across the ATP7B gene and some modifiers of Wilson's disease phenotype. *Liver Int.* 2019;39(1):177-186. <https://doi.org/10.1111/liv.13967>.
21. **Shribman S, Poujois A, Bandmann O, et al.** Wilson's disease: update on pathogenesis, biomarkers and treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2021;92(10):1053-1061. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-326123>.
22. **Gaetke LM, Chow CK.** Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003;189(1-2):147–163. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00159-8).
23. **Bruha R, Vitek L, Marecek Z, et al.** Decreased serum antioxidant capacity in patients with Wilson disease is associated with neurological symptoms. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(3):541-548. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9422-5>.
24. **Gromadzka G, Karpińska A, Przybyłkowski A, et al.** Treatment with D-penicillamine or zinc sulphate affects copper metabolism and improves but not normalizes antioxidant capacity parameters in Wilson disease. *Biometals.* 2014;27(1):207–215. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9694-3>.
25. **Spallholz JE.** Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Adv Exp Med Biol.* 1990;262:145-158. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0553-8_12.

26. **Ferenci P.** Phenotype-genotype correlations in patients with Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1315:1-5. <https://doi.org/10.1111/nyas.12340>.
27. **Ferenci P, Stremmel W, Członkowska A, et al.** Age and Sex but Not ATP7B Genotype Effectively Influence the Clinical Phenotype of Wilson Disease. *Hepatology.* 2019;69(4):1464-1476. <https://doi.org/10.1002/hep.30280>.
28. **Litwin T, Gromadzka G, Członkowska A.** Gender differences in Wilson's disease. *J Neurol Sci.* 2012;312(1-2):31-35. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.08.028>.
29. **Li X, Feng Z, Tang W, et al.** Sex Differences in Clinical Characteristics and Brain MRI Change in Patients With Wilson's Disease in a Chinese Population. *Front Physiol.* 2018;9:1429. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01429>.
30. **Członkowska A, Ciesielska A, Gromadzka G, Kurkowska-Jastrzebska I.** Gender differences in neurological disease: role of estrogens and cytokines. *Endocrine.* 2006;29(2):243-256. <https://doi.org/10.1385/ENDO:29:2:243>.
31. **Schilsky ML, Roberts EA, Bronstein JM, et al.** A multidisciplinary approach to the diagnosis and management of Wilson disease: 2022 Practice Guidance on Wilson disease from the American Association for the Study of Liver Diseases [published online ahead of print, 2022 Dec 7]. *Hepatology.* 2022. <https://doi.org/10.1002/hep.32801>.
32. **Przybyłkowski A, Gromadzka G, Chabik G, et al.** Liver cirrhosis in patients newly diagnosed with neurological phenotype of Wilson's disease. *Funct Neurol.* 2014;29(1):23-29.
33. **Litwin T, Gromadzka G, Szpak GM, et al.** Brain metal accumulation in Wilson's disease. *J Neurol Sci.* 2013;329(1-2):55-58. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.03.021>.
34. **Scheiber IF, Brůha R, Dušek P.** Pathogenesis of Wilson disease. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:43–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00005-7>.
35. **Bertrand E, Lewandowska E, Szpak GM, et al.** Neuropathological analysis of pathological forms of astroglia in Wilson's disease. *Folia Neuropathol.* 2001;39(2):73-79.
36. **Dusek P, Litwin T, Członkowska A.** Neurologic impairment in Wilson disease. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 2):S64. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.02.43>.
37. **Vogel FS, Evans JW.** Morphologic alterations produced by copper in neural tissues with consideration of the role of the metal in the pathogenesis of Wilson's disease. *J Exp Med.* 1961;113(6):997–1004. <https://doi.org/10.1084/jem.113.6.997>.
38. **Tarnacka B, Członkowska A.** Choroba Wilsona. *Pol. Przegl. Neurol.* 2008;4(3):125-128.

39. **Wiernicka A, Dądalcki M, Jańczyk W, et al.** Early Onset of Wilson Disease: Diagnostic Challenges. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;65(5):555-560. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001700>.
40. **Ala A, Borjigin J, Rochwarger A, et al.** Wilson disease in septuagenarian siblings: Raising the bar for diagnosis. *Hepatology.* 2005;41(3):668–670. <https://doi.org/10.1002/hep.20601>.
41. **Liver European Association for Study of.** EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of hepatology.* 2012;56(3):671–685. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.11.007>.
42. **Antos A, Litwin T, Skowrońska M, et al.** Diagnostyka choroby Wilsona — aktualne zalecenia. *Pol. Przegl. Neurol.* 2020;16(4):209–222.
43. **Członkowska A, Litwin T, Chabik G.** Wilson disease: neurologic features. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:101–119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00010-0>.
44. **Svetel M, Potrebić A, Pekmezović T, et al.** Neuropsychiatric aspects of treated Wilson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15(10):772–775. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.01.010>.
45. **Roessler-Górecka M, Seniów J.** Psychopathology in Wilson's disease: a review. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia/Neuropsychiatry and Neuropsychology.* 2015;10(2):47-54.
46. **Litwin T, Dusek P, Szafranski T, et al.** Psychiatric manifestations in Wilson's disease: possibilities and difficulties for treatment. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2018;8(7):199-211. <https://doi.org/10.1177/2045125318759461>.
47. **Seniów J, Bak T, Gajda J, et al.** Cognitive functioning in neurologically symptomatic and asymptomatic forms of Wilson's disease. *Mov Disord.* 2002;17(5):1077–1083. <https://doi.org/10.1002/mds.10195>.
48. **Zimbrea PC, Schilsky ML.** Psychiatric aspects of Wilson disease: a review. *Gen Hosp Psychiatry.* 2014;36(1):53–62. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsy.2013.08.007>.
49. **Dening TR, Berrios GE.** Wilson's disease: a longitudinal study of psychiatric symptoms. *Biol Psychiatry.* 1990;28(3):255–265. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(90\)90581-1](https://doi.org/10.1016/0006-3223(90)90581-1).
50. **Dzięcy-Jaworska K, Litwin T, Członkowska A.** Clinical manifestations of Wilson disease in organs other than the liver and brain. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 2):S62. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.03.30>.

51. **Langwińska-Wośko E, Litwin T, Dzieżyc K, et al.** The sunflower cataract in Wilson's disease: pathognomonic sign or rare finding? *Acta Neurol Belg.* 2016;116(3):325–328. <https://doi.org/10.1007/s13760-015-0566-1>.
52. **Canelas HM, Carvalho N, Scaff M, et al.** Osteoarthropathy of hepatolenticular degeneration. *Acta Neurol Scand.* 1978;57(6):481–487. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1978.tb02851.x>.
53. **Chevalier K, Benyounes N, Obadia MA, et al.** Cardiac involvement in Wilson disease: Review of the literature and description of three cases of sudden death. *J Inherit Metab Dis.* 2021;44(5):1099–1112. <https://doi.org/10.1002/jimd.12418>.
54. **Tarnacka B, Rodo M, Cichy S, et al.** Procreation ability in Wilson's disease. *Acta Neurol Scand.* 2000;101(6):395–398. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2000.90140a.x>.
55. **Bearn AG, Yu TF, Gutman AB.** Renal function in Wilson's disease. *J Clin Invest.* 1957;36(7):1107–1114. <https://doi.org/10.1172/JCI103506>.
56. **Leu ML, Strickland GT, Wang CC, et al.** Skin pigmentation in Wilson's disease. *JAMA.* 1970;211(9):1542–1543.
57. **Merle U, Schaefer M, Ferenci P, et al.** Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut.* 2007;56(1):115–120. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.087262>.
58. **Woimant F, Djebrani-Oussedik N, Poujois A.** New tools for Wilson's disease diagnosis: exchangeable copper fraction. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 2):S70. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.03.02>.
59. **El Balkhi S, Trocello JM, Poupon J, et al.** Relative exchangeable copper: a new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis. *Clin Chim Acta.* 2011;412(23–24):2254–2260. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.08.019>.
60. **Guillaud O, Brunet AS, Mallet I, et al.** Relative exchangeable copper: A valuable tool for the diagnosis of Wilson disease. *Liver Int.* 2018;38(2):350–357. <https://doi.org/10.1111/liv.13520>.
61. **Trocello JM, El Balkhi S, Woimant F, et al.** Relative exchangeable copper: a promising tool for family screening in Wilson disease. *Mov Disord.* 2014;29(4):558–562. <https://doi.org/10.1002/mds.25763>.
62. **Smallwood RA, Williams HA, Rosenoer VM, et al.** Liver-copper levels in liver disease: studies using neutron activation analysis. *Lancet.* 1968;2(7582):1310–1313. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(68\)91814-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(68)91814-x).

63. **Członkowska A, Rodo M, Wierzchowska-Ciok A, et al.** Accuracy of the radioactive copper incorporation test in the diagnosis of Wilson disease. *Liver Int.* 2018;38(10):1860-1866. <https://doi.org/10.1111/liv.13715>.
64. **Espinós C, Ferenci P.** Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice? *JHEP Rep.* 2020;2(4):100114. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100114>.
65. **Dusek P, Smolinski L, Redzia-Ogrodnik B, et al.** Semiquantitative Scale for Assessing Brain MRI Abnormalities in Wilson Disease: A Validation Study. *Mov Disord.* 2020;35(6):994–1001. <https://doi.org/10.1002/mds.28018>.
66. **Ferenci P, Caca K, Loudianos G, et al.** Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int.* 2003;23(3):139-142. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0676.2003.00824.x>.
67. **Antos A, Litwin T, Skowrońska M, et al.** Leczenie choroby Wilsona — aktualne zalecenia. *Pol. Przegl. Neurol.* 2020;16(4):223-238. <https://dx.doi.org/10.5603/PPN.2020.0033>.
68. **Walshe JM.** History of Wilson disease: a personal account. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:1-5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00001-X>.
69. **Członkowska A, Litwin T.** Wilson disease - currently used anticopper therapy. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:181-191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00015-X>.
70. **Roberts EA, Schilsky ML, American Association for Study of Liver Diseases (AASLD).** Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology.* 2008;47(6):2089-2111. <https://doi.org/10.1002/hep.22261>.
71. **Dziężyc K, Litwin T, Chabik G, et al.** Measurement of urinary copper excretion after 48-h d-penicillamine cessation as a compliance assessment in Wilson's disease. *Funct Neurol.* 2015;30(4):264–268. <https://doi.org/10.11138/fneur/2015.30.4.264>.
72. **Walshe JM.** Management of penicillamine nephropathy in Wilson's disease: a new chelating agent. *Lancet.* 1969;2(7635):1401-1402. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(69\)90940-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(69)90940-4).
73. **Socha P, Janczyk W, Dhawan A, et al.** Wilson's Disease in Children: A Position Paper by the Hepatology Committee of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66(2):334–344. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001787>.
74. **Appenzeller-Herzog C, Mathes T, Heeres MLS, et al.** Comparative effectiveness of common therapies for Wilson disease: A systematic review and meta-analysis

- of controlled studies. *Liver Int.* 2019;39(11):2136-2152.
<https://doi.org/10.1111/liv.14179>.
75. **Tang S, Bai L, Hou W, et al.** Comparison of the Effectiveness and Safety of d-Penicillamine and Zinc Salt Treatment for Symptomatic Wilson Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol.* 2022;13:847436.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.847436>.
76. **Weiss KH, Gotthardt DN, Klemm D, et al.** Zinc monotherapy is not as effective as chelating agents in treatment of Wilson disease. *Gastroenterology.* 2011;140(4):1189-1198.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.12.034>.
77. **Linn FH, Houwen RH, van Hattum J, et al.** Long-term exclusive zinc monotherapy in symptomatic Wilson disease: experience in 17 patients. *Hepatology.* 2009;50(5):1442-1452. <https://doi.org/10.1002/hep.23182>.
78. **Żeromski J.** Właściwości immunologiczne układu nerwowego. W *Neuroimmunologia kliniczna*, pod red. Losy J. Lublin: Czelej; 2015, 1-12.
79. **Polak K, Ząbczyńska M, Pocheć E.** Rola N-glikozylacji fragmentu Fc IgG w cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC). *Postępy Biologii Komórki.* 2019;46(1):75-92.
80. **Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T.** IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>.
81. **Schroeder HW Jr, Cavacini L.** Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S41–S52.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.
82. **Akbar R, Robert PA, Pavlović M, et al.** A compact vocabulary of paratope-epitope interactions enables predictability of antibody-antigen binding. *Cell Rep.* 2021;34(11):108856. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108856>.
83. **Gunti S, Notkins AL.** Polyreactive Antibodies: Function and Quantification. *J Infect Dis.* 2015;212(Suppl 1):S42–S46. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu512>.
84. **Jakóbisiak M, Lasek W, Makowski M.** Przeciwciała. W: *Immunologia*, pod red. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2017, 20-46.
85. **Nowis D, Wańkowicz-Kalińska A, Winiarska M.** Zjawiska autoimmunizacyjne. W: *Immunologia*, pod red. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2017, 362-382.
86. **Czaja AJ, Homburger HA.** Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology.* 2001;120(1):239–249. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.20223>.

87. **Tomer Y, Shoenfeld Y.** The significance of natural autoantibodies. *Immunol Invest.* 1988;17(5):389–424. <https://doi.org/10.3109/08820138809049846>.
88. **Dighiero G.** Natural autoantibodies, tolerance, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;815:182–192. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb52059.x>.
89. **Sheldon J.** Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2004;18(3):249-269. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2004.03.007>.
90. **Lyons R, Narain S, Nichols C, et al.** Effective use of autoantibody tests in the diagnosis of systemic autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1050:217-228. <https://doi.org/10.1196/annals.1313.023>.
91. **Oldstone MB.** Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J.* 1998;12(13):1255-1265. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.13.1255>.
92. **Bhagavati S.** Autoimmune Disorders of the Nervous System: Pathophysiology, Clinical Features, and Therapy. *Front Neurol.* 2021;12:664664. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.664664>.
93. **Ang CW, Jacobs BC, Laman JD.** The Guillain-Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol.* 2004;25(2):61-66. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.12.004>.
94. **Armangue T, Spatola M, Vlasea A, et al.** Frequency, symptoms, risk factors, and outcomes of autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: a prospective observational study and retrospective analysis. *Lancet Neurol.* 2018;17(9):760-772. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30244-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30244-8).
95. **Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, et al.** Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol.* 2007;61(1):25-36. <https://doi.org/10.1002/ana.21050>.
96. **Graus F, Dalmau J.** Paraneoplastic neurological syndromes in the era of immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(9):535-548. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0194-4>.
97. **Cooper GS, Stroehla BC.** The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2003;2(3):119-125. [https://doi.org/10.1016/s1568-9972\(03\)00006-5](https://doi.org/10.1016/s1568-9972(03)00006-5).
98. **Hayter SM, Cook MC.** Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2012;11(10):754-765. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.02.001>.
99. **Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK.** Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest.* 2015;125(6):2228-2233. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>.

100. **Willer CJ, Dymment DA, Risch NJ, et al.** Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12877-12882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1932604100>.
101. **Avidan N, Le Panse R, Berrih-Aknin S, et al.** Genetic basis of myasthenia gravis - a comprehensive review. *J Autoimmun.* 2014;52:146-153. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.001>.
102. **van Sonderen A, Roelen DL, Stoop JA, et al.** Anti-LGI1 encephalitis is strongly associated with HLA-DR7 and HLA-DRB4. *Ann Neurol.* 2017;81(2):193-198. <https://doi.org/10.1002/ana.24858>.
103. **Hong Y, Li HF, Romi F, et al.** HLA and MuSK-positive myasthenia gravis: A systemic review and meta-analysis. *Acta Neurol Scand.* 2018;138(3):219–226. <https://doi.org/10.1111/ane.12951>.
104. **Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, et al.** Autoantibody diagnostics in clinical practice. *Autoimmun Rev.* 2012;11(3):207-211. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.05.014>.
105. **Scofield RH.** Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet.* 2004;363(9420):1544-1546. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16154-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16154-0).
106. **Fischer K, Brzosko I, Brzosko M.** Autoprzeciwiała w praktyce reumatologicznej. *Forum Reumatol.* 2016; 2(1):39-50.
107. **Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, et al.** International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(1):17-23. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203863>.
108. **Tešija Kuna A, Đerek L, Drvar V, et al.** Assessment of antinuclear antibodies (ANA): National recommendations on behalf of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine. *Biochem Med.* 2021;31(2):020502. <https://doi.org/10.11613/BM.2021.020502>.
109. **Volkman ER, Taylor M, Ben-Artzi A.** Using the antinuclear antibody test to diagnose rheumatic diseases: when does a positive test warrant further investigation? *South Med J.* 2012;105(2):100-104. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e31824551a1>.
110. **Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, et al.** Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1601-1611. <https://doi.org/10.1002/art.1780400909>.
111. **American College of Rheumatology.** American College of Rheumatology Position Statement: Methodology of testing for antinuclear antibodies. 2019

[accessed 2023 May 10]. Available at:

https://www.rheumatology.org/Practice/Clinical/Position/Position_Statements/.

112. **Suwanchote S, Rachayon M, Rodsaward P, et al.** Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and their clinical significance. *Clin Rheumatol.* 2018;37(4):875-884. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4062-x>.
113. **Bosch X, Guilabert A, Font J.** Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet.* 2006;368(9533):404-418. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69114-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69114-9).
114. **Chang C, Gershwin ME.** Drugs and autoimmunity--a contemporary review and mechanistic approach. *J Autoimmun.* 2010;34(3):J266–J275. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.11.012>.
115. **Vedove CD, Del Giglio M, Schena D, et al.** Drug-induced lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res.* 2009;301(1):99-105. <https://doi.org/10.1007/s00403-008-0895-5>.
116. **Sechi E, Flanagan EP.** Antibody-Mediated Autoimmune Diseases of the CNS: Challenges and Approaches to Diagnosis and Management. *Front Neurol.* 2021;12:673339. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.673339>.
117. **Vincent A, Lang B, Kleopa KA.** Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. *Neuron.* 2006;52(1):123-138. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.024>.
118. **Schoser B, Eymard B, Datt J, et al.** Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS): a rare autoimmune presynaptic disorder often associated with cancer. *J Neurol.* 2017;264(9):1854-1863. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8541-9>.
119. **Titulaer MJ, Wirtz PW, Willems LN, et al.** Screening for small-cell lung cancer: a follow-up study of patients with Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Clin Oncol.* 2008;26(26):4276-4281. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.5133>.
120. **Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al.** A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet.* 2004;364(9451):2106-2112. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17551-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17551-X).
121. **Dubey D, Pittock SJ, Kelly CR, et al.** Autoimmune encephalitis epidemiology and a comparison to infectious encephalitis. *Ann Neurol.* 2018;83(1):166-177. <https://doi.org/10.1002/ana.25131>.
122. **Lancaster E.** Autoantibody Encephalitis: Presentation, Diagnosis, and Management. *J Clin Neurol.* 2022;18(4):373-390. <https://doi.org/10.3988/jcn.2022.18.4.373>.

123. **Lang K, Prüss H.** Frequencies of neuronal autoantibodies in healthy controls: Estimation of disease specificity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2017;4(5):e386. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000386>.
124. **Prüss H.** Autoantibodies in neurological disease. *Nat Rev Immunol.* 2021;11:1-16. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00543-w>.
125. **Cotzomi E, Stathopoulos P, Lee CS, et al.** Early B cell tolerance defects in neuromyelitis optica favour anti-AQP4 autoantibody production. *Brain.* 2019;142(6):1598-1615. <https://doi.org/10.1093/brain/awz106>.
126. **Hara M, Martinez-Hernandez E, Ariño H, et al.** Clinical and pathogenic significance of IgG, IgA, and IgM antibodies against the NMDA receptor. *Neurology.* 2018;90(16):e1386-e1394. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005329>.
127. **Dalakas MC.** Autoimmune Neurological Disorders with IgG4 Antibodies: a Distinct Disease Spectrum with Unique IgG4 Functions Responding to Anti-B Cell Therapies. *Neurotherapeutics.* 2022;19(3):741-752. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01210-1>.
128. **Rawlings DJ, Metzler G, Wray-Dutra M, et al.** Altered B cell signalling in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(7):421-436. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.24>.
129. **Kreye J, Wright SK, van Casteren A, et al.** Encephalitis patient-derived monoclonal GABAA receptor antibodies cause epileptic seizures. *J Exp Med.* 2021;218(11):e20210012. <https://doi.org/10.1084/jem.20210012>.
130. **Kornau HC, Kreye J, Stumpf A, et al.** Human Cerebrospinal Fluid Monoclonal LGI1 Autoantibodies Increase Neuronal Excitability. *Ann Neurol.* 2020;87(3):405-418. <https://doi.org/10.1002/ana.25666>.
131. **Wenke NK, Kreye J, Andrzejak E, et al.** N-methyl-D-aspartate receptor dysfunction by unmutated human antibodies against the NR1 subunit. *Ann Neurol.* 2019;85(5):771-776. <https://doi.org/10.1002/ana.25460>.
132. **Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, et al.** Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *J Neurosci.* 2012;32(32):11082-11094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0064-12.2012>.
133. **Moscato EH, Peng X, Jain A, et al.** Acute mechanisms underlying antibody effects in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Ann Neurol.* 2014;76(1):108-119. <https://doi.org/10.1002/ana.24195>.

134. **Lancaster E, Lai M, Peng X, et al.** Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):67-76. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70324-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70324-2).
135. **Crisp SJ, Dixon CL, Jacobson L, et al.** Glycine receptor autoantibodies disrupt inhibitory neurotransmission. *Brain.* 2019;142(11):3398-3410. <https://doi.org/10.1093/brain/awz297>.
136. **Graus F, Titulaer MJ, Balu R, et al.** A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol.* 2016;15(4):391-404. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00401-9).
137. **Patel A, Meng Y, Najjar A, et al.** Autoimmune Encephalitis: A Physician's Guide to the Clinical Spectrum Diagnosis and Management. *Brain Sci.* 2022;12(9):1130. <https://doi.org/10.3390/brainsci12091130>.
138. **Uy CE, Binks S, Irani SR.** Autoimmune encephalitis: clinical spectrum and management. *Pract Neurol.* 2021;21(5):412-423. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2020-002567>.
139. **Hansen N, Juhl AL., Grenzer IM, et al.** Prevalence of Anti-neural Autoantibodies in a Psychiatric Patient Cohort-Paradigmatic Application of Criteria for Autoimmune-Based Psychiatric Syndromes. *Front Psychiatry.* 2022;13:864769. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.864769>.
140. **Gordon-Lipkin E, Yeshokumar AK, Saylor D, et al.** Comparative Outcomes in Children and Adults With Anti- N-Methyl-D-Aspartate (anti-NMDA) Receptor Encephalitis. *J Child Neurol.* 2017;32(11):930-935. <https://doi.org/10.1177/0883073817720340>.
141. **Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, et al.** Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol.* 2010;9(8):776-785. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70137-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70137-X).
142. **Rodriguez A, Klein CJ, Sechi E, et al.** LGI1 antibody encephalitis: acute treatment comparisons and outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2022;93(3):309-315. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-327302>.
143. **Lang B, Newsom-Davis J, Wray D, et al.** Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. *Lancet.* 1981;2(8240):224-226. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)90474-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)90474-8).
144. **Marquetand J, van Lessen M, Bender B, et al.** Slowly progressive LGI1 encephalitis with isolated late-onset cognitive dysfunction: a treatable mimic of Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2016;23(5):e28-e29. <https://doi.org/10.1111/ene.12939>.

145. **McKeon A, Marnane M, O'connell M, et al.** Potassium channel antibody associated encephalopathy presenting with a frontotemporal dementia like syndrome. *Arch Neurol.* 2007;64(10):1528-1530.
<https://doi.org/10.1001/archneur.64.10.1528>.
146. **Schumacher H, Meyer T, Prüss H.** GABAB receptor encephalitis in a patient diagnosed with amyotrophic lateral sclerosis. *BMC neurology.* 2019;19(1):41.
<https://doi.org/10.1186/s12883-019-1269-7>.
147. **Maat P, de Beukelaar JW, Jansen C, et al.** Pathologically confirmed autoimmune encephalitis in suspected Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;2(6):e178.
<https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000178>.
148. **Czlonkowska A, Milewski B.** Immunological observations on patients with Wilson's disease. *J Neurol Sci.* 1976;29(2-4):411-421.
[https://doi.org/10.1016/0022-510X\(76\)90188-X](https://doi.org/10.1016/0022-510X(76)90188-X).
149. **Czlonkowska A.** The influence of prolonged treatment with D-penicillamine on the immune response in Wilson's disease. *Eur J Clin Pharmacol.* 1977;12:265-271. <https://doi.org/10.1007/BF00607425>.
150. **Bonham M, O'Connor JM, Hannigan BM, et al.** The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *Br J Nutr.* 2002;87(5):393-403.
<https://doi.org/10.1079/BJNBJN2002558>.
151. **Landriscina M, Bagalá C, Mandinova A, et al.** Copper induces the assembly of a multiprotein aggregate implicated in the release of fibroblast growth factor 1 in response to stress. *J Biol Chem.* 2001;276(27):25549-25557.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M102925200>.
152. **Percival SS.** Copper and immunity. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(5 Suppl):1064S-1068S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.1064S>.
153. **Goyal MK, Sinha S, Patil SA, et al.** Do cytokines have any role in Wilson's disease? *Clin Exp Immunol.* 2008;54(1):74-79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03755.x>.
154. **Wu P, Dong J, Cheng N, et al.** Inflammatory cytokines expression in Wilson's disease. *Neurol Sci.* 2019;40:1059-1066. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3680-z>.
155. **Terwel D, Löschmann YN, Schmidt HH, et al.** Neuroinflammatory and behavioural changes in the Atp7B mutant mouse model of Wilson's disease. *J Neurochem.* 2011;118(1):105-112. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07278.x>.

156. **Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD.** Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*. 1995;2(4):241-248.
<https://doi.org/10.1159/000097202>.
157. **Filipov NM.** Chapter Six - Overview of Peripheral and Central Inflammatory Responses and Their Contribution to Neurotoxicity. W: *Role of Inflammation in Environmental Neurotoxicity*, pod red. Aschner M, Costa LG. Cambridge: Academic Press; 2019, 169-193. <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2018.10.001>.
158. **Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C.** Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*. 2016;13:267-276.
<http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2016.3>.
159. **Prytz H, Bjerneboe M, Christoffersen P, et al.** Correlation between hepatic morphology and immunoglobulins and antibodies to Escherichia coli in cirrhosis. *Gut*. 1977;18:28-32. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.18.1.28>.
160. **Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M.** Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*. 2014;61(6):1385-1396.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.010>.
161. **Enzenauer RJ, West SG, Rubin RL.** D-penicillamine-induced lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1990;33:1582-1585.
<http://dx.doi.org/10.1002/art.1780331018>.
162. **Kang S, Cho MH, Hyun H, et al.** A Pediatric Case of a D-Penicillamine Induced ANCA-associated Vasculitis Manifesting a Pulmonary-Renal Syndrome. *J Korean Med Sci*. 2019;34(24):e173. <https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e173>.
163. **Poulas K, Koutsouraki E, Kordas G, et al.** Anti-MuSK- and anti-AChR-positive myasthenia gravis induced by d-penicillamine. *J Neuroimmunol*. 2012;250:94-98.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.05.011>.
164. **Jaffe IA.** Induction of auto-immune syndromes by penicillamine therapy in rheumatoid arthritis and other diseases. *Springer Semin Immunopathol*. 1981;4(2):193-207. <https://doi.org/10.1007/BF01857095>.
165. **Li J, Uetrecht JP.** D-penicillamine-induced autoimmunity: relationship to macrophage activation. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(9):1526-1533.
<https://doi.org/10.1021/tx900128p>.
166. **Masson MJ, Teranishi M, Shenton JM, et al.** Investigation of the involvement of macrophages and T cells in D-penicillamine-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. *J Immunotoxicol*. 2004;1(2):79-93.
<https://doi.org/10.1080/15476910490496258>.

167. **Zhu X, Li J, Liu F, et al.** Involvement of T helper 17 cells in D-penicillamine-induced autoimmune disease in Brown Norway rats. *Toxicol Sci.* 2011;120(2):331-338. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq392>.
168. **Lutsenko S.** Modifying factors and phenotypic diversity in Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1315:56-63. <https://doi.org/10.1111/nyas.12420>.
169. **Wu J, Li L.** Autoantibodies in Alzheimer's disease: potential biomarkers, pathogenic roles, and therapeutic implications. *J Biomed Res.* 2016;30(5):361-372. <https://doi.org/10.7555/JBR.30.20150131>.
170. **van de Warrenburg BPC, Church AJ, Martino D, et al.** Antineuronal antibodies in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008;23(7):958-963. <https://doi.org/10.1002/mds.21929>.
171. **Antos A, Litwin T, Przybylkowski A, et al.** D-penicillamine-induced lupus erythematosus as an adverse reaction of treatment of Wilson's Disease. *Neurol Neurochir Pol.* 2021;55(6):595-597. <https://doi.org/10.5603/PJNNS.a2021.0080>.
172. **Lee Y, Lee ST, Cho H.** D-penicillamine-induced ANA (+) ANCA (+) vasculitis in pediatric patients with Wilson's disease. *Clin Nephrol.* 2016;85:296-300. <http://dx.doi.org/10.5414/CN108763>.
173. **Czlonkowska A.** Myasthenia syndrome during penicillamine treatment. *Br Med J.* 1975;2(5973):726-727. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5973.726-a>.
174. **Bienaimé F, Clerbaux G, Plaisier E, et al.** D-Penicillamine-induced ANCA-associated crescentic glomerulonephritis in Wilson disease. *Am J Kidney Dis.* 2007;50:821-825. <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2007.05.026>.
175. **Ingen-Housz-Oro S, Grootenboer-Mignot S, Ortonne N, et al.** Epidermolysis bullosa acquisita-like eruption with anticollagen VII autoantibodies induced by D-penicillamine in Wilson disease. *Br J Dermatol.* 2014;171:1574-1576. <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.13153>.
176. **Seessle J, Gotthardt DN, Schäfer M, et al.** Concomitant immune-related events in Wilson disease: implications for monitoring chelator therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2016;39:125-130. <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-015-9866-0>.
177. **Czlonkowska A, Tarnacka B, Litwin T, et al.** Wilson's disease-cause of mortality in 164 patients during 1992-2003 observation period. *J Neurol.* 2005;252(6):698-703. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0720-4>.
178. **Czlonkowska A, Tarnacka B, Möller JC, et al.** Unified Wilson's Disease Rating Scale-a proposal for the neurological scoring of Wilson's disease patients. *Neurol Neurochir Pol.* 2007;41(1):1-12.

179. **Członkowska A, Litwin T, Dzieżyc K, et al.** Characteristics of a newly diagnosed Polish cohort of patients with neurological manifestations of Wilson disease evaluated with the Unified Wilson's Disease Rating Scale. *BMC Neurol.* 2018;18(1):34. <http://dx.doi.org/10.1186/s12883-018-1039-y>.
180. **Członkowska A, Litwin T, Karliński M, et al.** D-penicillamine versus zinc sulfate as first-line therapy for Wilson's disease. *Eur J Neurol.* 2014;21(4):599-606. <https://doi.org/10.1111/ene.12348>.
181. **Antczak-Kowalska M, Członkowska A, Eyiletten C, et al.** Autoantibodies in Wilson disease: Impact on clinical course. *JIMD Rep.* 2022;63(5):508-517. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12317>.
182. **Jańczyk W, Bierła JB, Trojanowska I, et al.** Prevalence and Significance of Autoantibody Seropositivity in Children with Wilson's Disease. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(4):768. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040768>.
183. **Grygiel-Górniak B, Rogacka N, Puszczewicz M.** Antinuclear antibodies in healthy people and non-rheumatic diseases - diagnostic and clinical implications. *Reumatologia.* 2018;56(4):243-248. <https://doi.org/10.5114/reum.2018.77976>.
184. **Kurki P, Gripenberg M, Teppo AM, et al.** Profiles of antinuclear antibodies in chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis and alcoholic liver disease. *Liver.* 1984;4:134-138. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1984.tb00918.x>.
185. **Muratori P, Muratori L, Ferrari R, et al.** Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:431-437. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2003.07257.x>.
186. **Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al.** Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349(16):1526-1533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021933>.
187. **Moroni L, Bianchi I, Lleo A.** Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2012;11(6-7):A386-A392. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.012>.
188. **Ferenci P.** Diagnosis of Wilson disease. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:171-180. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00014-8>.
189. **Dara N, Imanzadeh F, Sayyari AA, et al.** Simultaneous Presentation of Wilson's Disease and Autoimmune Hepatitis; A Case Report and Review of Literature. *Hepat Mon.* 2015;15(6):e29043. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.29043>.
190. **Yener S, Akarsu M, Karacanci C, et al.** Wilson's disease with coexisting autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19(1):114-116. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03254.x>.

191. **Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al.** International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1999;31(5):929-938. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(99\)80297-9](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(99)80297-9).
192. **Lian M, Hua J, Sheng L, et al.** Prevalence and significance of autoantibodies in patients with alcoholic liver disease. *J Dig Dis.* 2013;14(7):396-401. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12057>.
193. **Łapiński TW, Rogalska-Płońska M, Parfieniuk-Kowerda A, et al.** The occurrence of autoantibodies in patients with chronic HCV infection, including patients dialyzed and after kidney transplantation. *Clin Exp Hepatol.* 2016;2(4):161-166. <https://doi.org/10.5114/ceh.2016.63874>.
194. **de Castro GLC, da Silva Graça Amoras E, Araújo MS, et al.** High prevalence of antinuclear antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Eur J Med Res.* 2022;27(1):180. <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00809-6>.
195. **Acay A, Demir K, Asik G, et al.** Assessment of the Frequency of Autoantibodies in Chronic Viral Hepatitis. *Pak J Med Sci.* 2015;31(1):150-154. <https://doi.org/10.12669/pjms.311.6053>.
196. **Stroffolini T, Colloredo G, Gaeta GB, et al.** Does an 'autoimmune' profile affect the clinical profile of chronic hepatitis C? An Italian multicentre survey. *J Viral Hepat.* 2004;11(3):257-262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2004.00489.x>.
197. **Hsieh MY, Dai CY, Lee LP, et al.** Antinuclear antibody is associated with a more advanced fibrosis and lower RNA levels of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pathol.* 2008;61(3):333-337. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.046276>.
198. **Chrétien P, Chousterman M, Abd Alsamad I, et al.** Non-organ-specific autoantibodies in chronic hepatitis C patients: association with histological activity and fibrosis. *J Autoimmun.* 2009;32(3-4):201-205. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.02.005>.
199. **Chen CH, Lee CM, Chen CH, et al.** Prevalence and clinical relevance of serum autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. *Chang Gung Med J.* 2010;33(3):258-265.
200. **Peng YC, Hsieh SC, Yang DY, et al.** Expression and clinical significance of antinuclear antibody in hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol.* 2001;33(5):402-406. <https://doi.org/10.1097/00004836-200111000-00012>.
201. **Adams LA, Lindor KD, Angulo P.** The prevalence of autoantibodies and autoimmune hepatitis in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(7):1316-1320. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.30444.x>.

202. **Luo L, Ma Q, Lin L, et al.** Prevalence and Significance of Antinuclear Antibodies in Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2022;2022:8446170. <https://doi.org/10.1155/2022/8446170>.
203. **Yodoshi T, Orkin S, Arce-Clachar AC, et al.** Significance of autoantibody seropositivity in children with obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Pediatr Obes*. 2021;16(1):e12696. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12696>.
204. **Vidali M, Stewart SF, Albano E.** Interplay between oxidative stress and immunity in the progression of alcohol-mediated liver injury. *Trends Mol Med*. 2008;14(2):63-71. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.005>.
205. **Kurien BT, Scofield RH.** Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev*. 2008;7(7):567-573. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.04.019>.
206. **Lynch SM, Frei B.** Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 1993;34(10):1745-1753.
207. **Schmalz G, Schuster U, Schweikl H.** Influence of metals on IL-6 release in vitro. *Biomaterials*. 1998;19(18):1689-1694. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00075-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00075-1).
208. **Borchard S, Raschke S, Zak KM, et al.** Bis-choline tetrathiomolybdate prevents copper-induced blood-brain barrier damage. *Life Sci Alliance*. 2021;5(3):e202101164. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101164>.
209. **Stuerenburg HJ.** CSF copper concentrations, blood-brain barrier function, and ceruloplasmin synthesis during the treatment of Wilson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2000;107(3):321-329. <https://doi.org/10.1007/s007020050026>.
210. **Misztal M, Czlonkowska A, Cudna A, et al.** Impact of treatment on blood-brain barrier impairment in Wilson's disease. *Neurol Neurochir Pol*. 2023;57(4):379-386. <https://doi.org/10.5603/PJNNS.a2023.0053>.
211. **Heneka MT, O'Banion MK.** Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*. 2007;184(1-2):69-91. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.11.017>.
212. **Hirsch EC, Hunot S.** Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 2009;8(4):382-397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70062-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6).
213. **Björkqvist M, Wild EJ, Tabrizi SJ.** Harnessing immune alterations in neurodegenerative diseases. *Neuron*. 2009;64(1):21-24. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.034>.

214. **Miller ZA, Rankin KP, Graff-Radford NR, et al.** TDP-43 frontotemporal lobar degeneration and autoimmune disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(9):956-962. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-304644>.
215. **Katisko K, Solje E, Koivisto AM, et al.** Prevalence of immunological diseases in a Finnish frontotemporal lobar degeneration cohort with the C9orf72 repeat expansion carriers and non-carriers. *J Neuroimmunol*. 2018;321:29-35. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.05.011>.
216. **Cavazzana I, Alberici A, Bonomi E, et al.** Antinuclear antibodies in Frontotemporal Dementia: the tip's of autoimmunity iceberg? *J Neuroimmunol*. 2018;325:61-63. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.006>.
217. **Li X, Sundquist J, Zöller B, et al.** Dementia and Alzheimer's disease risks in patients with autoimmune disorders. *Geriatr Gerontol Int*. 2018;18(9):1350-1355. <https://doi.org/10.1111/ggi.13488>.
218. **Wotton CJ, Goldacre MJ.** Associations between specific autoimmune diseases and subsequent dementia: retrospective record-linkage cohort study, UK. *J Epidemiol Community Health*. 2017;71(6):576-583. <https://doi.org/10.1136/jech-2016-207809>.
219. **Lin TM, Chen WS, Sheu JJ, et al.** Autoimmune rheumatic diseases increase dementia risk in middle-aged patients: A nationwide cohort study. *PLoS One*. 2018;13(1):e0186475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186475>.
220. **Williams GP, Muskat K, Frazier A, et al.** Unaltered T cell responses to common antigens in individuals with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2023;444:120510. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2022.120510>.
221. **Moiseev S, Cohen Tervaert JW, Arimura Y, et al.** 2020 international consensus on ANCA testing beyond systemic vasculitis. *Autoimmun Rev*. 2020;19(9):102618. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102618>.
222. **Folci M, Ramponi G, Solitano V, et al.** Serum ANCA as Disease Biomarkers: Clinical Implications Beyond Vasculitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2022;63(2):107-123. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08887-w>.
223. **Meenakshi-Sundaram S, Mahadevan A, Taly AB, et al.** Wilson's disease: a clinico-neuropathological autopsy study. *J Clin Neurosci*. 2008;15(4):409-417. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2006.07.017>.
224. **Sato M, Kishida D, Miyazaki D, et al.** A Patient with Limbic Encephalitis Associated with Anti-leucine-rich Glioma-inactivated 1 (LGI1) Antibody Presenting with Slowly Progressive Cognitive Impairment and Fluctuating Striatal Lesions. *Intern Med*. 2019;58(2):287-291. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.1082-18>.

225. **Giannoccaro MP, Gastaldi M, Rizzo G, et al.** Antibodies to neuronal surface antigens in patients with a clinical diagnosis of neurodegenerative disorder. *Brain Behav Immun.* 2021;96:106-112. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.05.017>.
226. **Budhram A, Nicolle MW, Yang L.** The Positive Predictive Value of Onconeural Antibody Testing: A Retrospective Review. *Can J Neurol Sci.* 2018;45(5):577-579. <https://doi.org/10.1017/cjn.2018.74>.
227. **Mackay G, Ahmad K, Stone J, et al.** NMDA receptor autoantibodies in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol.* 2012;259(9):1979-1981. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6489-3>.
228. **Angus-Leppan H, Rudge P, Mead S, et al.** Autoantibodies in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *JAMA Neurol.* 2013;70(7):919-922. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.2077>.
229. **Rossi M, Mead S, Collinge J, et al.** Neuronal antibodies in patients with suspected or confirmed sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(6):692-694. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308695>.
230. **Ferenci P.** Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet.* 2006;120(2):151-159. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0202-5>.
231. **Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, et al.** p.H1069Q mutation in ATP7B and biochemical parameters of copper metabolism and clinical manifestation of Wilson's disease. *Mov Disord.* 2006;21(2):245-248. <https://doi.org/10.1002/mds.20671>.
232. **Caca K, Ferenci P, Kühn HJ, et al.** High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. *J Hepatol.* 2001;35(5):575-581. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00219-7](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00219-7).
233. **Firneisz G, Lakatos PL, Szalay F, et al.** Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary. *Am J Med Genet.* 2002;108(1):23-28. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10220>.
234. **Maier-Dobersberger T, Ferenci P, Polli C, et al.** Detection of the His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction. *Ann Intern Med.* 1997;127(1):21-26. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-127-1-199707010-00004>.
235. **Stapelbroek JM, Bollen CW, van Amstel JK, et al.** The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J Hepatol.* 2004;41(5):758-763. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.07.017>.

236. **Balint B, Bhatia KP, Dalmau J.** "Antibody of Unknown Significance" (AUS): The Issue of Interpreting Antibody Test Results. *Mov Disord.* 2021;36(7):1543-1547. <https://doi.org/10.1002/mds.28597>.

9. Streszczenie

Wstęp

Choroba Wilsona (chW) jest rzadkim, dziedzicznym autosomalnie recesywnie, zaburzeniem metabolizmu miedzi, spowodowanym mutacjami w genie *ATP7B*, kodującym enzym biorący udział w wewnątrzkomórkowym transporcie miedzi. W rezultacie dochodzi do nadmiernego gromadzenia miedzi w wątrobie, mózgu i innych narządach. Na podstawie dominujących objawów klinicznych wyróżnia się postać wątrobową, neuropsychiatryczną lub bezobjawową. Celem leczenia chW jest uzyskanie prawidłowego bilansu miedzi w organizmie i zapobieganie rozwojowi lub progresji objawów, co wymaga systematycznej, trwającej do końca życia farmakoterapii. Powszechnie stosowane leki to D-penicylamina (D-p), która jest chelatorem zwiększającym wydalanie miedzi z moczem, oraz sole cynku, które zmniejszają wchłanianie miedzi w przewodzie pokarmowym.

Stan układu immunologicznego u pacjentów z chW pozostaje zagadnieniem słabo poznanym. Stwierdzone zaburzenia układu immunologicznego można wiązać z często występującą w tej grupie chorych marskością wątroby oraz bezpośrednim toksycznym wpływem miedzi na układ odpornościowy. Ponadto, D-p, często stosowana w leczeniu chW, wśród swoich działań niepożądanych, może indukować syntezę autoprzeciwciał. W związku z dynamicznym rozwojem neuroimmunologii, liczne zaburzenia OUN zostały ostatnio powiązane z syntezą przeciwciał przeciwoneuronalnych, natomiast nie badano, czy występują one w chW i czy mogą modyfikować przebieg choroby.

Cel pracy

Celem pracy jest zbadanie częstości występowania autoprzeciwciał – przeciwciał przeciwjądrowych (ANA), przeciwciał przeciwko cytoplazmie neutrofilów (ANCA), przeciwciał przeciw neuronalnym antygenom powierzchniowym (NSAbs) i przeciwciał onkoneuronalnych (ONA) u pacjentów z chW oraz ocena zależności między obecnością autoprzeciwciał a objawami klinicznymi i przebiegiem chW, a także analiza wpływu stosowanego leczenia na syntezę autoprzeciwciał.

Material i metody

Badano próbki surowicy 88 pacjentów z chW oraz 100 zdrowych ochotników. Pacjenci byli leczeni D-p lub siarczanem cynku (ZS) przez minimum 6 miesięcy. W grupie 36 chorych wykonano również oznaczenie autoprzeciwciał przed rozpoczęciem

leczenia. Oznaczano obecność w surowicy przeciwciał ANA, ANCA, NSAbs i ONA, z wykorzystaniem komercyjnych testów immunofluorescencji pośredniej i Western Blot.

Wyniki

Wszystkie badane autoprzeciwciała wykrywano częściej u pacjentów z chW niż u osób zdrowych, częstość wynosiła odpowiednio – ANA 21,6% vs 11,0% ($p=0,048$), ANCA 28,4% vs 15,0% ($p=0,025$), NSAbs 9,1% vs 2,0% ($p=0,031$), ONA 13,6% vs 5,0% ($p=0,039$). Różnica w częstości występowania autoprzeciwciał między grupami z neurologicznymi i wątrobowymi objawami chW nie osiągnęła istotności statystycznej, choć widoczna jest tendencja do zwiększenia częstości ANA, ANCA i ONA u pacjentów z objawami neurologicznymi. W grupie leczonej D-p ANA obserwowano częściej niż w grupie leczonej ZS (29,8% vs 12,2%, $p=0,045$), jednak nie towarzyszył temu wzrost częstości klinicznie jawnych chorób autoimmunologicznych.

Wnioski

Częstość autoprzeciwciał w badanej grupie pacjentów z chW była podwyższona w porównaniu z osobami zdrowymi. Rola autoprzeciwciał w patogenezie chW jest niejasna, ich występowanie może stanowić zjawisko wtórne, wynikające z uszkodzenia wątroby oraz toksycznego wpływu miedzi na układ immunologiczny. Choć nie stwierdzono wyraźnego związku z jawnymi chorobami autoimmunologicznymi, pacjenci, szczególnie przyjmujący D-p, powinni być uważnie monitorowani pod kątem autoimmunizacji, ze względu na podwyższoną częstość autoprzeciwciał.

10. Summary

Introduction

Wilson disease (WD) is a rare, autosomal recessive disorder of copper metabolism, caused by mutations in the *ATP7B* gene, which encodes an enzyme involved in intracellular copper transport. The result is excessive copper accumulation in the liver, brain, and other organs. Based on the predominant clinical manifestations, a distinction is made between hepatic, neuropsychiatric or asymptomatic forms. Treatment aims to achieve normal copper balance in the body and prevent the development or progression of symptoms, which requires systematic, lifelong pharmacotherapy. Commonly used drugs include D-penicillamine (D-p), which is a chelator that increases urinary copper excretion, and zinc salts, which reduce copper absorption in the gastrointestinal tract. The condition of the immune system in patients with WD remains poorly understood. The immune abnormalities found may be linked to the cirrhosis often present in this group of patients and the direct toxic effects of copper on the immune system. In addition, D-p, often used in the treatment of WD, among its side effects, can induce the synthesis of autoantibodies. With the rapid development of neuroimmunology, numerous neurological disorders have recently been linked to the synthesis of anti-neuronal antibodies, while whether they occur in WD and can modify the course of the disease has not been studied yet.

Aim

The aim of this study is to investigate the prevalence of autoantibodies – antinuclear antibodies (ANA), antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), neuronal surface antibodies (NSAbs), and onconeural antibodies (ONA) in patients with WD and to analyze the relationship between the presence of autoantibodies and the clinical manifestation and course of WD, as well as to investigate the effect of the applied treatment on autoantibody synthesis.

Material and methods

Serum samples from 88 WD patients and 100 healthy volunteers were studied. Patients had been treated with D-p or zinc sulfate (ZS); the minimum time of treatment was 6 months. Additionally, autoantibody presence before treatment initiation, as well as during therapy, was investigated in 36 patients. Samples of serum were tested for the presence

of ANA, ANCA, NSAbs, and ONA with the use of commercial indirect immunofluorescence and Western Blot assays.

Results

All tested autoantibodies were detected more frequently in patients with WD than in healthy volunteers, the frequency was respectively - ANA 21.6% vs 11.0% ($p=0.048$), ANCA 28.4% vs 15.0% ($p=0.025$), NSAbs 9.1% vs 2.0% ($p=0.031$), ONA 13.6% vs 5.0% ($p=0.039$). The difference in the prevalence of autoantibodies between the groups with neurological and hepatic manifestations of WD did not reach statistical significance, although there was a tendency for more frequent presence of ANA, ANCA, and ONA in patients with neurological manifestation. In the D-p-treated group, ANA was observed more frequently than in the ZS-treated group (29.8% vs 12.2%, $p=0.045$), but this was not accompanied by an increase in the frequency of clinically overt autoimmune diseases.

Conclusions

The frequency of autoantibodies in patients with WD was elevated compared to healthy subjects. The role of autoantibodies in the pathogenesis of WD is unclear; their occurrence may be a secondary phenomenon, resulting from liver damage and the toxic effects of copper on the immune system. Although no clear association with overt autoimmune diseases has been found, patients, especially those treated with D-p, should be carefully monitored for autoimmunity, due to the elevated presence of autoantibodies.