

Biomarkers of the central nervous system injury in Wilson's disease

Biomarkery uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w chorobie Wilsona

Agnieszka Antos¹, Tomasz Litwin¹, Adam Przybyłkowski², Jan Bembenek¹, Marta Skowrońska¹, Iwona Kurkowska-Jastrzębska¹, Łukasz Smoliński¹, Anna Członkowska¹

1 2nd Department of Neurology, Institute of Psychiatry and Neurology, Warsaw, Poland;
II Klinika Neurologii, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

2 Department of Gastroenterology and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Poland;
Klinika Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne, Warszawski
Uniwersytet Medyczny, Warszawa

ABSTRACT

Objectives. Wilson's disease (WD) is a genetically inherited disease associated with disorder of copper metabolism and its pathological deposition in many organs (mainly in the liver and brain) and their secondary damage. Clinical

symptoms of WD are mainly symptoms of liver damage (from a mild increase in the activity of liver enzymes to liver failure) and the central nervous system (CNS) (mainly a wide spectrum of involuntary movements). The article aims to review currently proposed biomarkers of CNS damage in WD: 1) clinical; 2) structural (neuroimaging) and 3) molecular, including a proposal of their future role (prognostic, diagnostic or monitoring of response to treatment).

Literature review. WD is one of the few metabolic diseases that can be treated if treatment is started early and is properly administered. Treatment of WD is based on drugs causing a negative copper balance in the body (drugs that chelate copper or zinc salts). Early diagnosis of the disease, early initiation of anti-copper therapy, regular monitoring of copper metabolism, evaluation of liver function and damage of central nervous system are essential for the good prognosis. We conducted a targeted literature review of articles in English available in PubMed, searching for "Wilson's disease", "biomarkers", "neurofilaments". Below we present summary of collected data. **Conclusions.** Despite treatment, 10% of patients with WD experience early neurological deterioration, 50% of patients with neurological symptoms show no improvement. New therapies of treatment for WD, possibilities of faster diagnosis and better monitoring of the treatment



Received 24.07.2022
Accepted: 4.11.2022

KEY WORDS:

- Wilson's disease
- clinical evaluation scales
- magnetic resonance imaging
- biomarkers
- neurofilaments

SŁOWA KLUCZOWE:

- choroba Wilsona
- skale oceny klinicznej
- rezonans magnetyczny
- biomarkery
- neurofilamenty

CORRESPONDENCE ADDRESS / ADRES DO KORESPONDENCJI

lek. Agnieszka Antos
Institute of Psychiatry and Neurology
2nd Department of Neurology
9 Sobieskiego Str., 02-957 Warsaw, Poland
phone: +48 22 45 82 537
email: agantos@ipin.edu.pl

are being sought. Identification and validation of WD biomarkers are necessary.

STRESZCZENIE

Cel. Choroba Wilsona (chW) to choroba uwarunkowana genetycznie związana z zaburzeniami metabolizmu miedzi, powodująca jej patologiczne odkładanie się w wielu narządach (głównie w wątrobie i mózgu) oraz ich wtórne uszkodzenia. Objawy kliniczne chW to głównie objawy uszkodzenia wątroby (od łagodnego wzrostu aktywności enzymów wątrobowych po niewydolność wątroby) oraz ośrodkowego układu nerwowego (głównie szerokie spektrum ruchów mimowolnych). Celem pracy jest przegląd aktualnie proponowanych biomarkerów uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w przebiegu chW: (1) klinicznych; (2) strukturalnych (neuroobrazowych) oraz (3) molekularnych, a także zaproponowanie określenia ich przyszłej roli (prognostycznej, diagnostycznej czy związanej z monitorowaniem reakcji na leczenie).

Przegląd piśmiennictwa. ChW należy do nielicznych chorób metabolicznych poddających się leczeniu – pod

warunkiem, że leczenie zostanie rozpoczęte na wczesnym etapie choroby i jest prawidłowo prowadzone. Leczenie chW opiera się na lekach powodujących ujemny bilans miedzi w organizmie (leki chelatujące miedź lub sole cynku). Zasadnicze znaczenie dla rokowania ma wczesne rozpoznanie choroby, wczesne rozpoczęcie leczenia przeciwmiędiowego, a później regularna kontrola metabolizmu miedzi, ocena wydolności wątroby oraz uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Przeprowadziliśmy celowany przegląd literatury – artykułów dostępnych w bazie PubMed w języku angielskim – w poszukiwaniu haseł: „choroba Wilsona”, „biomarkery”, „neurofilamenty”. Poniżej przedstawiamy podsumowanie zgromadzonych informacji.

Wnioski. Pomimo leczenia u 10% pacjentów z chW dochodzi do wczesnych pogorszeń neurologicznych, u 50% pacjentów z objawami neurologicznymi objawy się utrzymują. Poszukuje się nowych terapii, możliwości szybszego diagnozowania oraz skuteczniejszego monitorowania procesu leczenia choroby. Niezbędne dla badań nad chW i jej leczeniem jest określenie i zwalidowanie biomarkerów choroby.

Objective

This paper aims to review the currently proposed biomarkers of the central nervous system damage in the course of WD: (1) clinical, (2) structural (neuroimaging) and (3) molecular, and to propose the definition of their future role (prognostic, diagnostic or related to monitoring of the response to treatment).

Introduction

Wilson's disease (WD) is a congenital disease associated with abnormalities of copper metabolism, with its pathological deposition in tissues and secondary damage to many organs (mainly liver and brain) (Ferenci *et al.*, 2003; EASL, 2012).

The symptoms of WD mainly involve the liver (ranging from mild increase in the activity of liver enzymes to liver failure) and the central nervous system (CNS) – mainly involuntary movements and psychiatric symptoms (EASL, 2012).

Treatment of WD is based on the use of drugs that induce a negative balance of copper metabolism (Medici *et al.*, 2005; Schilsky, 2014; Członkowska and Litwin, 2017). Proper pharmacological treatment of WD has a beneficial effect in the majority of patients (improvement in the liver function, reduction in severity/subsidence of neurological symptoms) (EASL, 2012). It is assumed that 85%

of patients with WD have a good prognosis if they take anti-copper drugs correctly; therefore, WD is one of the few neurodegenerative diseases that can be successfully treated with pharmacotherapy (Członkowska *et al.*, 2005; Bruha *et al.*, 2011; Beinhardt *et al.*, 2014; Schilsky, 2014).

Clinical follow-up of WD treatment is mainly based on the assessment of copper metabolism, liver test results, neurological and possibly psychiatric assessment (Weiss and Stremmel, 2014; Litwin *et al.*, 2017). Reliable and sufficiently sensitive markers of liver and CNS damage in the course of WD are being sought, which could improve the diagnostic process and treatment of WD (EASL, 2012).

According to the World Health Organisation, biomarkers are any substances, structures or processes, measurable in an organism or its products, that allow to study of changes related to physiological status, diagnosis, prognosis of the occurrence, detection or treatment of the disease, and that can also be a measure of the effectiveness of treatment (Strimbu and Tavel, 2010).

Biomarkers can be divided into a number of subdivisions. The work below employs two of those divisions. The first, related primarily to the characteristics of biomarkers, divides them into so-called clinical biomarkers (clinical assessment scales), imaging biomarkers (i.e. neuroimaging, mainly magnetic resonance imaging [MRI]) and laboratory biomarkers (e.g. assessments of copper fractions, proteins in serum and cerebrospinal fluid, the so-called fluid biomarkers). The second division pertains to the use of biomarkers and distinguishes the following:

diagnostic biomarkers (assessing disease progression), prognostic biomarkers (mainly applicable in cancer), and monitoring the clinical response to interventions (treatment or new drug) (Strimbu and Tavel, 2010).

There are known biomarkers of liver damage. These include laboratory tests (liver function tests), liver failure scoring systems (e.g. Model of End Stage of Liver Disease [MELD]), and structural damage tests (imaging examination, elastography) (EASL, 2012). They allow patients with liver disease to be monitored for the treatment efficacy and safety, as well as to recognise early treatment failures qualifying these patients for liver transplantation or other type of anti-copper drug (EASL, 2012; Członkowska *et al.*, 2018a).

The objective, comparable assessment of the neurological status of patients with WD, as well as finding specific, objective and reliable quantitative biomarkers of CNS damage in the course of WD, have so far proved to be much more difficult (EASL, 2012; Litwin *et al.*, 2015; Litwin *et al.*, 2019). This issue is particularly relevant as neurological deterioration and the persistence of neurological symptoms despite treatment remain a challenge in WD and an unresolved therapeutic problem (Litwin *et al.*, 2015; Litwin *et al.*, 2017; Weiss *et al.*, 2017; Antos *et al.*, 2021).

In this article, the authors present the currently proposed biomarkers of CNS damage in WD, i.e. (1) clinical (clinical scales for neurological assessment); (2) imaging – neuroradiological; (3) the so-called laboratory biomarkers (proteins determined in neurodegenerative diseases that pretend to be biomarkers of CNS damage in WD, and various methods for measuring copper metabolism in the body) (Członkowska *et al.*, 2018a; Antos *et al.*, 2020a).

Literature review

We conducted a targeted literature review of articles available in the PubMed database, in the English language. We searched for the following keywords: “Wilson's disease”, “biomarkers”, and “neurofilaments”. Below is a summary of the data collected.

1. Clinical biomarkers – scales for neurological assessment in patients with WD

Initially, to assess neurological status, mainly descriptive data were used (type of syndrome was identified) (Ferenci *et al.*, 2003; Medici *et al.*, 2005; Członkowska *et al.*, 2018b), and zero-one scales (improvement – no improvement) or slightly more complex scales (scored 0–3 points: no symptoms, minor, moderate, severe, or worsening) were used to assess the treatment efficacy. A clinical scale for assessing neurological and functional deficits, the Unified Wilson's Disease Rating Scale (UWDRS) (Członkowska *et al.*, 2007), was introduced in 2007 and the Global Assessment Scale for WD (GAS for WD) – in 2009 (Aggarwal *et al.*,

2009). Several scales for visual subjective assessment of brain MRI have also been proposed, unfortunately, none of these has previously been a quantitative scale verified by correlations with clinical assessment scales (Prayer *et al.*, 1990; King *et al.*, 1996; Kozić *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 2013).

UWDRS (Unified Wilson's Disease Rating Scale)

In 2007, a team of neurologists and hepatologists from Poland, France, Germany, and the UK developed and validated the first scale for the clinical assessment of CNS damage in WD (Członkowska *et al.*, 2007). This scale consists of 3 parts. Part I addresses consciousness (scored 0–3 points); part II addresses activities of daily living (ADLs) and consists of subsections 2–11 scored from 0 to 4 points, depending on the severity of the deficits (maximum of 40 points); part III is a detailed neurological examination (maximum of 143 points). Each of the parts is assessed separately and, as shown in further works, its consistency and reliability are very good (Członkowska *et al.*, 2018b). Part II correlates positively with part III (disability with the severity of neurological deficits; $r = 0.84$; $p < 0.001$). In addition to being used in numerous research studies, the scale has also been included in clinical trials of new drugs for the treatment of WD (WTX101-201, ALXN1840, CHELATE) (Weiss *et al.*, 2017; Litwin *et al.*, 2019; Antos *et al.*, 2021), and is currently the primary tool for clinical assessment of CNS damage in WD (Smolinski *et al.*, 2019; Dusek *et al.*, 2020; Rędzia-Ogrodnik *et al.*, 2022; Ziemssen *et al.*, 2022a).

GAS for WD (Global Assessment Scale for WD)

This is a clinical scale for assessing patients with WD developed by a team of neurologists, gastroenterologists and radiologists from India (Aggarwal *et al.*, 2009). It has been registered for use in WD by the Movement Disorders Society (MDS) and is available in full on www.movementdisorders.org among the clinical scales for assessing movement disorders, as MDS Clinical Outcome Assessments. This scale consists of two parts. Part one – Global Disability – where general disability is assessed in 4 subsections (for which 0 to 5 points are awarded depending on severity). The sub-items relate to the severity of liver disease (L0–L5), cognitive and behavioural impairment (C0–C5), motor impairment (M0–M5), and osseomuscular impairment (O0–O5). Each subsection represents a separate domain (damage to a different system indicated by a letter), the subsections do not add up. Part two consists of 14 subsections that include neurological examination, data on cognitive impairment, mood, psychosis, presence of a Kayser-Fleischer ring (scored from 0–4 points), as well as rarer neurological symptoms (emotional lability, epileptic seizures, myoclonus, stereotypy, tics, pyramidal signs, eye movement abnormalities), for which 1 point is scored for presence and 0 points for absence. Scores are added up, with a maximum score

of 56 in the most severe cases. Researchers in Mumbai validated this scale by studying 30 patients with WD, but it has not entered wider use in either research or the pharmaceutical industry (Aggarwal *et al.*, 2009).

In 2017, Volpert and colleagues compared both scales, the UWDRS and the GAS for WD (Volpert *et al.*, 2017), and found concordance (positive correlations) between the neurological parts of both scales, i.e. part three of the UWDRS and part two of the GAS for WD ($r = 0.8$; $p < 0.001$). Correlations of GAS for WD with the MELD liver function score were significantly weaker ($r = 0.28$; $p < 0.05$) and were statistically insignificant ($p = 0.37$) between GAS for WD and the Child-Pugh scale.

2. Biomarkers of central nervous system damage – neuroradiological

Neuroimaging – brain MRI

Since its introduction, brain MRI in patients with WD has had important applications both for diagnosis (the characteristic neuroradiological image is part of the criteria for the diagnosis of WD – the so-called Ferenci score) and for monitoring patient treatment (EASL, 2012; Dusek *et al.*, 2020). Symmetrical lesions located in the subcortical nuclei (also in the pons and mesencephalon), usually hyperintense in T2-dependent sequences (less often with mixed echogenicity), are characteristic of WD (Litwin *et al.*, 2013). They occur in virtually 100% of patients with neurological symptoms of WD, in 42–70% of patients with hepatic-only symptoms and in up to 20% of clinically asymptomatic patients. The most spectacular neuroradiological manifestations characteristic of WD, the so-called face of the giant panda sign in the mesencephalon and the miniature panda in the pons, occur in only a dozen percent of patients with WD (Prayer *et al.*, 1990; Kozić *et al.*, 2003; Südemeyer *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 2013) and may also occur in other rare conditions (e.g. Leigh syndrome) (Litwin *et al.*, 2013). In the majority of patients with WD, usually in the later stage of the disease, the most common lesions are generalised cerebral atrophy (Prayer *et al.*, 1990; King *et al.*, 1996; Kozić *et al.*, 2003; Litwin *et al.*, 2013).

Various clinical-radiological correlations have been observed between the location lesions in the brain MRI and clinical symptoms (e.g. dystonia – lesions in the putamen; depression and anxiety – lesions in the globus pallidus; parkinsonism – lesions in the mesencephalon; excessive irritability – lesions in the brainstem) (Prayer *et al.*, 1990; King *et al.*, 1996; Kozić *et al.*, 2003; Südemeyer *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 2013; Litwin *et al.*, 2018; Shribman *et al.*, 2022). The treatment effects observed on MRI as resolution of some of the brain lesions along with improvement in the patient's clinical condition (resolution of neurological symptoms) have been noted (Prayer *et al.*, 1990; Kozić *et al.*, 2003; Südemeyer *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2009).

The first attempt at a quantitative assessment of brain MRI lesions in patients with WD was the introduction of the concept of the so-called brain MRI lesion load, i.e. the number of lesions (abnormal signs) shown on brain MRI in locations characteristic of WD; 1 point was scored for one lesion. As the number of lesions (occupied structures) visualised on brain MRI can correspond to the severity of neurological symptoms in the course of WD, positive correlations were found between brain MRI lesion load and the severity of neurological status, as well as neuropsychiatric inventory (NPI) (Kalita *et al.*, 2021). However, due to physicians' superficial approach to radiological changes in the course of WD (different MRI sequences were scored the same) and due to discrepancies due to the different clinical significance associated with the observed changes in different brain MRI sequences (T1, T2 or T* gradient-echo sequences), this scale has not been more widely adopted for use. A scale was sought that would take into account both quantitative CNS damage and different brain MRI sequences, as proposed by Dusek and his team (Dusek *et al.*, 2020).

Semi-quantitative scale for MRI-based assessment of CNS damage in WD

In 2020, a semi-quantitative scale was proposed to assess CNS damage using brain MRI (Dusek *et al.*, 2020) (Table 1). The scale is three-stage, covering acute toxicity, chronic damage and cerebral atrophy. Acute toxicity is assessed from 0 to 2 points and it reflects hyperintense lesions in T2-dependent and FLAIR sequences in the putamen, caudate nucleus, thalamus, mesencephalon, pons and other structures. Chronic damage is assessed from 0 to 1 point and it reflects hypointense lesions in T2-dependent, T* gradient-echo sequences and susceptibility-weighted imaging (SWI) in the globus pallidus, putamen, caudate nuclei, thalamus, and dentate nuclei. Cerebral atrophy is scored from 0 to 2 points, in T1 dependent sequence, i.e. cortical, subcortical, mesencephalon, and cerebellar atrophy.

Acute toxicity is thought to be responsible for early CNS damage, oedema, demyelination – potentially reversible changes. Chronic damage includes potentially irreversible changes, necrosis, iron deposition (as a result of neurodegeneration processes of macrophage influx, among other things), as well as CNS atrophy.

In a scale-validation study, Dusek *et al.* assessed MRI scans of 39 patients with WD and found concordance both between studies of radiologists, with patient data blinded, and between MRI scans assessed (Dusek *et al.*, 2020). There was also a positive correlation between scores on the semi-quantitative scale to assess CNS damage in WD based on MRI – chronic damage and total score – and part II of the UWDRS, as well as part III of the UWDRS ($p < 0.01$). Furthermore, after 24 months of follow-up, acute toxicity shown by brain MRI correlated positively with parts II and III of the UWDRS ($p < 0.01$). Improvements in treatment effect were seen in both the

UWDRS and MRI scales. These observations were confirmed by a study on a much larger number of patients ($n = 100$) conducted in 2022 by Rędzia-Ogrodnik with a team (Rędzia-Ogrodnik *et al.*, 2022).

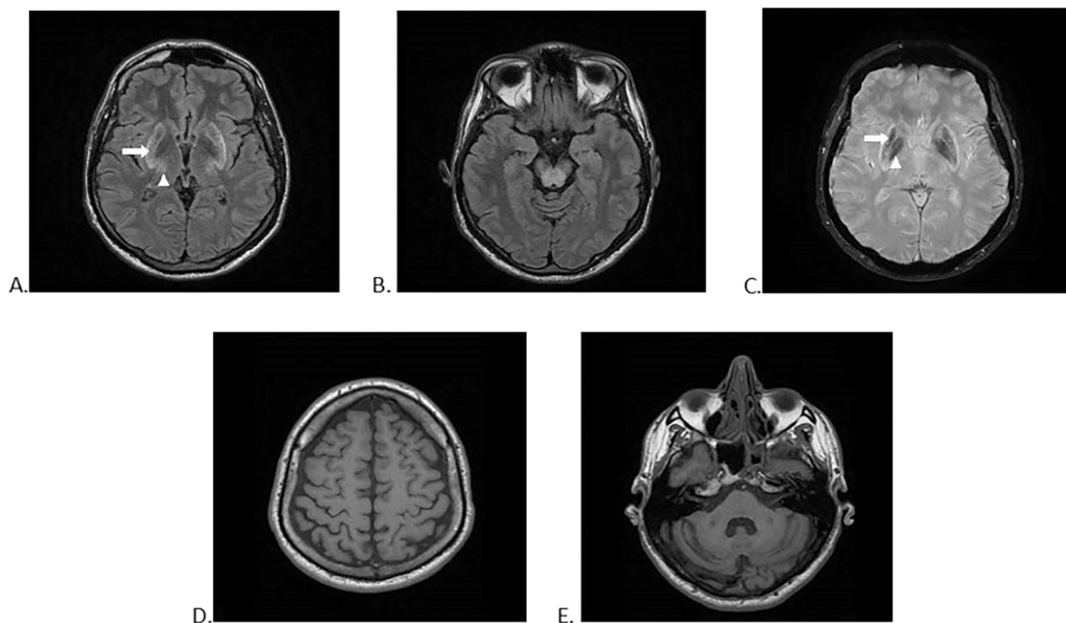
Table 1. Semi-quantitative scale for assessing brain damage in Wilson's disease using MRI (Dusek *et al.*, 2020)

	Normal sign/ no change on MRI	Moderately severe lesions on MRI	Severe lesions on MRI
<i>Acute toxicity, hyperintense lesions in T2/FLAIR sequences</i>			
Putamen	0	1	2
Caudate nucleus	0	1	2
Thalamus	0	1	2
Mesencephalon	0	1	2
Pons	0	1	2
Other areas	0	1	2
<i>Chronic damage, hypointense lesions in T2/T*/SWI sequences</i>			
Globus pallidus	0		1
Putamen	0		1
Caudate nucleus	0		1
Thalamus	0		1
Dentate nucleus	0		1
<i>Atrophy with evaluation in T1-dependent sequences</i>			
Cortical	0	1	2
Central	0	1	2
Mesencephalon	0	1	2
Cerebellum	0	1	2

FLAIR – fluid-attenuation inversion recovery, SWI – susceptibility-weighted imaging

Quantitative (volumetric) MRI-based assessment of brain atrophy in WD

Even the earliest neuroimaging studies – computed tomography (CT) and MRI of the brain – showed CNS atrophy in patients with WD, involving the cerebral cortex, cerebellum, and dilation of the ventricles (King *et al.*, 1996). When analysing the frequency of brain lesions in WD shown on MRI, it was observed that CNS atrophy is the most common lesion occurring in the course of WD. Most papers on neuroimaging have so far described CNS atrophy subjectively (zero-one, absence vs. presence) based on the neuroradiologist's assessment (Prayer *et al.*, 1990; King *et al.*, 1996; Kozić *et al.*, 2003; da Costa *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 2013). Following the widespread introduction of computer software (e.g. SIENAX, FreeSurfer), CT and MRI of the brain began to be used to objectively assess the extent, location, and significance of CNS atrophy in both neurodegenerative diseases (spinocerebellar ataxia, Parkinson's disease) and inflammatory diseases (multiple sclerosis) (Smolinski *et al.*, 2019; Shribman *et al.*, 2022). One of the earliest papers on the volumetric assessment of CNS atrophy in WD was authored by Smoliński (Smolinski *et al.*, 2019). The authors demonstrated quantitative atrophy of total brain volume, grey and white matter in patients with WD, and determined its significance – negative correlations between CNS atrophy and severity of neurological syndrome (Picture 2: A, B and C).



Picture 1. MRI image of patients with WD and proposed assessment of the severity of CNS damage on brain MRI according to the semi-quantitative scale of MRI in WD; **A and B** – FLAIR sequence images: **A**: hyperintense lesions located in the putamen (arrow), thalamus (arrowhead) and **B**: in the brainstem, intensified lesions indicative of acute toxicity, scored 2 points for each of the structures mentioned; **C** – T2* sequence images – hypointense lesions in the putamen (arrow) and the globus pallidus (arrowhead); lesions indicative of chronic damage, scored 1 point for each of the structures listed; **D and E** – T1 sequence images: **D**: moderate cortical atrophy and **E**: moderate cerebellum atrophy – scored 1 point for each of the structures listed

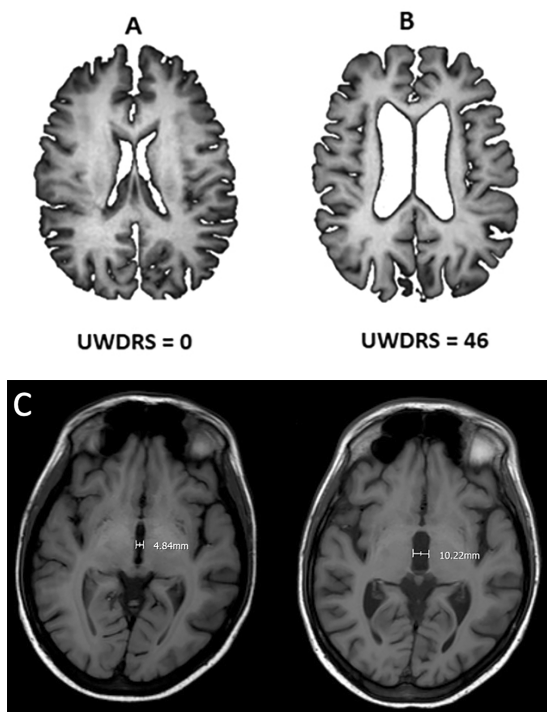


Figure 2. MRI of the brain in patients with WD showing that the progression of the severity of neurological deficits on the UDWRS scale is associated with progressive brain atrophy; **A:** 26-year-old patient with symptoms of liver damage without neurological symptoms (0 points on UWDRS), (SIENAX brain volume and atrophy analysis programme); **B:** image after 1 year and the onset of neurological symptoms (46 points on UWDRS) after treatment and neurological deterioration; **C:** MRI of the brain of the same patient in T1-dependent sequences before the onset of neurological symptoms and 1 year after the onset of the dystonic form of the disease (despite anti-copper treatment) (more than double enlargement of the width of the third ventricle)

Subsequent, more recent work is based on a fully automated technique for measuring the volume of CNS structures using the so-called voxel-based morphometry (VBM) (Smolinski *et al.*, 2019; Shribman *et al.*, 2021b; Shribman *et al.*, 2022). Grey matter atrophy in the basal nuclei, thalamus, brainstem, cerebellum, anterior telencephalon, and orbitofrontal cortex has been found in patients with WD. Atrophy of the grey matter of the caudate nuclei, putamen, nucleus ambiguus, left part of the orbitofrontal cortex, and operculum cortex was greater in patients with neurological symptoms compared with patients who only had symptoms of liver damage (Shribman *et al.*, 2022). These changes correlated negatively with the clinical neurological assessment scale for WD (UWDRS).

Given the progressive process of neurodegeneration in the course of WD (in the absence of treatment or inadequate treatment), the possibility of automatic, objective measurements of the volume of brain structures, and the compatibility of CNS volumetric results with the UWDRS clinical scale for neurological assessment of WD (UWDRS), it seems that these tests will be a routine

addition to the monitoring of patients with WD in the near future (Smolinski *et al.*, 2019; Shribman *et al.*, 2021b; Shribman *et al.*, 2022).

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) of the brain

Brain MRI spectroscopy (magnetic resonance spectroscopy, MRS) is a method that allows the metabolism of the examined tissues to be analysed and is complementary to the structural examination of the CNS (Alanen *et al.*, 1999; Tarnacka *et al.*, 2008). In the past, methods based on phosphorus nuclei (P-MRS) and the proton (hydrogen) method (1HMRS) have been used. Currently, research on WD mainly uses the method of so-called single voxel hydrogen spectroscopy (SV-1HMRS) – a cube (voxel, usually between 1 and 3 cm in size) located in the area of brain tissue under examination is superimposed on a classic MRI image of the brain (Alanen *et al.*, 1999; Tarnacka *et al.*, 2008). The result of the examination is a spectrum – chemical spectra with bands showing us both the qualitative and quantitative content of the metabolites contained in the brain tissue. The most commonly studied CNS metabolites are N-acetylaspartate (NAA) – a neuronal marker, myo-inositol (mI) – a product of myelin breakdown, a glial cell marker, glutamate (Glu) and glutamine (Gln) – astrocyte markers, lactate (Lac) – products of anaerobic glycolysis (absent in healthy tissue), choline (Cho) – precursor of acetylcholine and phosphatidylcholine, marker of cell membrane damage, and creatine (Cr) – marker of cellular energy processes (Alanen *et al.*, 1999; Tarnacka *et al.*, 2008).

Several studies have been conducted on the importance of MRS in WD. Among other things, it has been shown that the NAA/Cho and NAA/Cr ratios are reduced in the striatum during the course of WD, which is a marker of neuronal loss and disruption of energy processes. An increase in the mI/Cr and Gln/Cr ratio was observed as an expression of astrocyte activation (protective and detoxifying functions of the CNS). In the course of anti-copper treatment, there is an increase in NAA/Cho and mI/Cr ratios (normalisation of neuronal metabolism, energy processes, cell membrane stability). The authors suggested that, in particular, the NAA/Cr ratio could be used as an early indicator of neuronal damage in WD, indicating the onset of CNS involvement in the course of WD (even in clinically asymptomatic individuals), (Tarnacka *et al.*, 2008).

Unfortunately, as mentioned earlier, in order to perform SV-1HMRS examination, it is necessary to identify the so-called voxel, an abnormal tissue (not always present in a size that allows analysis), and the examination also requires an appropriate (deviating from routine) protocol for performing MRI and radiological analysis. For this reason, the use of MRS to date has been limited to research and will not be proposed as a biomarker for wider use in WD in the near future (Alanen *et al.*, 1999; Tarnacka *et al.*, 2008; Antos *et al.*, 2020a).

3. Molecular biomarkers – laboratory

Neurofilaments

Neurofilaments (Nf) are a major component of the neuronal cytoskeleton (Khalil *et al.*, 2018). Depending on their molecular weight, they are divided into light chains (NfL), medium chains (NfM) and heavy chains (NfH). They have been considered for more than 20 years as a marker of neurodegeneration, neuroaxonal damage in neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease, Huntington's disease, multiple system atrophy, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, inflammatory diseases (infectious and autoimmune encephalitis) and many others (Lu *et al.*, 2015; Disanto *et al.*, 2017; Barro *et al.*, 2018).

Higher NfL concentrations in cerebrospinal fluid and serum correlate positively with the severity of the above diseases, as assessed by relevant clinical scales, brain MRI ("fresh" demyelinating lesions, severity of atrophy, etc.) (Khalil *et al.*, 2018).

An increase in NfL concentrations is also observed with age (approximately 3.3% per year), which is probably related to the physiologically progressive brain and neuronal atrophy that is associated with age (Khalil *et al.*, 2018). Higher NfL concentrations are also observed in men (oestrogens are thought to have a neuroprotective effect in neurodegenerative diseases).

In individual papers reporting severe cases of somatically ill patients (e.g. SARS-CoV-2 infection), a high baseline NfL level was shown to be a risk factor for death in these patients. The inclusion of NfL as a marker of treatment efficacy in various neurodegenerative and inflammatory diseases is currently under consideration (De Lorenzo *et al.*, 2021).

NfL can be identified in serum (sNfL) and cerebrospinal fluid (CSF), and based on comparative analyses of both results, the conclusions from both methods with regard to the role of NfL as a marker of neurodegeneration are comparable (Khalil *et al.*, 2018).

Very promising results showing positive correlations between CNS damage and NfL concentrations in many inflammatory and neurodegenerative diseases have led to NfL being facetiously referred to as a biomarker of CNS damage, "analogue of C-reactive protein in neurologic diseases" (Lambertsen *et al.*, 2020; Gaetani, 2022).

In WD, all publications to date on NfL have been based on patient serum results. The first paper on sNfL was presented by Shribman *et al.* They analysed 40 patients with WD (23 with neurological symptoms and 17 with hepatic symptoms) and 38 in control group (Shribman *et al.*, 2021a). The researchers found that sNfL levels in patients with neurological symptoms of WD were significantly higher than in patients with liver damage symptoms only (8.7 ng/mL vs 7.0 ng/mL; $p < 0.01$), as well as compared to control group (8.7 ng/mL vs 7.6 ng/mL; $p < 0.01$). No differences were observed between the control group and patients with WD without neurological symptoms

(7.6 ng/mL vs 7.0 ng/mL; ns). The researchers analysed patients with neurological symptoms for disease activity. Patients whose hepatic symptoms were followed by neurological symptoms and those whose neurological status worsened during treatment were defined as active WD, and the remainder as stable. Patients with the active (progressive) neurological form of WD were shown to have higher sNfL levels than those in the stable group (22.2 ng/mL vs 7.7 ng/mL; $p < 0.01$). In addition, the highest sNfL concentrations occurred in patients whose neurological condition had worsened (38.5 ng/mL). The concentration of sNfL also correlated positively with part III of the UWDRS ($\beta = 0.1$; $p < 0.01$). The researchers suggested in their conclusions that sNfL may in future become a biomarker of CNS damage in the course of WD – for both treatment optimisation and clinical research, however, recommending further research to confirm their observations.

Ziemssen and his team analysed the cases of 61 patients consecutively admitted to the Second Department of Neurology at the Institute of Psychiatry and Neurology in Warsaw between 2012 and 2017 who were diagnosed with WD (Ziemssen *et al.*, 2022a). All patients underwent brain MRI (1.5 T scanner) with semi-quantitative damage assessment (acute toxicity, chronic damage and total CNS damage score), neurological examination [UWDRS], disease phenotype assessment (hepatic, neurological, presymptomatic form) and copper metabolism examination. In the results, patients with WD with neurological symptoms were found to have significantly higher sNfL levels than patients with hepatic and presymptomatic forms (38.7 ± 73.4 vs 13.3 ± 9.2 pg/mL; $p < 0.01$). Patients with tremor (a lighter and better-prognosis neurological form of WD) tended to have lower sNfL concentrations (16.2 ± 5.3 pg/mL) than patients with more severe neurological forms with parkinsonism (44.9 ± 46.6 pg/mL) and dystonia (78.7 ± 142.9 pg/mL; $p = 0.065$, tremor vs other neurological forms). In patients with neurological symptoms ($n = 36$), sNfL levels correlated positively with part II of the UWDRS ($r = 0.37$; $p < 0.05$) and part III of the UWDRS ($r = 0.38$; $p < 0.05$). The sNfL concentration in the entire group of 61 patients positively correlated with the semi-quantitative brain MRI assessment scale in patients with WD, with acute toxicity ($r = 0.48$; $p < 0.01$), chronic damage ($r = 0.49$; $p < 0.01$) and total score ($r = 0.54$; $p < 0.01$). The researchers did not find an association between copper metabolism scores and sNfL (Ziemssen *et al.*, 2022a). In an additional analysis, they also showed that a higher baseline sNfL level, prior to the inclusion of anti-copper treatment, is a risk factor for early neurological deterioration (33.2 ± 23.5 vs 27.6 ± 62.7 pg/mL; $p < 0.01$) (Ziemssen *et al.*, 2022b).

Ziemssen and his team, based on their own findings and the work of Shribman *et al.* (2021a), showed that sNfLs are a valuable quantitative biomarker of CNS damage in WD, complementing the UWDRS neurological

and clinical examination and semi-quantitative brain MRI assessment in WD.

Another paper that confirmed the importance of sNfL in WD is a study by Yang *et al.* They examined 75 patients with WD (54 with neurological symptoms and 21 with hepatic symptoms) and 27 healthy subjects for serum sNfL levels (Yang *et al.*, 2022). They confirmed previous observations (Shribman *et al.*, 2021a; Ziemssen *et al.*, 2022a, Ziemssen *et al.*, 2022b) that patients with WD and neurological symptoms have higher sNfL levels compared to patients with WD with hepatic-only symptoms (8.1 pg/mL vs 3.1 pg/mL; $p < 0.01$). The concentration of sNfL also correlated positively with the severity of neurological symptoms on the UWDRS scale ($r = 0.291$; $p < 0.05$). In addition, the researchers analysed volumetric brain atrophy using the FreeSurfer programme (grey matter, nucleus accumbens, bilateral lentiform nuclei and putamen volumes) and found negative correlations between the volumes of these structures and sNfL concentrations.

Summarising the above studies, it can be concluded that sNfLs are a very good biomarker indicating CNS damage in the course of WD. This is supported by correlations with both the neurological symptom severity rating scales (UWDRS), the semi-quantitative brain MRI scale and assessments of atrophy of brain structures associated with WD (Shribman *et al.*, 2021a; Yang *et al.*, 2022; Ziemssen *et al.*, 2022a; Ziemssen *et al.*, 2022b).

Glial fibrillary acidic protein

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the main protein belonging to intermediate filaments, forming part of the cytoskeleton of mature astrocytes, the most specific marker of cells of astrocytic origin (Lekomtseva *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2021). Outside the CNS, GFAP is found primarily in hepatic stellate cells (the main storehouse of vitamin A in the body [80%]; upon hepatocyte damage, they transform into cells with a myofibroblast phenotype and play a major role in liver fibrosis), in Schwann cells, enteric glial cells, salivary gland tumours, metastatic renal cell carcinoma, epiglottal cartilage, pituitary cells, papillary meningiomas and immature oligodendrocytes. In terms of function, this protein is important for the stability, mobility and shape of astrocytes (Lin *et al.*, 2021).

In the case of CNS-damaging agents (toxic agents, among others), there is proliferation and hypertrophy of astrocytes and an increase in GFAP synthesis. For this reason, this protein is considered a biomarker of CNS damage in certain diseases. Among other things, an association between an increase in cerebrospinal fluid GFAP concentrations and the degree of disability in multiple sclerosis has been described.

Shribman and his team were the first to analyse the serum concentrations of GFAP in patients with WD and in control group (Shribman *et al.*, 2021a). The researchers found no statistically significant differences. In patients with neurological symptoms, the average concentration

was 84 ng/mL, in patients with hepatic symptoms – 80 ng/mL and in the control group – 84 ng/mL. Independently of Shribman, Lin *et al.* performed an analysis of serum GFAP concentrations in patients with WD on a much larger group of 94 patients (74 with neurological symptoms and 20 with hepatic symptoms only) and 25 healthy subjects (Lin *et al.*, 2021). The authors showed that serum GFAP levels in WD patients with neurological symptoms were higher (143.87 pg/mL) than in patients with hepatic symptoms (107.5 pg/mL) and healthy individuals (86.85 pg/mL) ($p < 0.01$) (Lin *et al.*, 2021). The researchers proposed a GFAP concentration of 128.8 pg/mL (sensitivity 80% and specificity 63.5%) as a point of differentiation between WD patients with neurological symptoms and those without neurological symptoms. There was no correlation between serum GFAP levels and the severity of neurological symptoms on the UWDRS scale or changes in brain MRI.

Conflicting results from published studies and the lack of correlation of GFAP with clinical signs (UWDRS and brain MRI) suggest that GFAP levels are of limited value as a biomarker in WD, and that its presence in the blood may be indicative of both liver damage (fibrosis) and astrocyte damage (CNS) in the course of WD (Lin *et al.*, 2021; Shribman *et al.*, 2021a).

Tau protein

Microtubule-associated protein tau (MAPT) is found almost exclusively in neurons. It is associated with microtubules and determines the distance between them. It is responsible for their binding to neurofilaments and for their stabilisation (Gao *et al.*, 2018; Goedert, 2018; Lekomtseva *et al.*, 2019). The tau protein is a sialic acid-free transferrin. The affinity of the tau protein for microtubules depends on its degree of phosphorylation. Excessive phosphorylation of the tau protein causes filamentous degeneration, the amount of which correlates with the severity of Alzheimer's disease symptoms. Corticosteroids directly increase tau protein phosphorylation. It is furthermore important that factors that increase corticosteroid synthesis, such as stress, toxins, inflammation, also indirectly increase tau protein phosphorylation (Goedert, 2018). Previous studies have shown that elevated tau protein levels in cerebrospinal fluid and blood serum are observed not only in neurodegenerative diseases, but also in patients after brain injury, with acute ischemic stroke, viral encephalitis, and with severe epileptic seizures (Josephs, 2017; Gao *et al.*, 2018). These reports have led to tau protein currently being also considered as a marker of neuroaxonal damage in many CNS diseases.

To date, two studies have been conducted on the potential role of tau protein in WD. In the first study, Lekomtseva *et al.* studied 47 patients with WD (all with neurological symptoms, with 28 patients having no clinical signs of liver damage) and 30 patients in control group (Lekomtseva *et al.*, 2019). Serum tau protein levels were higher in patients with WD than in control group

(221.7 pg/mL vs 71.1 pg/mL; $p < 0.0001$). Patients with only neurological symptoms tended to have higher serum tau protein values compared to patients with neurological symptoms and clinical signs of liver damage (231.3 pg/mL vs 207.6 pg/mL; $p > 0.05$).

A second study, by Shribman *et al.*, did not confirm these reports. No statistically significant differences in serum tau protein levels were observed in patients with WD with neurological symptoms compared to control group or patients with WD with hepatic-only symptoms (Shribman *et al.*, 2021a).

Ubiquitin C-terminal hydrolase L1

Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) is an enzyme that hydrolyses small C-terminal adducts of ubiquitin to produce the ubiquitin monomer. Ubiquitin is a protein involved in the tagging (ubiquitination) of proteins to undergo non-lysosomal proteolysis. UCH-L1 expression is specific to neurons, cells of the neuroendocrine system (including their tumours), and the testes and ovaries. Mutations within the UCH-L1 gene are associated with neurodegenerative diseases (Parkinson's disease, Alzheimer's disease) through interactions with the proteins – alpha-synuclein and parkin (Bost *et al.*, 2016; Josephs, 2017; Shribman *et al.*, 2021a).

In WD, there has been one study to date with UCH-L1 (Shribman *et al.*, 2021a). In their search for biomarkers of CNS damage, the researchers measured sNfL, GFAP, tau protein and UCH-L1. They showed that serum UCH-L1 levels were higher in patients with WD, compared to control group, but found no differences between patients with neurological and hepatic symptoms (Shribman *et al.*, 2021a). To date, this was the only study to assess the role of UCH-L1 as a biomarker in WD, so further research is needed to verify the above observations.

Biomarkers of copper metabolism

Biomarkers of copper metabolism make it possible to diagnose WD regardless of clinical presentation and to monitor the metabolic efficacy of treatment.

One of the more intensively evaluated copper markers in research is non-ceruloplasmin-bound serum copper (NCC), the non-ceruloplasmin (Cp) fraction of copper that is toxic, and the so-called free copper. This fraction is usually elevated in WD. It is calculated indirectly by multiplying the Cp value (expressed in mg/dL) times 3.14 and then subtracting this value from the serum copper concentration (expressed in $\mu\text{g/dL}$). Under physiological conditions, the serum NCC value is 5–15 $\mu\text{g/dL}$. NCC concentrations $>15 \mu\text{g/dL}$ are observed in patients with WD. As recommended by the EASL, NCC can be used to either monitor a patient's correct intake of a WD drug (normal NCC concentration) or detect an overdose ($<5 \mu\text{g/dL}$). The problem with the use of NCC is the indirect method of calculation, which, especially when using immunological analysis of serum Cp concentration, results

in non-diagnostic results – negative in up to a dozen per cent of cases (EASL, 2012). Direct methods for NCC analysis are currently being sought (Weiss *et al.*, 2017; Antos *et al.*, 2021). There is promising work from France, among others, where the direct determination of the free copper fraction, exchangeable copper (CuEXC), and its derivative, relative exchangeable copper (REC), has been described. These studies require further international validation. It is worth remembering that these are not direct markers of CNS damage in WD; they will potentially have applications in the diagnosis and monitoring of copper metabolic status during WD treatment (EASL, 2012).

Daily urinary copper excretion is another important biomarker of copper metabolism, used both in the diagnosis and monitoring of WD treatment (EASL, 2012). It is still the best and most sensitive single biomarker used in the diagnosis of WD. It is usually $>100 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ (standard: 0–50 $\mu\text{g}/24 \text{ h}$) in WD patients, (EASL, 2012). However, in monitoring treatment, after an initial increase in daily urinary copper excretion of up to $>1000 \mu\text{g}/24 \text{ h}$, in correctly treated patients with chelating drugs, it should be around 200–500 $\mu\text{g}/24 \text{ h}$ (with correct patient compliance). When using zinc salts in chronic treatment ($>1 \text{ year}$), daily urinary copper excretion should be $<75 \mu\text{g}/24 \text{ h}$. This is currently the most widely used and most important biomarker of copper metabolism for monitoring the treatment of WD (EASL, 2012).

Conclusions

To summarise the current options for the neurological assessment of WD – according to current EASL recommendations, every patient with WD should have a regular neurological examination, at least twice a year (recommendation GRADE II-2, B,1). Due to the wide variety of neurological symptoms, the differences in their severity, and the daily fluctuation of symptoms, it is sometimes difficult to even describe the symptoms and their severity (EASL, 2012). Therefore, the patient should be assessed objectively, following the same examination pattern, on a specific neurological assessment scale. As no single scale has been adopted worldwide (GAS for WD operates in India; UWDRS in Europe), it is important to use comparable tools to assess the neurological symptoms of WD (EASL, 2012). Based on an analysis of the literature on WD, additional tests, biomarkers (clinical, neuroradiological and biochemical), as well as clinical studies from recent years (WTX101-201, ALXN1840, CHELATE and others), it can be concluded that the most commonly used scale is the UWDRS (Weiss *et al.*, 2017; Antos *et al.*, 2020b; Antos *et al.*, 2021; Shribman *et al.*, 2021a).

In terms of neuroradiological assessment, an interesting proposal from 2020 is semi-quantitative MRI assessment in WD. It assesses potentially reversible changes (acute toxicity) and irreversible changes (chronic

damage and atrophy) separately (Dusek *et al.*, 2020). The wider use of this scale, as well as the UWDRS, is supported by the documentation of positive correlations between the UWDRS and the MRI scale (Dusek *et al.*, 2020; Rędzia-Ogrodnik *et al.*, 2022).

A second interesting option for radiological examinations, due to automatic measurements (free from the subjectivity of the radiologist's judgement), is the morphometry study of CNS volumetry in WD (Smoliński *et al.*, 2019; Poujois *et al.*, 2020; Shribman *et al.*, 2022). Their results and statistically significant correlations with the UWDRS underline the importance of these observations.

A complementary marker to the clinical (UWDRS) and neuroradiological (semi-quantitative and volumetric CNS assessments) scales is the serum NfL concentration,

which correlates with both the severity of neurological symptoms and deficits and changes on brain MRI, as demonstrated by three independent studies (Shribman *et al.*, 2021a; Yang *et al.*, 2022; Ziemssen *et al.*, 2022a, Ziemssen *et al.*, 2022b).

To summarise the subject of biomarkers of CNS damage in WD, it is likely that in the coming years, both in academic research and in the pharmaceutical industry, the three methods described above, i.e. clinical, radiological (perhaps more objective with the use of artificial intelligence), and biochemical assessment of CNS damage in WD, will be essential tools for improving neurological treatment in patients with WD (Antos *et al.*, 2020; Poujois *et al.*, 2020; Kalita *et al.*, 2021; Shribman *et al.*, 2021b). Table 2 summarises the markers discussed in this text. ■

Table 2. Biomarkers of central nervous system damage in Wilson's disease and their potential use

Type of biomarker	Type of examination	Clinical relevance
Clinical biomarkers	UWDRS scale	Scale for the assessment of the severity of disability in activities of daily living (part II) and neurological deficits (part III); currently recommended by international societies for the assessment of neurological status of patients with WD in routine care and in clinical trials.
	GAS for WD scale	A scale for the assessment of the severity of WD; it assesses global disability, severity of liver disease, cognitive impairment, motor and osseomuscular impairment – used mainly in India (where it was developed), registered as the Movement Disorders Society scale.
Neuroradiological (neuroimaging) biomarkers	Magnetic resonance imaging (MRI) of the brain	Changes typical of WD on brain MRI are included in the diagnostic algorithm for CVD (the so-called Ferenci score); significant mainly as a diagnostic biomarker.
	Semi-quantitative scale for the assessment of brain MRI in WD	Scale for assessing CNS damage with brain MRI consists of 2 parts (acute toxicity – potentially reversible changes – and chronic CNS damage – irreversible changes); quantifies the severity of CNS damage on brain MRI; correlates well with the severity of neurological status on UWDRS (parts II and III) and level of neurofilament light chains in serum.
	Volumetric evaluation of brain atrophy in WD	Currently, assessment of atrophy is performed in computer programmes, e.g. SIENAX, FreeSurfer; brain atrophy correlates with severity of neurological syndrome in UWDRS, copper metabolism – in the future, assessment of CNS atrophy may be an endpoint of drug trials in WD.
	Magnetic resonance spectroscopy (MRS) of the brain	Mainly research use to date – metabolic changes in the subcortical nuclei have been observed even in asymptomatic patients with WD.
Molecular biomarkers – laboratory	Neurofilament light chains (NfL)	A biomarker of neurodegeneration in neurodegenerative diseases. In WD, serum sNfL levels have been shown to correlate positively with the severity of neurological deficits (UWDRS) and CNS damage on MRI (semi-quantitative scale); higher serum levels at the start of WD treatment may be a risk factor for neurological deterioration after initiating treatment. The most promising biomarker for treatment monitoring in WD complementing clinical scales, copper metabolism and brain MRI.
	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Biomarker of cells of astrocytic origin; in WD, higher serum levels of GFAP have been observed in patients with neurological symptoms compared to control group and patients with hepatic-only symptoms; needs further investigation as a marker for monitoring treatment (CNS involvement in the course of WD).
	Tau protein	No relevance has been demonstrated in WD.
	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1)	Higher serum levels of UCH-L1 have been observed in patients with WD compared to control group (1 study); use requires further research.
	Biomarkers of copper metabolism: 1. Free copper NCC 2. Daily urinary copper excretion	1. NCC – diagnostic biomarker (elevated serum values >15 µg/dL indicate WD) and treatment monitoring biomarker – during anti-copper treatment, values indicating correct treatment: 5–15 µg/dL. 2. Daily urinary copper excretion – diagnostic biomarker, >50 µg/24 h in urine indicates WD (part of the WD diagnostic algorithm – Ferenci index) and biomarker for treatment monitoring: on chelating drugs urinary copper excretion with correct chronic treatment is 200–500 µg/24 h, on zinc salts: <75 µg/24 h.

WD – Wilson's disease; UWDRS – Unified Wilson Disease Rating Scale; GAS for WD – Global Assessment Scale for Wilson's Disease; MRI – magnetic resonance imaging; NCC – non-ceruloplasmin-bound copper; sNfL – serum neurofilament light chain level

Cel

Celem pracy jest przegląd aktualnie proponowanych biomarkerów uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w przebiegu chW: (1) klinicznych, (2) strukturalnych (neuroobrazowych) oraz (3) molekularnych, a także zaproponowanie określenia ich przyszłej roli (prognostycznej, diagnostycznej czy związanej z monitorowaniem reakcji na leczenie).

Wstęp

Choroba Wilsona (chW) to choroba wrodzona związana z zaburzeniami metabolizmu miedzi, z jej patologicznym odkładaniem się w wielu narządach (głównie wątrobie i mózgu) i ich wtórnym uszkodzaniem (Ferenci, *et al.*, 2003; EASL, 2012).

Objawy chW dotyczą głównie wątroby (od łagodnego wzrostu aktywności enzymów wątrobowych po niewydolność wątroby) oraz ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – najczęściej ruchy mimowolne oraz objawy psychiatryczne (EASL, 2012).

Leczenie chW opiera się na stosowaniu leków powodujących powstanie ujemnego bilansu gospodarki miedzią (Medici *et al.*, 2005; Schilsky 2014; Członkowska i Litwin, 2017). Prawidłowe leczenie farmakologiczne chW u większości pacjentów przynosi korzystny efekt (poprawa funkcji wątroby, zmniejszenie nasilenia/ ustąpienie objawów neurologicznych), (EASL, 2012). Przyjmuje się, że w wypadku 85% pacjentów z chW rokowania są dobre, jeśli prawidłowo przyjmują oni leki przeciwmiedziowe, dlatego chW należy do nielicznych chorób neurodegeneracyjnych, które mogą być skutecznie leczone farmakologicznie (Członkowska *et al.*, 2005; Bruha *et al.*, 2011; Beinhardt *et al.*, 2014; Schilsky, 2014).

Kontrola kliniczna leczenia chW opiera się głównie na ocenie metabolizmu miedzi, wynikach prób wątrobowych oraz ocenie neurologicznej i ewentualnie psychiatrycznej (Weiss i Stremmel, 2014; Litwin *et al.*, 2017). Trwają poszukiwania wiarygodnych i odpowiednio czułych markerów uszkodzenia wątroby oraz OUN w przebiegu chW, które to markery mogłyby poprawić diagnostykę oraz leczenie chW (EASL, 2012).

Biomarkery, według Światowej Organizacji Zdrowia, to dowolne substancje, struktury lub procesy, możliwe do zmierzenia w organizmie lub jego produktach, które pozwalają na badanie zmian związanych ze stanem fizjologicznym, diagnozowaniem, prognozowaniem występowania, wykrywania lub leczenia chorób, i które mogą być również miernikiem skuteczności leczenia (Strimbu i Tavel, 2010).

Istnieje wiele podziałów biomarkerów. W poniższej pracy zastosowano dwa podziały. Pierwszy, związany głównie z charakterystyką biomarkerów, dzieli je na tzw. kliniczne (skale oceny klinicznej), obrazowe (*imaging*

biomarkers – czyli neuroobrazowanie, głównie rezonans magnetyczny [*magnetic resonance imaging, MRI*]) oraz laboratoryjne (np. oceny frakcji miedzi, białek w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym, tzw. biomarkery oceniane w płynach ustrojowych – *fluid biomarkers*). Drugi podział związany jest z zastosowaniem biomarkerów i wyróżnia następujące: diagnostyczne (oceniające zaawansowanie choroby), prognostyczne (mające zastosowanie głównie w chorobach nowotworowych) oraz monitorujące odpowiedź kliniczną na interwencje (leczenie lub nowy lek), (Strimbu i Tavel, 2010).

Biomarkery uszkodzenia wątroby są znane. Należą do nich: testy laboratoryjne (próby czynnościowe wątroby), skale niewydolności wątroby (np. Model of End Stage of Liver Disease [MELD]), testy uszkodzenia strukturalnego (badania obrazowe, elastografia), (EASL, 2012). Pozwalają one monitorować pacjentów z chorobą wątroby pod kątem skuteczności i bezpieczeństwa leczenia, jak również rozpoznawać odpowiednio wcześniej niepowodzenia leczenia kwalifikujące tych pacjentów do przeszczepu wątroby lub innego rodzaju leku przeciwmiedziowego (EASL, 2012; Członkowska *et al.*, 2018a).

Znacznie większe trudności sprawia, jak dotychczas, obiektywna, porównywalna ocena stanu neurologicznego pacjentów z chW, a także znalezienie specyficznych, obiektywnych i wiarygodnych biomarkerów ilościowych uszkodzenia OUN w przebiegu chW (EASL, 2012; Litwin *et al.*, 2015; Litwin *et al.*, 2019). Problem ten jest szczególnie istotny, gdyż nadal wyzwaniem w chW i nierozwiązanym problemem terapeutycznym pozostają pogorszenia neurologiczne oraz utrzymywanie się objawów neurologicznych pomimo leczenia (Litwin *et al.*, 2015; Litwin *et al.*, 2017; Weiss *et al.*, 2017; Antos *et al.*, 2021).

W artykule autorzy przedstawili aktualnie proponowane biomarkery uszkodzenia OUN w chW, tj.: (1) kliniczne (skale kliniczne oceny neurologicznej); (2) obrazowe – neuroradiologiczne; (3) tzw. laboratoryjne (białka oznaczane w chorobach neurodegeneracyjnych, które pretendują do roli biomarkerów uszkodzenia OUN w chW, oraz różne metody pomiaru metabolizmu miedzi w organizmie), (Członkowska *et al.*, 2018a; Antos *et al.*, 2020a).

Przegląd piśmiennictwa

Przeprowadziliśmy celowany przegląd literatury – artykułów dostępnych w bazie PubMed w języku angielskim. Szukaliśmy haseł: „choroba Wilsona”, „biomarkery” oraz „neurofilamenty”. Poniżej przedstawiamy podsumowanie zgromadzonych danych.

1. Biomarkery kliniczne – skale oceny neurologicznej u pacjentów z chW

Początkowo do oceny stanu neurologicznego używano głównie danych opisowych (określano rodzaj zespołu),

(Ferenci *et al.*, 2003; Medici *et al.*, 2005; Członkowska *et al.*, 2018b), a do oceny skuteczności leczenia stosowano skale zero-jedynkowe (poprawa – brak poprawy) lub skale nieco bardziej rozbudowane (punktowane 0–3 pkt: brak objawów, niewielkie, średnie, ciężkie, ewentualnie pogorszenie). W 2007 roku wprowadzono do użycia skalę kliniczną oceny deficytów neurologicznych oraz funkcjonalnych Unified Wilson’s Disease Rating Scale (UWDRS) (Członkowska *et al.*, 2007), a w 2009 roku Global Assessment Scale for WD (GAS for WD) (Aggarwal *et al.*, 2009). Zaproponowano również wiele skal wizualnej subiektywnej oceny MRI mózgu, niestety żadna z nich nie była wcześniej skalą ilościową weryfikowaną korelacjami ze skalami oceny klinicznej (Prayer *et al.*, 1990; King *et al.*, 1996; Kozić *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 2013).

UWDRS (Unified Wilson’s Disease Rating Scale)

W 2007 roku zespół neurologów oraz hepatologów z Polski, Francji, Niemiec i Wielkiej Brytanii opracował i zwalidował pierwszą skalę oceny klinicznej uszkodzenia OUN w chW (Członkowska *et al.*, 2007). Skala ta składa się z 3 części: część I dotyczy świadomości (ocena 0–3 pkt), część II dotyczy aktywności dnia codziennego (ang. *activities of daily living*, ADL) i składa się z podpunktów 2–11 ocenianych od 0 do 4 pkt, w zależności od ciężkości deficytów (maksymalnie 40 pkt), część III stanowi szczegółowe badanie neurologiczne (maksymalnie 143 pkt). Każdą z części ocenia się osobno i, jak wykazano w kolejnych pracach, jej zgodność i wiarygodność jest bardzo dobra (Członkowska *et al.*, 2018b). Część II koreluje pozytywnie z częścią III (niesprawność z ciężkością deficytów neurologicznych; $r = 0,84$; $p < 0,001$). Poza tym, że skala ta została wykorzystana w licznych badaniach naukowych, została także włączona do badań klinicznych nad nowymi lekami w terapii chW (WTX101-201, ALXN1840, CHELATE), (Weiss *et al.*, 2017; Litwin *et al.*, 2019; Antos *et al.*, 2021), i aktualnie jest podstawowym narzędziem oceny klinicznej uszkodzenia OUN w chW (Smoliński *et al.*, 2019; Dusek *et al.*, 2020; Rędzia-Ogrodnik *et al.*, 2022; Ziemssen *et al.*, 2022a).

GAS for WD (Global Assessment Scale for WD)

Jest to skala kliniczna do oceny pacjentów z chW opracowana przez zespół neurologów, gastroenterologów oraz radiologów z Indii (Aggarwal *et al.*, 2009). Zarejestrowana została do stosowania w chW przez Movement Disorders Society (MDS) i dostępna jest w całości na stronie movementdisorders.org, pośród skal klinicznych służących do oceny zaburzeń ruchowych, jako MDS Clinical Outcome Assessments. Skala ta składa się z dwóch części. Część pierwsza – Global Disability – ogólna niesprawność oceniana w 4 podpunktach (za które przyznawane jest od 0 do 5 pkt w zależności od ciężkości). Podpunkty dotyczą: ciężkości choroby wątroby (L0–L5), zaburzeń poznawczych i zachowania (C0–C5), zaburzeń motorycznych

(M0–M5) i kostno-stawowych (O0–O5). Każdy podpunkt przedstawia osobną domenę (uszkodzenia innego układu oznaczonego literą), podpunktów się nie sumuje. Część druga składa się z 14 podpunktów, które obejmują: badanie neurologiczne, dane dotyczące zaburzeń poznawczych, nastroju, psychoz, obecność pierścienia Kaysera-Fleischera (punktowanych od 0–4 pkt), a także rzadsze objawy neurologiczne (labilność emocjonalną, napady padaczkowe, mioklonie, stereotypie, tiki, objawy piramidowe, zaburzenia ruchomości gałek ocznych), za które przydzielane są 1 pkt za obecność i 0 pkt za brak. Wyniki sumuje się, z maksymalną liczbą 56 punktów w najcięższych przypadkach. Badacze z Mumbaju zwalidowali tę skalę, badając 30 pacjentów z chW, jednak nie weszła ona do szerszego użycia ani w badaniach naukowych, ani w przemyśle farmaceutycznym (Aggarwal *et al.*, 2009).

W 2017 roku Volpert ze współpracownikami porównali obie skale, UWDRS oraz GAS for WD (Volpert *et al.*, 2017), i stwierdzili zgodność (pozytywne korelacje) pomiędzy neurologicznymi częściami obu skal: częścią trzecią UWDRS i częścią drugą GAS for WD ($r = 0,8$; $p < 0,001$). Korelacje GAS for WD z oceną wydolności wątroby w skali MELD były znacznie słabsze ($r = 0,28$; $p < 0,05$), a między GAS for WD a skalą Child-Pugh były nieistotne statystycznie ($p = 0,37$).

2. Biomarkery uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego – neuroradiologiczne

Neuroobrazowanie – MRI mózgu

Od kiedy je wprowadzono, badanie MRI mózgu u pacjentów z chW ma istotne zastosowanie zarówno diagnostyczne (charakterystyczny obraz neuroradiologiczny stanowi element kryteriów rozpoznania chW, tzw. *Ferenci score*), jak i dla monitorowania leczenia pacjentów (EASL, 2012; Dusek, *et al.*, 2020). Charakterystyczne dla chW są symetryczne zmiany zlokalizowane w jądrach podkorowych (również w moście i śródmózgowiu), najczęściej hiperintensywne w sekwencjach T2 zależnych (rzadziej o mieszanej echogeniczności), (Litwin *et al.*, 2013). Występują one u praktycznie 100% pacjentów z objawami neurologicznymi chW, u 42–70% pacjentów z objawami wyłącznie wątrobowymi i nawet u 20% pacjentów asymptomatycznych klinicznie. Spektakularne dla chW objawy neuroradiologiczne, tzw. dużej pandy w śródmózgowiu i małej pandy w moście występują tylko u kilkunastu procent pacjentów z chW (Prayer *et al.*, 1990; Kozić *et al.*, 2003; Südemeyer *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 2013) i mogą również występować w innych rzadkich schorzeniach (np. zespół Leigh), (Litwin *et al.*, 2013). U większości pacjentów z chW, zwykle w późniejszej fazie choroby, najczęstszymi zmianami są uogólnione zaniki mózgowia (Prayer *et al.*, 1990; King *et al.*, 1996; Kozić *et al.*, 2003; Litwin *et al.*, 2013).

Obserwowano różne korelacje kliniczno-radiologiczne pomiędzy lokalizacją zmian w MRI mózgu a objawami

klinicznymi (np. dystonia – zmiany w skorupach; depresja i lęk – zmiany w gałkach białych; parkinsonizm – zmiany w śródmózgowiu; nadmierna irytacja – zmiany w pniu mózgu), (Prayer *et al.*, 1990; King *et al.*, 1996; Kozić *et al.*, 2003; Südemeyer *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 2013; Litwin *et al.*, 2018; Shribman *et al.*, 2022). Zwrócono uwagę na efekty leczenia zauważalne w MRI jako ustępowanie części zmian w mózgu wraz z poprawą stanu klinicznego pacjenta (ustępowanie objawów neurologicznych), (Prayer *et al.*, 1990; Kozić *et al.*, 2003; Südemeyer *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2009).

Pierwszą próbą w zakresie ilościowej oceny zmian w MRI mózgu u pacjentów z chW było wprowadzenie pojęcia tzw. *brain MRI lesion load*, czyli liczby zmian (nieprawidłowych sygnałów) wykazanych w MRI mózgu w charakterystycznych dla chW lokalizacjach; 1 pkt przyznawano za jedną zmianę. W związku z tym, że liczba zmian (zajętych struktur) uwidocznionych w MRI mózgu może w przebiegu chW odpowiadać ciężkości objawów neurologicznych, stwierdzano dodatnie korelacje pomiędzy *brain MRI lesion load* a ciężkością stanu neurologicznego, a także objawów psychiatrycznych (ang. *neuropsychiatric inventory*, NPI), (Kalita *et al.*, 2021). Jednak ze względu na powierzchowne podejście lekarzy do zmian radiologicznych w przebiegu chW (różne sekwencje badania MRI były punktowane tak samo) oraz ze względu na rozbieżności wynikające z różnego znaczenia klinicznego, jakie wiązano z obserwowanymi zmianami w różnych sekwencjach MRI mózgu (T1, T2 czy sekwencje gradientowe T*), skala ta nie została szerzej przyjęta do użytku. Poszukiwano takiej skali, która uwzględniałaby zarówno ilościowe uszkodzenia OUN, jak i różne sekwencje MRI mózgu, jak to zaproponował Dusek z zespołem (Dusek *et al.*, 2020).

Skala półilościowa do oceny uszkodzeń OUN w chW w oparciu o MRI

W 2020 roku zaproponowano półilościową skalę pozwalającą ocenić uszkodzenia OUN za pomocą badania MRI mózgu (Dusek *et al.*, 2020), (tabela 1). Skala jest trzystopniowa, obejmuje: ostrą toksyczność, przewlekłe uszkodzenie oraz zaniki mózgowia. Ostrą toksyczność ocenia się od 0 do 2 pkt, występują: zmiany hiperintensywne w sekwencjach T2 zależnych i FLAIR w skorupach, jądrach ogoniastych, wzgórzu, śródmózgowiu, moście oraz innych strukturach. Przewlekłe uszkodzenie ocenia się od 0 do 1 pkt, występują: zmiany hipointensywne w sekwencjach T2 zależnych, gradientowych T* oraz SWI (*susceptibility-weighted imaging*) w gałkach białych, skorupach, jądrach ogoniastych, wzgórzach i jądrach zębatych. Zaniki mózgowia ocenia się od 0 do 2 pkt, w sekwencji T1 zależnej: zaniki korowe, podkorowe, śródmózgowia oraz mózdzku.

Ostra toksyczność ma odpowiadać za wczesne uszkodzenia OUN, obrzęk, demielinizację – zmiany potencjalnie odwracalne. Przewlekłe uszkodzenie to zmiany potencjalnie nieodwracalne, martwica, odkładanie się

żelaza (jako wynik między innymi procesów neurodegeneracji napływu makrocząstek), jak i zaniki OUN.

Tabela 1. Skala półilościowa do oceny uszkodzeń mózgu w chorobie Wilsona z wykorzystaniem MRI (Dusek *et al.*, 2020)

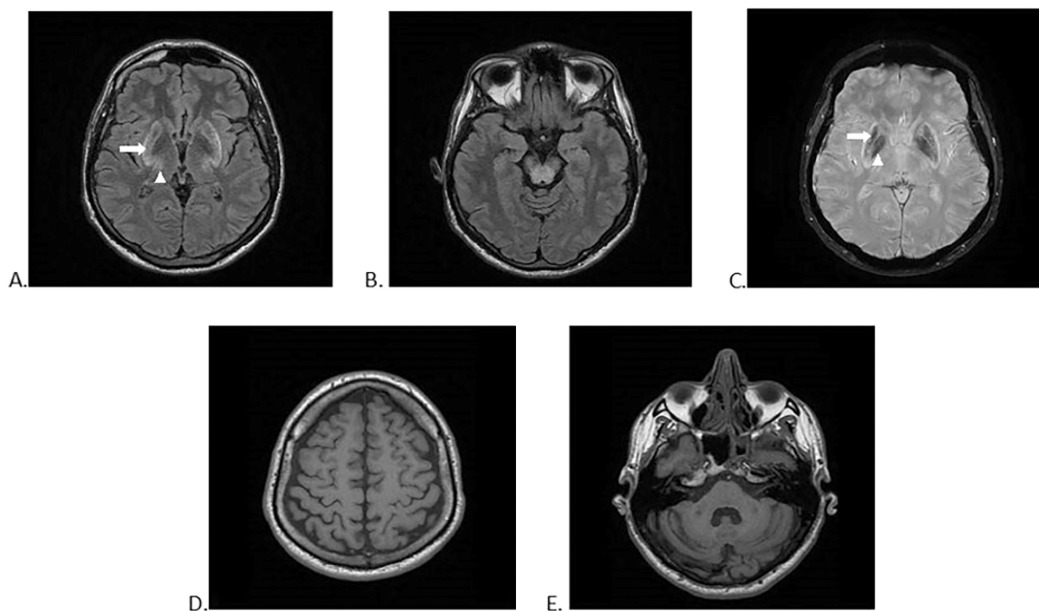
	Normalny sygnał/ brak zmian w MRI	Średnio nasilone zmiany w MRI	Ciężkie zmiany w MRI
<i>Ostra toksyczność, zmiany hiperintensywne w sekwencjach T2/FLAIR</i>			
Skorupa	0	1	2
Jądro ogoniaste	0	1	2
Wzgórze	0	1	2
Śródmózgowie	0	1	2
Most	0	1	2
Inne obszary	0	1	2
<i>Przewlekłe uszkodzenie, zmiany hipointensywne w sekwencjach T2/T*/SWI</i>			
Gałka biała	0		1
Skorupa	0		1
Jądro ogoniaste	0		1
Wzgórze	0		1
Jądro zębate	0		1
<i>Zaniki z oceną w sekwencjach T1 zależnych</i>			
Korowe	0	1	2
Centralne	0	1	2
Śródmózgowia	0	1	2
Mózdzku	0	1	2

FLAIR – *fluid-attenuation inversion recovery*, SWI – *susceptibility-weighted imaging*

W badaniu walidującym skalę Dusek ze współpracownikami ocenili badania MRI 39 pacjentów z chW i stwierdzili zgodność zarówno pomiędzy badaniami radiologów, zaślepionymi co do danych pacjentów, jak i pomiędzy ocenianymi badaniami MRI (Dusek *et al.*, 2020). Stwierdzono także dodatnią korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi w skali półilościowej do oceny uszkodzeń OUN w chW w oparciu o MRI – przewlekłe uszkodzenie oraz całkowity wynik – a częścią II skali UWDRS, a także częścią III UWDRS ($p < 0,01$). Również po 24 miesiącach obserwacji ostra toksyczność uwidoczniła w MRI mózgu korelowała dodatnio z II i III częścią UWDRS ($p < 0,01$). Poprawa w efekcie leczenia widoczna była zarówno w skali UWDRS, jak i skali MRI. Obserwacje te potwierdziło badanie na znacznie większej liczbie pacjentów ($n = 100$) przeprowadzone w 2022 roku przez Rędzie-Ogrodnik z zespołem (Rędzia-Ogrodnik *et al.*, 2022).

Ilościowa (wolumetryczna) ocena zaniku mózgu w chW w oparciu o MRI

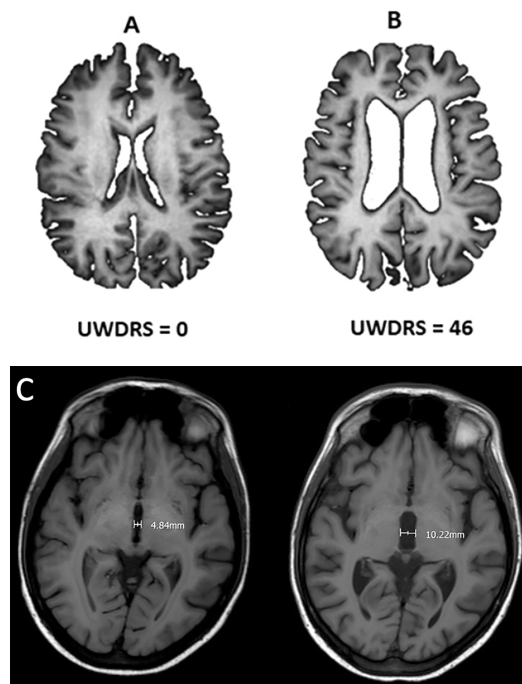
Już w pierwszych badaniach neuroobrazowych – tomografii komputerowej (ang. *computed tomography*, CT) oraz MRI mózgu – u pacjentów z chW wykazywano zaniki OUN, które dotyczyły kory mózgu, mózdzku oraz poszerzenia układu komorowego (King *et al.*, 1996). W trakcie analizy częstości zmian w mózgu w chW uwidocznionych



Zdjęcie 1. Zdjęcia MRI pacjentów z chW oraz propozycje oceny ciężkości uszkodzenia OUN w MRI mózgu wg skali półilościowej MRI w chW; **A i B** – obrazy w sekwencji FLAIR: **A**: zmiany hiperintensywne zlokalizowane w skorupkach (strzałka), wzgórzach (grot) oraz **B**: w pniu mózgu – nasilone zmiany świadczące o ostrej toksyczności, ocenione na 2 punkty za każdą z wymienionych struktur; **C** – Obrazy w sekwencji T2*: hipointensywne zmiany w skorupkach (strzałka) oraz gałkach białych (grot) – zmiany świadczące o przewlekłym uszkodzeniu, ocenione na 1 punkt za każdą z wymienionych struktur; **D i E** – Obrazy w sekwencji T1: **D**: umiarkowane zaniki korowe oraz **E**: umiarkowane zaniki mózdzku – ocenione na 1 punkt za każdą z wymienionych struktur

z pomocą MRI wykazano, że zaniki OUN to najczęstsze zmiany występujące w przebiegu chW. W większości prac na temat neuroobrazowania opisywano dotychczas zaniki w obrębie OUN subiektywnie (zero-jedynkowo, brak vs obecność) na podstawie oceny neuroradiologa (Prayer *et al.*, 1990; King *et al.*, 1996; Kozić *et al.*, 2003; da Costa *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 2013). Po wprowadzeniu do powszechnego użytku programów komputerowych (m.in. SIENAX, FreeSurfer) CT i MRI mózgu zaczęły służyć obiektywnej ocenie stopnia, lokalizacji, a także znaczenia zaników w obrębie OUN zarówno w chorobach neurodegeneracyjnych (ataksjach rdzeniowo-mózdzkowych, chorobie Parkinsona), jak i chorobach zapalnych (stwardnienie rozsiane), (Smoliński *et al.*, 2019; Shribman *et al.*, 2022). Jedną z pierwszych prac dotyczących oceny wolumetrycznej zaników OUN w chW był artykuł Smolińskiego (Smoliński *et al.*, 2019). Autorzy wykazali ilościowe zaniki całkowitej objętości mózgu, istoty szarej i białej u pacjentów z chW, a także określili ich znaczenie – ujemne korelacje pomiędzy zanikami w obrębie OUN a ciężkością zespołu neurologicznego (zdz. 2: A, B i C).

Kolejne, nowsze, prace oparte były na całkowicie automatycznej technice pomiaru objętości struktur OUN z użyciem tzw. badań morfometrycznych opartych na ocenie vokseli (ang. *voxel based morphometry*, VBM), (Smoliński *et al.*, 2019; Shribman *et al.*, 2021b; Shribman *et al.*, 2022). U pacjentów z chW stwierdzano zaniki istoty szarej w jądrach podstawy, wzgórzach, pniu mózgu, mózdzku, przedniej części kresomózgowia i korze okołoczołowej. Atrofia istoty szarej jąder



Zdjęcie 2. Badanie MRI mózgu u pacjentów z chW obrazujące, że postęp ciężkości deficytów neurologicznych w skali UDWRs związany jest z postępującym zanikiem mózgu; **A**: 26-letni pacjent z objawami uszkodzenia wątroby bez objawów neurologicznych (0 pkt UWDRS), (program analizy objętości mózgu i zaników SIENAX); **B**: obraz po 1 roku i wystąpieniu objawów neurologicznych (46 pkt UWDRS) po włączeniu leczenia i pogorszeniu neurologicznym; **C**: MRI mózgu tego samego pacjenta w sekwencjach T1 zależnych przed wystąpieniem objawów neurologicznych oraz 1 rok po wystąpieniu dystonicznej postaci choroby (pomimo leczenia przeciwmie-dziowego), (ponad dwukrotne powiększenie szerokości III komory)

ogoniastych, skorup, jądra dwuznacznego, lewej okolicy kory okołoozdolowej oraz kory wieczka była większa u pacjentów z objawami neurologicznymi w porównaniu z pacjentami, którzy mieli wyłącznie objawy uszkodzenia wątroby (Shribman *et al.*, 2022). Zmiany te korelowały negatywnie ze skalą klinicznej oceny neurologicznej chW (UWDRS).

Wziąwszy pod uwagę postępujący proces neurodegeneracji w przebiegu chW (przy braku leczenia lub leczeniu nieprawidłowym), możliwość automatycznych, obiektywnych pomiarów objętości struktur mózgowia, zgodność wyników wolumetrycznych OUN ze skalą kliniczną oceny neurologicznej chW (UWDRS), wydaje się, że badania te będą stanowiły w niedalekiej przyszłości rutynowe uzupełnienie monitorowania pacjentów z chW (Smoliński *et al.*, 2019; Shribman *et al.*, 2021b; Shribman *et al.*, 2022).

Spektroskopia rezonansu magnetycznego (MRS) mózgu

Spektroskopia MRI mózgu (ang. *magnetic resonance spectroscopy*, MRS) jest metodą pozwalającą na analizę metabolizmu badanych tkanek i stanowi ona uzupełnienie badań strukturalnych OUN (Alanen *et al.*, 1999; Tarnacka *et al.*, 2008). W przeszłości stosowano metody oparte na jądrach fosforu (P-MRS) oraz metodę protonową (wodorową) (1HMRS). Aktualnie w badaniach dotyczących chW używa się głównie metody tzw. spektroskopii wodorowej pojedynczego woksela (SV-1HMRS) – na klasyczny obraz MRI mózgu nakłada się sześcian (woksel, najczęściej wielkości od 1 do 3 cm) zlokalizowany w badanym przez nas obszarze tkanki mózgowej (Alanen *et al.*, 1999; Tarnacka *et al.*, 2008). Wynikiem badania jest widmo – spektra chemiczne z pasmami pokazującymi nam zawartość zarówno jakościową, jak i ilościową metabolitów zawartych w tkance mózgu. Najczęściej badanymi metabolitami OUN są N-acetyloasparginian (NAA) – marker neuronów, mioinoztyol (mI) produkt rozpadu mieliny, marker komórek glejowych, glutaminian (Glu) i glutamina (Gln) – markery astrocytów, mlecza (Lac) – produkty glikolizy beztlenowej (nieobecne w zdrowej tkance), cholina (Cho – prekursor acetylocholino oraz fosfatydylocholino, marker uszkodzenia błon komórkowych, kreatyna (Cr – marker procesów energetycznych komórek (Alanen *et al.*, 1999; Tarnacka *et al.*, 2008).

Przeprowadzono kilka badań dotyczących znaczenia MRS w chW. Wykazano między innymi, że w przebiegu chW w prążkowie dochodzi do obniżenia stosunku NAA/Cho oraz NAA/Cr, co jest wyznacznikiem ubytku neuronów oraz zaburzenia procesów energetycznych. Obserwowano wzrost stosunku mI/Cr oraz Gln/Cr, jako wyraz aktywacji astrocytów (funkcje ochronne i detoksykacyjne OUN). W przebiegu leczenia przeciwmiedziowego dochodzi do wzrostu wartości wskaźników NAA/Cho oraz mI/Cr (normalizacja metabolizmu neuronów, procesów energetycznych, stabilności błon komórkowych). Autorzy sugerowali, że zwłaszcza wskaźnik NAA/Cr może być

używany jako wczesny wskaźnik uszkodzenia neuronów w chW, wskazujący na początek zajęcia OUN w przebiegu chW (nawet u osób asymptomatycznych klinicznie), (Tarnacka *et al.*, 2008).

Niestety, jak wspomniano wcześniej, aby wykonać badania SV-1HMRS konieczne jest oznaczenie tzw. woksela, nieprawidłowej tkanki (nie zawsze występującej w wielkości pozwalającej na analizę), a badanie również wymaga odpowiedniego (odbiegającego od rutynowego) protokołu wykonania MRI oraz analizy radiologicznej. Z tego powodu dotychczasowe zastosowanie MRS ograniczało się do badań naukowych i w najbliższym czasie nie zostanie zaproponowane jako biomarker do szerszego zastosowania w chW (Alanen *et al.*, 1999; Tarnacka *et al.*, 2008; Antos *et al.*, 2020a).

3. Biomarkery molekularne – laboratoryjne

Neurofilamenty

Neurofilamenty (Nf) są główną składową cytoszkieletu neuronów (Khalil *et al.*, 2018). W zależności od masy molekularnej dzielą się na łańcuchy lekkie (NfL), pośrednie (NfM) oraz ciężkie (NfH). Od ponad 20 lat uznaje się je za marker neurodegeneracji, uszkodzenia neuroaksonalnego w chorobach neurodegeneracyjnych, między innymi w chorobie Parkinsona, chorobie Huntingtona, zaniku wieloukładowym, chorobie Alzheimera, stwardnieniu rozsianym, chorobach zapalnych (zapalenia mózgu infekcyjne i autoimmunologiczne) i wielu innych (Lu *et al.*, 2015; Disanto *et al.*, 2017; Barro *et al.*, 2018).

Większe stężenie NfL w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz surowicy koreluje pozytywnie z ciężkością powyższych chorób, ocenianą w odpowiednich skalach klinicznych, badaniami MRI mózgu („świeże” zmiany demielinizacyjne, nasilenie zaniku etc.) (Khalil *et al.*, 2018).

Wzrost stężenia NfL obserwuje się również z wiekiem (ok. 3,3% na rok), co związane jest prawdopodobnie z fizjologicznie postępującym zanikiem mózgowia oraz neuronów, które związane jest z wiekiem (Khalil *et al.*, 2018). Wyższe stężenia NfL obserwuje się również u mężczyzn (przypuszcza się, że z estrogeny mają neuroprotektoryjny wpływ w chorobach neurodegeneracyjnych).

W pojedynczych pracach, w których opisano ciężkie przypadki osób chorujących somatycznie (np. infekcja SARS-CoV-2), wykazano, że wysoki wyjściowy poziom NfL jest czynnikiem ryzyka zgonu u tych chorych. Aktualnie rozpatruje się włączenie NfL jako markera skuteczności leczenia w różnych chorobach neurodegeneracyjnych i zapalnych (De Lorenzo *et al.*, 2021).

NfL można oznaczać w surowicy (sNfL) oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym, przy czym na podstawie badań porównawczych obu wyników można stwierdzić, że wnioski z obu metod w odniesieniu do roli NfL jako markera neurodegeneracji są porównywalne (Khalil *et al.*, 2018).

Bardzo obiecujące wyniki wskazujące na pozytywne korelacje pomiędzy uszkodzeniem OUN a stężeniem NfL

w wielu chorobach zapalnych oraz neurodegeneracyjnych spowodowały, że NfL żartobliwie nazywa się biomarkerem uszkodzenia OUN, „analogiem białka ostrej fazy (CRP, z ang. *c-reactive protein*) w chorobach neurologicznych” (Lambertsen *et al.*, 2020; Gaetani, 2022).

W chW wszystkie dotychczasowe publikacje dotyczące NfL opracowano na podstawie wyników surowicy pacjentów. Pierwszą pracę dotyczącą sNfL przedstawił Shribman ze współpracownikami. Analizowali oni 40 pacjentów z chW (23 z objawami neurologicznymi i 17 z objawami wątrobowymi) oraz 38 osób z grupy kontrolnej (Shribman *et al.*, 2021a). Badacze stwierdzili, że poziom sNfL u pacjentów z objawami neurologicznymi chW jest istotnie wyższy niż u pacjentów wyłącznie z objawami uszkodzenia wątroby ($8,7 \text{ ng/mL}$ vs $7,0 \text{ ng/mL}$; $p < 0,01$), jak i w porównaniu z grupą kontrolną ($8,7 \text{ ng/mL}$ vs $7,6 \text{ ng/mL}$; $p < 0,01$). Nie zaobserwowano różnic między grupą kontrolną a pacjentami z chW bez objawów neurologicznych ($7,6 \text{ ng/mL}$ vs $7,0 \text{ ng/mL}$; ns). Badacze przeanalizowali pacjentów z objawami neurologicznymi pod kątem aktywności choroby. Pacjenci, u których po objawach wątrobowych wystąpiły objawy neurologiczne, oraz ci, których stan neurologiczny pogorszył się w trakcie leczenia, zdefiniowani zostali jako aktywna chW, pozostali jako stabilna. Wykazano, że u pacjentów z aktywną (postępującą) postacią neurologiczną chW stężenie sNfL jest wyższe niż w grupie stabilnej ($22,2 \text{ ng/mL}$ vs $7,7 \text{ ng/mL}$; $p < 0,01$). Dodatkowo najwyższe stężenia sNfL wystąpiły u pacjentów, których stan neurologiczny pogorszył się ($38,5 \text{ ng/mL}$). Stężenie sNfL korelowało również dodatnio z częścią III UWDRS ($\beta = 0,1$; $p < 0,01$). Badacze zasugerowali we wnioskach, że sNfL w przyszłości stanie się być może biomarkerem uszkodzenia OUN w przebiegu chW – służącym zarówno optymalizacji leczenia, jak i badaniom klinicznym. zalecając jednak dalsze badania celem potwierdzenia ich obserwacji.

Ziemssen z zespołem przeanalizował przypadki 61 pacjentów przyjmowanych kolejno do II Kliniki Neurologicznej Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie w latach 2012–2017, u których zdiagnozowano chW (Ziemssen *et al.*, 2022a). U wszystkich pacjentów wykonano MRI mózgu (aparatus 1,5 T) z oceną uszkodzenia w skali półilościowej (ostra toksyczność, przewlekłe uszkodzenie oraz całkowity wynik uszkodzenia OUN, badanie neurologiczne [UWDRS], ocenę fenotypu choroby (postać wątrobową, neurologiczną, presymptomatyczną) oraz badanie metabolizmu miedzi. W wynikach stwierdzono, że pacjenci z chW z objawami neurologicznymi mają znacznie wyższe stężenie sNfL niż pacjenci z postacią wątrobową i presymptomatyczną ($38,7 \pm 73,4$ vs $13,3 \pm 9,2 \text{ pg/mL}$; $p < 0,01$). Pacjenci z drżeniem (lżejsza i lepiej rokująca postać neurologiczna chW) mieli tendencje do niższych stężeń sNfL ($16,2 \pm 5,3 \text{ pg/mL}$) niż pacjenci z cięższymi neurologicznymi postaciami z parkinsonizmem ($44,9 \pm 46,6 \text{ pg/mL}$) i dystonią ($78,7 \pm 142,9 \text{ pg/mL}$; $p = 0,065$, drżenie vs inne postacie neurologiczne).

U pacjentów z objawami neurologicznymi ($n = 36$) stężenie sNfL dodatnio korelowało z częścią II UWDRS ($r = 0,37$; $p < 0,05$) oraz częścią III UWDRS ($r = 0,38$; $p < 0,05$). Stężenie sNfL w całej grupie 61 pacjentów dodatnio korelowało z półilościową skalą oceny MRI mózgu u pacjentów z chW, z ostrą toksycznością ($r = 0,48$; $p < 0,01$), przewlekłym uszkodzeniem ($r = 0,49$; $p < 0,01$) i wynikiem całkowitym ($r = 0,54$; $p < 0,01$). Badacze nie znaleźli związku pomiędzy wynikami metabolizmu miedzi a sNfL (Ziemssen *et al.*, 2022a). W dodatkowej analizie wykazali również, że wyższy wyjściowy poziom sNfL, przed włączeniem leczenia przeciwmiedziowego, jest czynnikiem ryzyka wczesnego pogorszenia neurologicznego ($33,2 \pm 23,5$ vs $27,6 \pm 62,7 \text{ pg/mL}$; $p < 0,01$) (Ziemssen *et al.*, 2022b).

Ziemssen z zespołem, opierając się na wynikach badań własnych oraz na pracy Shribmana *et al.* (2021a), wykazał, że sNfL są wartościowym ilościowym biomarkerem uszkodzenia OUN w chW, uzupełniającym badanie neurologiczne i kliniczne w skali UWDRS oraz półilościową ocenę MRI mózgu w chW.

Kolejną pracą, która potwierdziła znaczenie sNfL w chW, jest badanie, które przeprowadzili Yang i wsp. Zbadali oni 75 pacjentów z chW (54 z objawami neurologicznymi i 21 z wątrobowymi) oraz 27 zdrowych osób pod kątem stężenia sNfL w surowicy (Yang *et al.*, 2022). Potwierdzili oni wcześniejsze obserwacje (Shribman *et al.*, 2021a; Ziemssen *et al.* 2022a, Ziemssen *et al.*, 2022b), wedle których u pacjentów z chW i objawami neurologicznymi stężenie sNfL jest wyższe w porównaniu z pacjentami z chW z objawami wyłącznie wątrobowymi ($8,1 \text{ pg/mL}$ vs $3,1 \text{ pg/mL}$; $p < 0,01$). Stężenie sNfL korelowało również dodatnio z ciężkością objawów neurologicznych w skali UWDRS ($r = 0,291$; $p < 0,05$). Dodatkowo badacze analizowali objętościowe zaniki mózgu za pomocą programu FreeSurfer (istotę szarą, jądro półleżące, obustronnie objętości jąder soczewkowatych i skorup) i stwierdzili ujemne korelacje pomiędzy objętością tych struktur a stężeniami sNfL.

Podsumowując powyższe badania, można stwierdzić, sNfL są bardzo dobrym biomarkerem wskazującym na uszkodzenie OUN w przebiegu chW. Potwierdzają to korelacje zarówno ze skalami oceny ciężkości objawów neurologicznych chW (UWDRS), półilościową skalą MRI mózgu, jak i ocenami zaniku struktur mózgu związanych z chW (Shribman *et al.*, 2021a; Yang *et al.*, 2022; Ziemssen *et al.*, 2022a, Ziemssen *et al.*, 2022b).

Kwaśne białko włóknikowe

Kwaśne białko włóknikowe (ang. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) to główne białko należące do filamentów pośrednich, tworzące część cytoszkieletu dojrzałych astrocytów, najbardziej swoisty znacznik komórek pochodzenia astrocytarnego (Lekomtseva *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2021). Poza OUN GFAP występuje przede wszystkim w komórkach gwiaździstych wątroby (główny magazyn

witaminy A w organizmie [80%]; przy uszkodzeniu hepatocytów przekształcają się w komórki o fenotypie miofibroblastów i odgrywają główną rolę we włóknieniu wątroby), w komórkach Schwanna, gleju jelitowym, nowotworach ślinianek, przerzutowych nowotworach nerek, chrząstce nagłośni, komórkach przysadki, oponiakach brodawkowatych i niedojrzałych oligodendrocytach. Jeśli chodzi o funkcję – białko to jest ważne dla stabilności, ruchomości oraz kształtu astrocytów (Lin *et al.*, 2021).

W przypadku czynników uszkadzających OUN (między innymi toksycznych) dochodzi do proliferacji i hipertrofii astrocytów oraz wzrostu syntezy GFAP. Z tego powodu białko to jest traktowane jako biomarker uszkodzenia OUN w niektórych chorobach. Opisywano między innymi związek pomiędzy wzrostem stężenia GFAP w płynie mózgowo-rdzeniowym a stopniem niepełnosprawności w stwardnieniu rozsianym.

Shribman z zespołem jako pierwsi przeprowadził analizę stężeń GFAP w surowicy pacjentów z chW oraz w grupie kontrolnej (Shribman *et al.*, 2021a). Badacze nie znaleźli istotnych statystycznie różnic. U pacjentów z objawami neurologicznymi średnie stężenie wynosiło 84 ng/mL, u pacjentów z objawami wątrobowymi 80 ng/mL, a w grupie kontrolnej 84 ng/mL. Niezależnie od Shribmana, Lin i wsp. przeprowadzili analizę stężeń GFAP w surowicy pacjentów z chW na znacznie większej grupie chorych – u 94 pacjentów (74 z objawami neurologicznymi oraz 20 wyłącznie z objawami wątrobowymi) oraz u 25 osób zdrowych (Lin *et al.*, 2021). Autorzy wykazali, że stężenia GFAP w surowicy u pacjentów z chW z objawami neurologicznymi były wyższe (143,87 pg/mL) niż u pacjentów z objawami wątrobowymi (107,5 pg/mL) oraz zdrowych (86,85 pg/mL), ($p < 0,01$) (Lin *et al.*, 2021). Badacze zaproponowali stężenie GFAP 128,8 pg/mL (czułość 80% i specyficzność 63,5%) jako punkt różnicujący pacjentów z chW z objawami neurologicznymi od pacjentów bez objawów neurologicznych. Nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem GFAP w surowicy oraz ciężkością objawów neurologicznych w skali UWDRS ani zmianami w MRI mózgu.

Sprzeczne wyniki opublikowanych badań oraz brak korelacji GFAP z objawami klinicznymi (UWDRS oraz MRI mózgu) wskazują na to, że stężenie GFAP ma ograniczoną wartość jako biomarker w chW, a jego obecność we krwi może świadczyć zarówno o uszkodzeniu wątroby (włóknieniu), jak i uszkodzeniu astrocytów (OUN) w przebiegu chW (Lin *et al.*, 2021; Shribman *et al.*, 2021a).

Białko tau

Białko tau (ang. *microtubule associated protein tau*, MAPT) występuje prawie wyłącznie w neuronach. Jest związane z mikrotubulami, warunkuje odległość między nimi, odpowiada za ich wiązanie z neurofilamentami oraz za ich stabilizację (Gao *et al.*, 2018; Goedert, 2018; Lekontseva *et al.*, 2019). Białko tau jest pozbawioną

kwasu sjałowego transferyną. Powinowactwo białka tau do mikrotubul zależy od stopnia jego fosforylacji. Nadmierna fosforylacja białka tau powoduje zwyrodnienie włókienkowe, którego ilość koreluje z nasileniem objawów choroby Alzheimera. Kortykosteroidy zwiększają fosforylację białka tau bezpośrednio. Ważne jest ponadto, że czynniki wpływające na wzrost syntezy kortykosteroidów, takie jak stres, toksyny, zapalenie, również w sposób pośredni nasilają fosforylację białka tau (Goedert, 2018). W dotychczasowych badaniach wykazano, że podwyższone stężenie białka tau w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w surowicy krwi obserwuje się nie tylko w choroba neurozwyrodnieniowych, ale także u pacjentów po urazach mózgu, z ostrym udarem niedokrwiennym mózgu, wirusowych zapaleniach mózgu, z ciężkimi napadami padaczkowymi (Josephs, 2017; Gao *et al.*, 2018). Doniesienia te spowodowały, że białko tau aktualnie uważa się również za marker uszkodzenia neuroaksonalnego w wielu chorobach OUN.

Dotychczas przeprowadzono dwa badania dotyczące potencjalnej roli białka tau w chW. W pierwszym badaniu Lekontseva i współpracownicy przebadali 47 pacjentów z chW (wszyscy z objawami neurologicznymi, przy czym 28 pacjentów nie miało klinicznych objawów uszkodzenia wątroby) oraz 30 osób z grupy kontrolnej (Lekontseva *et al.*, 2019). U pacjentów z chW stężenia białka tau w surowicy były wyższe niż w grupie kontrolnej (221,7 pg/mL vs 71,1 pg/mL; $p < 0,0001$). Pacjenci z objawami wyłącznie neurologicznymi mieli tendencję do wyższych wartości białka tau w surowicy w porównaniu z pacjentami z objawami neurologicznymi i klinicznymi objawami uszkodzenia wątroby (231,3 pg/mL vs 207,6 pg/mL; $p > 0,05$).

Drugie badanie, przeprowadzone przez Shribmana i współpracowników, nie potwierdziło tych doniesień. Nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie różnic w stężeniach białka tau w surowicy u pacjentów z chW z objawami neurologicznymi w porównaniu z grupą kontrolną, czy z grupą pacjentów z chW z objawami wyłącznie wątrobowymi (Shribman *et al.*, 2021a).

Hydrolaza C-końcowa ubikwityny L1

Hydrolaza C-końcowa ubikwityny L1 (ang. *ubiquitin C-terminal hydrolases*, UCH-L1) jest enzymem hydrolicznym rozkładającym małe addukty C-końcowe ubikwityny celem wytworzenia monomeru ubikwityny. Ubikwityna jest to białko biorące udział w oznaczaniu (ubikwitynizacji) białek, które mają ulec nielizosomalnej proteolizie. Ekspresja UCH-L1 jest specyficzna dla neuronów, komórek układu neuroendokrynnego (w tym ich guzów) oraz jąder i jajników. Mutacje w obrębie genu UCH-L1 związane są z chorobami neurodegeneracyjnymi (chorobą Parkinsona, chorobą Alzheimera) poprzez interakcje z białkami – alfa synukleina i parkiną (Bost *et al.*, 2016; Josephs, 2017; Shribman *et al.*, 2021a).

W chW dotychczas przeprowadzono jedno badanie z UCH-L1 (Shribman *et al.*, 2021a) Poszukując

biomarkerów uszkodzenia OUN, badacze oznaczali sNfL, GFAP, białko tau oraz UCH-L1. Wykazali, że u pacjentów z chW, w porównaniu z grupą kontrolną, poziom UCH-L1 w surowicy krwi był wyższy, nie stwierdzili natomiast różnic pomiędzy pacjentami z objawami neurologicznymi oraz wątrobowymi (Shribman *et al.*, 2021a). Było to jak dotychczas jedyne badanie w którym oceniano rolę UCH-L1 jako biomarkera w chW, dlatego dalsze badania są konieczne do weryfikacji powyższych obserwacji.

Biomarkery metabolizmu miedzi

Biomarkery metabolizmu miedzi pozwalają rozpoznać chW niezależnie od postaci klinicznej oraz monitorować skuteczność metaboliczną leczenia.

Jednym z intensywniej ocenianych w badaniach markerów miedzi jest *non-ceruloplasmin bound copper* (NCC), czyli frakcja miedzi niezwiązana z ceruloplazminą (Cp), toksyczna, tzw. wolna miedź. Frakcja ta w chW jest zwykle podwyższona. Wylicza się ją pośrednio, mnożąc wartość Cp (wyrażonej w mg/dL) razy 3,14, a następnie odejmując tę wartość od stężenia miedzi w surowicy (wyrażonej w µg/dL). W warunkach fizjologicznych wartość NCC w surowicy wynosi 5–15 µg/dL. U chorych na chW obserwuje się stężenia NCC >15 µg/dL. Zgodnie z zaleceniami EASL, NCC można stosować do monitorowania prawidłowego przyjmowania leku w chW przez pacjenta (prawidłowe stężenie NCC) albo wykrywania jego przedawkowania (<5 µg/dL). Problemem ze stosowaniem NCC jest pośredni sposób obliczania, co szczególnie w przypadku stosowania immunologicznej analizy stężenia Cp w surowicy daje wyniki niediagnostyczne – ujemne nawet w kilkunastu procentach przypadków (EASL, 2012). Aktualnie poszukuje się bezpośrednich metod analizy NCC (Weiss *et al.*, 2017; Antos *et al.*, 2021). Obiecujące są prace między innymi z Francji, gdzie opisano oznaczanie bezpośrednie frakcji wolnej miedzi – miedzi wymienialnej (ang. *exchangeable copper*, CuEXC) i jej pochodnej – relatywnie wymienialnej miedzi (ang. *relative exchangeable copper*, REC). Badania te wymagają dalszej międzynarodowej walidacji. Warto pamiętać, że nie są to bezpośrednie markery uszkodzenia OUN w chW; potencjalnie będą miały zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu stanu metabolizmu miedzi w trakcie leczenia chW (EASL, 2012).

Kolejnym istotnym biomarkerem metabolizmu miedzi, stosowanym zarówno w diagnostyce, jak i w monitorowaniu leczenia chW, jest dobowe wydalanie miedzi w moczu (EASL, 2012). W diagnostyce chW jest to ciągle najlepszy i najczulszy pojedynczy biomarker stosowany w diagnostyce chW. U osób chorych na chW wynosi zwykle >100 µg/24 godz. (norma 0–50 µg/24 godz.), (EASL, 2012). Natomiast w monitorowaniu leczenia, po początkowym wzroście dobowego wydalania miedzi w moczu nawet >1000 µg/24 godz., u prawidłowo leczonych pacjentów lekami chelatującymi, powinno wynosić około 200–500 µg/24 godz. (przy prawidłowym stosowaniu się

pacjentów do zaleceń lekarza). W przypadku stosowania soli cynku w leczeniu przewlekłym (>1 rok) dobowe wydalanie miedzi w moczu powinno wynosić <75 µg/24 godz. Jest to aktualnie najczęściej stosowany i najważniejszy biomarker metabolizmu miedzi służący monitorowaniu leczenia chW (EASL, 2012).

Wnioski

Podsumowując aktualne możliwości oceny neurologicznej chW – zgodnie z aktualnymi zaleceniami EASL każdy pacjent z chW powinien być regularnie badany neurologicznie, co najmniej dwa razy w roku (siła zaleceń GRADE II-2, B,1). Ze względu na dużą różnorodność objawów neurologicznych, różnice w ich ciężkości, a także dzienne fluktuacje objawów dochodzi do tego, że trudno jest czasami nawet opisowo określić objawy oraz ich ciężkość (EASL, 2012). Dlatego powinno się oceniać pacjenta obiektywnie, według tego samego schematu badania, w określonej skali oceny neurologicznej. Ze względu na to, że nie przyjęto na całym świecie jednej skali (GAS for WD funkcjonuje w Indiach; UWDRS w Europie), ważne jest, żeby używać porównywalnych narzędzi do oceny objawów neurologicznych chW (EASL, 2012). Na podstawie analizy piśmiennictwa dotyczącego chW, badań dodatkowych, biomarkerów (klinicznych, neuroradiologicznych i biochemicznych), jak również badań klinicznych z ostatnich lat (WTX101-201, ALXN1840, CHELATE i innych) można stwierdzić, że najczęściej używaną skalą jest UWDRS (Weiss *et al.*, 2017; Antos *et al.*, 2020b; Antos *et al.*, 2021; Shribman *et al.*, 2021a).

W zakresie oceny neuroradiologicznej ciekawą propozycją od 2020 roku jest półilościowa ocena MRI w chW. Ocenia się w niej osobno potencjalnie odwracalne zmiany (ostra toksyczność) i zmiany nieodwracalne (przewlekłe uszkodzenie i atrofia) (Dusek *et al.*, 2020). Za szerszym użyciem tej skali, a także UWDRS przemawia udokumentowanie pozytywnych korelacji pomiędzy UWDRS i skalą MRI (Dusek *et al.*, 2020; Rędzia-Ogrodnik *et al.*, 2022).

Drugą interesującą opcją badań radiologicznych, ze względu na automatyczne pomiary (wolne od subiektywności oceny radiologa), są badania morfometryczne wolumetrii OUN w chW (Smoliński *et al.*, 2019; Poujois *et al.*, 2020; Shribman *et al.*, 2022). Ich wyniki oraz istotne statystycznie korelacje z UWDRS podkreślają znaczenie tych obserwacji.

Markerem uzupełniającym skalę kliniczną (UWDRS) oraz neuroradiologiczną (półilościową oraz wolumetryczne oceny OUN) jest stężenie NfL w surowicy krwi, które koreluje zarówno z ciężkością objawów i deficytów neurologicznych, jak i zmianami w MRI mózgu, co udowodniły trzy niezależne badania (Shribman *et al.*, 2021a; Yang *et al.*, 2022; Ziemssen *et al.*, 2022a, Ziemssen *et al.*, 2022b).

Podsumowując temat biomarkerów uszkodzenia OUN w chW, można stwierdzić, że prawdopodobnie

w najbliższych latach, zarówno w badaniach akademickich, jak i przemysle farmaceutycznym opisane powyżej trzy metody: ocena kliniczna, radiologiczna (być może bardziej zobiektywizowana z użyciem sztucznej inteligencji) i biochemiczna uszkodzenia OUN w chW, będą

podstawowymi narzędziami służącymi poprawie leczenia neurologicznego u pacjentów z chW (Antos *et al.*, 2020; Poujois *et al.*, 2020; Kalita *et al.*, 2021; Shribman *et al.*, 2021b). W tabeli 2 zbiorczo przedstawiono omówione w tekście markery. ■

Tabela 2. Biomarkery uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w chorobie Wilsona oraz ich potencjalne zastosowanie

Rodzaj biomarkera	Rodzaj badania	Znaczenie kliniczne
Biomarkery kliniczne	Skala UWDRS	Skala do oceny zaawansowania niesprawności w czynnościach dnia codziennego (część II) oraz deficytów neurologicznych (część III); aktualnie rekomendowana przez towarzystwa międzynarodowe do oceny stanu neurologicznego pacjentów z chW w rutynowej opiece oraz w badaniach klinicznych
	Skala GAS for WD	Skala do oceny zaawansowania chW; ocenia się za jej pomocą: globalną niesprawność, ciężkość choroby wątroby, zaburzenia poznawcze, zaburzenia motoryczne oraz kostno-stawowe – używana głównie w Indiach (tam powstała), zarejestrowana jako skala Movement Disorders Society
Biomarkery neuroradiologiczne (neuroobrazowe)	Rezonans magnetyczny mózgu (MRI)	Zmiany typowe dla chW w MRI mózgu są włączone w algorytm diagnostyczny chW (tzw. <i>Ferenci score</i>); znaczenie głównie jako biomarker diagnostyczny
	Skala półilościowa oceny MRI mózgu w chW	Skala do oceny uszkodzenia OUN z pomocą MRI mózgu składa się z 2 części (ostra toksyczność – zmiany potencjalnie odwracalne – i przewlekłego uszkodzenia OUN – zmiany nieodwracalne); przedstawia w sposób ilościowy ciężkość uszkodzenia OUN w MRI mózgu; dobrze koreluje z ciężkością stanu neurologicznego w UWDRS (częścią II i III) oraz poziomem łańcuchów lekkich neurofilamentów w surowicy krwi
	Ocena wolumetryczna zaniku mózgu w chW	Aktualnie ocena zaniku jest przeprowadzana w programach komputerowych np. SIENAX, FreeSurfer; zaniki mózgu korelują z ciężkością zespołu neurologicznego w UWDRS, metabolizmem miedzi – w przyszłości ocena zaniku OUN może być punktem końcowym badań lekowych w chW
	Spektroskopia rezonansu magnetycznego (MRS) mózgu	Dotychczas głównie naukowe zastosowanie – zmiany metabolizmu w jądrach podkorowych obserwowano nawet u bezobjawowych pacjentów z chW
Biomarkery molekularne – laboratoryjne	Łańcuchy lekkie neurofilamentów (NfL)	Biomarker neurodegeneracji w chorobach neurozwyrodnieniowych. W chW wykazano, że poziom sNfL w surowicy koreluje dodatnio z ciężkością deficytów neurologicznych (UWDRS) oraz uszkodzenia OUN w MRI (skala półilościowa); wyższy poziom w surowicy przy rozpoczęciu leczenia chW może być czynnikiem ryzyka pogorszenia neurologicznego po włączeniu leczenia. Najbardziej obiecujący biomarker monitorowania leczenia w chW uzupełniający skale kliniczne, metabolizm miedzi i MRI mózgu.
	Kwaśne białko włóknkowe (GFAP)	Biomarker komórek pochodzenia astrocytarnego; w chW wykazano wyższe poziomy GFAP w surowicy u pacjentów z objawami neurologicznymi w porównaniu z grupą kontrolną oraz z pacjentami z objawami wyłącznie wątrobowymi – wymaga dalszych badań jako marker monitorowania leczenia (zajęcie OUN w przebiegu chW)
	Białko tau	Nie wykazano znaczenia w chW
	Hydrolaza C-końcowa ubikwityny L1 (UCH-L1)	Wykazano wyższe poziomy UCH-L1 w surowicy krwi u pacjentów z chW w porównaniu z grupą kontrolną (1 badanie); zastosowanie wymaga dalszych badań
	Biomarkery metabolizmu miedzi: 1. tzw. wolna miedź NCC 2. dobowe wydalanie miedzi w moczu	1. NCC – biomarker diagnostyczny (podwyższone wartości w surowicy >15 µg/dL wskazują na chW) oraz biomarker monitorowania leczenia – w trakcie leczenia przeciwmiedziowego wartości wskazujące na prawidłowe leczenie 5–15 µg/dL 2. Dobowe wydalanie miedzi w moczu – biomarker diagnostyczny >50 µg/24 godz. w moczu wskazuje na chW (część algorytmu diagnostycznego chW – indeks Ferenciego) oraz biomarker monitorowania leczenia: na lekach chelatujących wydalanie miedzi w moczu przy prawidłowym leczeniu przewlekłym 200–500 µg/24 godz., na solach cynku <75 µg/24 godz.

chW – choroba Wilsona; UWDRS – Unified Wilson Disease Rating Scale; GAS for WD – Global Assessment Scale for Wilson's Disease; MRI – *magnetic resonance imaging*; NCC – *non-ceruloplasmin bound copper*; sNfL – *serum neurofilament light chain level*

Oświadczenie o finansowaniu i konflikcie interesów

Authors declare no conflict of interest and financial support. / Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów, praca nie ma dodatkowych źródeł finansowania.

The work described in this article has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical

Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. / Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helseńskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

References / Piśmiennictwo

- Alanen A, Komu M, Penttinen M, Leino R. Magnetic resonance imaging and proton MR spectroscopy in Wilson's disease. *Brit J Radiol* 1999; 72: 749-756.
- Antos A, Litwin T, Skowrońska M, Kurkowska-Jastrzębska I, Członkowska A. Diagnostyka choroby Wilsona – aktualne zalecenia. *Polski Przegląd Neurologiczny* 2020; 16: 209-222. (a)
- Antos A, Litwin T, Skowrońska M, Kurkowska-Jastrzębska I, Członkowska A. Leczenie choroby Wilsona – aktualne zalecenia. *Polski Przegląd Neurologiczny* 2020; 16: 223-238. (b)
- Antos A, Litwin T, Skowrońska M, Kurkowska-Jastrzębska I, Członkowska A. Perspektywy leczenia choroby Wilsona. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* 2021; 37: 155-167.
- Aggarwal A, Aggarwal N, Nagral A, Jankharia G, Bhatt M. A novel global assessment scale for Wilson's disease (GAS for WD). *Mov Disord* 2009; 24: 509-518.
- Barro C, Benkert P, Disanto G, Tzagkas C, Amann M, Naegelin Y *et al.* Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain* 2018; 141: 2382-2391.
- Beinhardt S, Leiss W, Stattermayer AF, Graziadei I, Zoller H, Stauber R *et al.* Long-term outcomes of patients with Wilson disease in a large Austrian cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12: 683-689.
- Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2016; 35: 107-115.
- Bruha R, Marecek Z, Pospisilova L, Nevsimalova S, Vitek L, Martasek P *et al.* Long-term follow-up of Wilson disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver Int* 2011; 31: 83-91.
- da Costa M, Spitz M, Bacheschi LA, Leite CC, Lucato LT, Barbosa ER. Wilson's disease: two treatment modalities. Correlations to pretreatment and posttreatment brain MRI. *Neuroradiology* 2009; 51: 627-633.
- Członkowska A, Tarnacka B, Litwin T, Gajda J, Rodo M. Wilson's disease – cause of mortality in 164 patients during 1992–2003 observation period. *J Neurol* 2005; 252: 698-703.
- Członkowska A, Tarnacka B, Möller JC, Leinweber B, Bandmann O, Woimant F *et al.* Unified Wilson's Disease Rating Scale – proposal for the neurological scoring of Wilson's disease patients. *Neurol Neurochir Pol* 2007; 41:1-12.
- Członkowska A, Litwin T. Wilson disease – currently used anticopper therapy. In: *Handb. Clin Neurol, Wilson disease.* Członkowska A, Schilsky ML (ed.), 2017; 142: 181-91.
- Członkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V *et al.* Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018; 4: 21. (a)
- Członkowska A, Litwin T, Dzieżyc K, Karliński M, Bring J, Bjartmar C. Characteristic 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: 34. (b)
- De Lorenzo R, Loré NI, Finardi A, Mandelli A, Cirillo DM, Tresoldi C *et al.* Blood neurofilament light chain and total tau levels at admission predict death in COVID-19 patients. *J Neurol* 2021; 268: 4436-4442.
- Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A *et al.* Serum neurofilament light: a biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2017; 81: 857-70.
- Dusek P, Smoliński L, Redzia-Ogrodnik B, Golebiowski M, Skowrońska M, Poujois A *et al.* Semiquantitative scale for assessing brain MRI abnormalities in Wilson disease: a validation study. *Mov Disord* 2020; 35: 994-1001.
- EASL. European Association For The Study of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol* 2012; 56: 671-85.
- Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I *et al.* Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int* 2003; 23: 139-42.
- Gaetani L, Parnetti L. NfL as analogue of C-reactiv protein in neurologic diseases. *Instructions for use. Neurology* 2022; 98: 911-912.
- Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, Yu JT. Tau in neurodegenerative disease. *Ann Transl Med*. 2018; 6: 175.
- Goedert M. Tau filaments in neurodegenerative disease. *FEBS Letters* 2018; 592: 2383-2391.
- Josephs KA. Current understanding of neurodegenerative disease associated with the protein tau. *Mayo Clin Proc* 2017; 92: 1291-1303.
- Kalita J, Kumar V, Parashar V, Misra UK. Neuropsychiatric manifestations of Wilson's disease: correlation with MRI and glutamate excitotoxicity. *Molecular Neurobiology* 2021; 58: 6020-6031.
- Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gatteringer T *et al.* Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 2018; 14: 577-89.
- King AD, Walshe JM, Kendall BE, Chinn RJ, Paley MN, Wilkinson ID *et al.* Cranial MR imaging in Wilson's disease, *AJR Am J Roentgenol* 1996; 167: 1579-1584.
- Kozić D, Svetel M, Petrović B, Dragasević N, Semnic R, Kostić VS. MR imaging of the brain in patients with hepatic form of Wilson's disease. *Eur J Neurol* 2003; 10: 587-592.
- Lambertsen KL, Soares CB, Gaist D, Nielsen HH. Neurofilaments: the C-reactive protein of neurology. *Brain Sci* 2020; 10: 1-29.
- Lekomtseva Y, Voloshyn-Gaponov I, Gorbach T. Targeting higher levels of tau protein in Ukrainian patients with Wilson's disease. *Neurol Ther* 2019; 8: 59-68.
- Lin J, Zheng Y, Liu Y, Lin Y, Wang Q, Lin XH *et al.* Higher concentration of plasma glial fibrillary acidic protein in Wilson disease patients with neurological manifestations. *Mov Disord* 2021; 36(6): 1446-1450.
- Litwin T, Gromadzka G, Członkowska A, Gołębiowski M, Poniatowska R. The effect of gender on brain MRI pathology in Wilson's disease. *Metab. Brain Dis* 2013; 28: 69-75.
- Litwin T, Dzieżyc K, Karliński M, Chabik G, Czepiel W, Członkowska A. Early neurological worsening in patients with Wilson's Diseases. *J Neurol Sci* 2015; 355: 162-7.
- Litwin T, Dusek P, Członkowska A. Symptomatic treatment of neurologic symptoms in Wilson disease. *Handb Clin Neurol* 2017; 142: 211-23.
- Litwin T, Dusek P, Szafranski T, Dzieżyc K, Członkowska A, Rybakowski JK. Psychiatric manifestations in Wilson's disease: possibilities and difficulties for treatment. *Ther Adv Psychopharmacol* 2018; 8: 199-211.
- Litwin T, Dzieżyc K, Członkowska A. Wilson disease – treatment perspectives. *Ann. Transl Med* 2019; 7: S68.
- Lu CH, Macdonald-Wallis C, Gray E, Pearce N, Petzold A, Norgren N *et al.* Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2015; 84: 2247-57.
- Medici V, Mirante VG, Fassati LR, Pompili M, Forti D, Del Gaudio M *et al.* Liver transplantation for Wilson's disease: The burden of neurological and psychiatric disorders. *Liver Transpl* 2005; 11: 1056-63.

39. Prayer L, Wimberger D, Kramer J, Grimm G, Oder W, Imhof H. Cranial MRI in Wilson's disease. *Neuroradiology* 1990; 32: 211-214.
40. Poujois A, Sobesky R, Meissner WG, Brunet AS, Broussolle E, Laurencin C *et al.* Liver transplantation as a rescue therapy for severe neurologic forms of Wilson disease. *Neurology* 2020; 94: e2189-202.
41. Rędzia-Ogrodnik B, Członkowska A, Bembenek J, Antos A, Kurkowska-Jastrzębska I, Skowrońska M *et al.* Brain magnetic resonance imaging and severity of neurological disease in Wilson's disease – the neuroradiological correlations. *Neurol Sci.* 2022; 43: 4405-4412.
42. Schilsky ML. Long-term outcome for Wilson disease: 85% good. *Clin. Gastroenterol. Hepatol* 2014; 12: 690-1.
43. Shribman S, Heller C, Burrows M, Heslegrave A, Swift I, Foiani MS *et al.* Plasma neurofilament light as a biomarker of neurological involvement in Wilson's disease. *Mov Disord* 2021; 36: 50-8. (a)
44. Shribman S, Poujois A, Bandmann O, Członkowska A, Warner TT. Wilson's disease: update on pathogenesis, biomarkers and treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2021; 92: 1053-1061. (b)
45. Shribman S, Bocchetta M, Sudre CH, Acosta-Cabronero J, Burrows M, Cook P *et al.* Neuroimaging correlates of brain injury in Wilson's disease: a multimodal, whole-brain MRI study. *Brain* 2022; 29; 145(1): 263-275.
46. Sinha S, Taly AB, Prashanth LK, Ravishankar S, Arunodaya GR, Vasudev MK. Sequential MRI changes in Wilson's disease with de-coppering therapy: a study of 50 patients. *Br J Radiol* 2007; 80: 744-749.
47. Smoliński L, Litwin T, Redzia-Ogrodnik B, Dziezyc K, Kurkowska-Jastrzębska I, Członkowska A. Brain volume is related to neurological impairment and to copper overload in Wilson's disease. *Neurological Sciences* 2019; 40: 2089-2095.
48. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5: 463-466.
49. Südmeyer M, Saleh A, Wojtecki L, Cohnen M, Gross J, Ploner M *et al.* Wilson's disease tremor is associated with magnetic resonance imaging lesions in basal ganglia structures. *Mov Disord* 2006; 21: 2134-2139.
50. Tarnacka B, Szeszkowski W, Gołębiowski M, Członkowska A. MR spectroscopy in monitoring the treatment of Wilson's disease patients. *Mov Disord* 2008; 23: 1560-1566.
51. Volpert HM, Pfeiffenberger J, Gröner JB, Stremmel W, Gotthardt DN, Schäfer M *et al.* Comparative assessment of clinical rating scales in Wilson's disease. *BMC Neurology* 2017; 17: 140.
52. Weiss KH, Stremmel W. Clinical considerations for an effective medical therapy in Wilson's disease. *Ann N Y Sci* 2014; 1315: 81-5.
53. Weiss KH, Askari FK, Członkowska A, Ferenci P, Bronstein JM, Bega D *et al.* Bis-choline tetrathiomolybdate in patients with Wilson's disease: an open label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; 2: 869-876.
54. Yang J, Huang Z, Yang H, Luo Y, You H, Chen D *et al.* Plasma neurofilament light chain as a biomarker in Wilson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2022; 95: 5-10.
55. Ziemssen T, Akgun K, Członkowska A, Antos A, Bembenek J, Kurkowska-Jastrzębska I *et al.* Serum neurofilament light chain as a biomarker of brain injury in Wilson's disease: Clinical and neuroradiological correlations. *Mov Disord* 2022; 37: 1074-1079. (a)
56. Ziemssen T, Smolinski L, Członkowska A, Akgun K, Antos A, Bembenek J *et al.* Serum neurofilament light chain and initial severity of neurological disease predict the early neurological deterioration in Wilson's disease. *Acta Neurologica Belgica* 2022, doi: 10.1007/s13760-022-02091-z. (b)

