

lek. Krzysztof Hadrian

**Charakterystyka biochemiczna
mysiego modelu choroby Wilsona**

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

Promotor: prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Adam Przybyłkowski

Klinika Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2025

Słowa kluczowe:

choroba Wilsona, *Jackson toxic milk mouse*, miedź, neurofilamenty, TXRF, FTIR

Key Words:

Wilson's Disease, Jackson toxic milk mouse, copper, neurofilaments, TXRF, FTIR

Nazwa i numer projektu badawczego:

Badanie, którego wyniki są prezentowane w rozprawie doktorskiej wykonano w ramach projektu badawczego zatytułowanego „Ocena neurodegeneracji ośrodkowego układu nerwowego *toxic milk mouse* – modelu zwierzęcego choroby Wilsona” o nr.: 1WZ/1/M/MB/N/20.

Spis treści

Nazwa i numer projektu badawczego:	3
Wykaz stosowanych skrótów	6
Spis tabel, wykresów i map	8
Streszczenie	12
Streszczenie w języku angielskim	14
Wstęp	16
Kliniczna manifestacja choroby Wilsona.....	18
Manifestacje wątrobowe	18
Manifestacje neurologiczne	20
Manifestacje psychiatryczne	21
Manifestacje nefrologiczne	21
Manifestacje kardiologiczne	23
Manifestacje okulistyczne	23
Manifestacje hematologiczne.....	25
Manifestacje kostno-stawowe	26
Diagnostyka	26
Leczenie	29
Zwierzęce modele choroby Wilsona	31
Gryzonie.....	31
Inne ssaki.....	41
Inne kręgowce	42
Cel pracy	43
Material i metody	44
Skład pierwiastkowy	45
Skład biochemiczny	46
Mikroobrazowanie FTIR i μ -XRF	48
Badania biochemiczne krwi	49
Aktywność ceruloplazminy.....	49

Testy funkcji wątroby.....	50
Stężenie neurofilamentów (Nf-L)	50
Analiza statystyczna.....	50
Wyniki.....	52
Prążkowie – skład pierwiastkowy.....	52
Prążkowie – skład biochemiczny	60
Stężenie neurofilamentów	66
Wątroba – skład pierwiastkowy	66
Wątroba – skład organiczny	69
Badania czynnościowe wątroby	77
Serce – skład pierwiastkowy	77
Dwunastnica – skład pierwiastkowy	83
Oko – skład pierwiastkowy	89
Dyskusja.....	97
Wnioski	107
Piśmiennictwo.....	108
Opinia Komisji Bioetycznej.....	117

Wykaz stosowanych skrótów

2D – dwuwymiarowy

ALP – fosfataza alkaliczna

ALT – aminotransferaza alaninowa

AS-OCT – optyczna koherentna tomografia komputerowa przedniego odcinka oka

AST – aminotransferaza asparaginianowa

Cpt1A – palmitoilotransferaza karnitynowa 1A

CSF – płyn mózgowo-rdzeniowy

CTR1 – transporter miedzi 1

CuEXC – frakcja miedzi wymienialnej

DMT1 – transporter jonów dwuwartościowych 1

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

FDA – Amerykańska Agencja Żywności i Leków

FTIR – metoda Fourierskiej spektroskopii w podczerwieni

FXR – receptor X farnesoidowy

GSH – zredukowana forma glutationu

GSSG – utleniona forma glutationu

H-E – barwienie hematoksyliną i eozyną

HE – encefalopatia wątrobowa

IL-1 β – interleukina-1 beta

IL-4 – interleukina 4

IQR – rozstęp międzykwartlowy

Kontrola F – samice grupy kontrolnej

Kontrola M – samce grupy kontrolnej

LEC – szczep szczurów *Long-Evans cinnamon*

LPP – szczep szczurów PINA/ATP7B (-)

LV-GCS – globalne odkształcenie okrężne mięśnia lewej komory

LXR – receptor X wątroby

MCT – detektor rtęciowo-kadmowo-tellurkowy

MRI – obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

ggn – górna granica normy

NAT – N-acetylotransferaza serotoniny

Ndufb7 – podjednostka B7 oksydoreduktazy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

Nf-L – neurofilament podjednostka lekka

Nos2 – syntaza tlenku azotu 2

oun- ośrodkowy układ nerwowy

PPARα – aktywowany receptor proliferatora peroksysomów alfa

ppm – części na milion (parts per milion)

REC – względne stężenie miedzi wymiennej (*relative exchangeable copper*)

ROI – obszar zainteresowania

RXR – receptor retinoidowego X

SAH – S-adenozylhomocysteina

SDD – krzemowy detektor dryfowy

Sdhaf2 – zespół dehydrogenazy bursztynianowej 2

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

Srebf1 – czynnik transkrypcyjny wiążący elementy regulacyjne steroli 1

TNF – czynnik martwicy nowotworów

txJ – szczep myszy *Jackson toxic milk mouse*

txJ F – samice grupy *Jackson toxic milk mouse*

txJ M – samce grupy *Jackson toxic milk mouse*

txR – szczep myszy *toxic milk* opisanych przez Raucha

TXRF – metoda pomiaru całkowitego odbicia promieniowania rentgenowskiego

VLDL – lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości

WD – choroba Wilsona

Spis tabel, wykresów i map

Tabele

Tabela 1. Skala Lipska

Tabela 2. Rozkład wiekowy i płci myszy włączonych do projektu

Tabela 3. Stężenie pierwiastków w prążkowi u w mg/kg

Tabela 4. Stężenie pierwiastków w prążkowi u samic w mg/kg

Tabela 5. Stężenie pierwiastków w prążkowi u samców w mg/kg

Tabela 6. Stężenie pierwiastków w prążkowi txJ w mg/kg w zależności od płci

Tabela 7. Skład biochemiczny prążkowi

Tabela 8. Skład biochemiczny prążkowi u samic

Tabela 9. Skład biochemiczny prążkowi u samców

Tabela 10. Skład biochemiczny prążkowi txJ w zależności od płci

Tabela 11. Stężenie pierwiastków w wątrobie w mg/kg

Tabela 12. Stężenie pierwiastków w wątrobie u samic w mg/kg

Tabela 13. Stężenie pierwiastków w wątrobie u samców w mg/kg

Tabela 14. Stężenie pierwiastków w wątrobie txJ w zależności od płci w mg/kg

Tabela 15. Skład biochemiczny wątroby

Tabela 16. Skład biochemiczny wątroby u samic

Tabela 17. Skład biochemiczny wątroby u samców

Tabela 18. Skład biochemiczny wątroby txJ w zależności od płci

Tabela 19. Stężenie pierwiastków w sercu w mg/kg

Tabela 20. Stężenie pierwiastków w sercu samic w mg/kg

Tabela 21. Stężenie pierwiastków w sercu samców w mg/kg

Tabela 22. Stężenie pierwiastków w sercu txJ w zależności od płci w mg/kg

Tabela 23. Stężenie pierwiastków w dwunastnicy w mg/kg

Tabela 24. Stężenie pierwiastków w dwunastnicy u samic w mg/kg

Tabela 25. Stężenie pierwiastków w dwunastnicy u samców w mg/kg

Tabela 26. Stężenie pierwiastków w dwunastnicy txJ w zależności od płci w mg/kg

Tabela 27. Stężenie pierwiastków w oku w mg/kg

Tabela 28. Stężenie pierwiastków w oku u samic w mg/kg

Tabela 29. Stężenie pierwiastków w oku u samców w mg/kg

Tabela 30. Stężenie pierwiastków w oku txJ w zależności od płci w mg/kg

Tabela 31. Wyniki pomiarów biochemicznych w surowicy

Tabela 32. Wyniki pomiarów biochemicznych w surowicy samic

Tabela 33. Wyniki pomiarów biochemicznych w surowicy samców

Tabela 34. Wyniki pomiarów biochemicznych w surowicy txJ w zależności od płci

Wykresy

Wykres 1. Stężenie wapnia w prążkowie

Wykres 2. Stężenie chromu w prążkowie

Wykres 3. Stężenie manganu w prążkowie

Wykres 4. Stężenie żelaza w prążkowie

Wykres 5. Stężenie niklu w prążkowie

Wykres 6. Stężenie miedzi w prążkowie

Wykres 7. Stężenie cynku w prążkowie

Wykres 8. Stężenie wapnia w wątrobie

Wykres 9. Stężenie chromu w wątrobie

Wykres 10. Stężenie żelaza w wątrobie

Wykres 11. Stężenie miedzi w wątrobie

Wykres 12. Stężenie cynku w wątrobie

Wykres 13. Stężenie wapnia w sercu

Wykres 14. Stężenie chromu w sercu

Wykres 15. Stężenie żelaza w sercu

Wykres 16. Stężenie niklu w sercu

Wykres 17. Stężenie miedzi w sercu

Wykres 18. Stężenie cynku w sercu

Wykres 19. Stężenie wapnia w dwunastnicy

Wykres 20. Stężenie chromu w dwunastnicy

Wykres 21. Stężenie manganu w dwunastnicy

Wykres 22. Stężenie żelaza w dwunastnicy

Wykres 23. Stężenie niklu w dwunastnicy

Wykres 24. Stężenie miedzi w dwunastnicy

Wykres 25. Stężenie cynku w dwunastnicy

Wykres 26. Stężenie wapnia w oku

Wykres 27. Stężenie chromu w oku

Wykres 28. Stężenie manganu w oku

Wykres 29. Stężenie żelaza w oku

Wykres 30. Stężenie niklu w oku

Wykres 31. Stężenie miedzi w oku

Wykres 32. Stężenie cynku w oku

Mapy

Mapa 1. Rozkład przestrzenny miedzi w oun na przekroju czołowym

Mapa 2. Rozkład przestrzenny cynku w oun na przekroju czołowym

Mapa 3. Rozkład przestrzenny aberracji struktury drugorzędowej białek przedstawiony jako stosunek form β/α w oun na przekroju czołowym

Streszczenie

Wstęp

Choroba Wilsona (WD) jest rzadko występującą chorobą genetyczną, o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym, której wiodące objawy wynikają z nieprawidłowego metabolizmu miedzi. Głównymi narządami dotkniętymi zmianami chorobowymi są wątroba i mózg. *Jackson toxic milk mouse* (txJ) to szczep myszy, u których zaobserwowano mutację w genie *Atp7b*, homologicznym do ludzkiego genu *ATP7B*, którego mutacje są przyczyną WD u ludzi.

Cel

Badanie miało na celu opis zmian biochemicznych w wybranych strukturach (prążkowie, wątroba, serce, dwunastnica, oko) u myszy txJ. Ponadto przeanalizowano różnice przebiegu choroby w zależności od płci zwierząt.

Metody

TxJ i myszy kontrolne zostały uśmiercone w wieku 2, 4, 8 i 14 miesięcy. Do określenia stężenia pierwiastków w narządach użyto spektroskopii fluorescencji rentgenowskiej metodą całkowitego odbicia. Skład biochemiczny tkanek zmierzono za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera. Dodatkowo przeprowadzono hybrydowe multimodalne mikroobrazowanie mózgu. Zbadano stężenie ceruloplazminy, neurofilamentów, albuminy, bilirubiny, transaminaz i fosfatazy alkalicznej w surowicy.

Wyniki

Istotnie podwyższone stężenia Cu zaobserwowano w wątrobie, prążkowie, oku, sercu i dwunastnicy myszy txJ. Wysokiemu stężeniu miedzi towarzyszyły zmiany stężenia wapnia zwłaszcza w wątrobie i sercu, a w mniejszym stopniu także w pozostałych narządach. W prążkowie najstarszych myszy txJ zaobserwowano niższą zawartość lipidów i wyższy udział tłuszczów nasyconych w ogólnym składzie biochemicznym. Struktura drugorzędowa białek prążkowie była zaburzona u txJ. W wątrobie myszy txJ zaobserwowano wyższe stężenia tłuszczów nasyconych i utlenionych. W składzie biochemicznym wątroby txJ dominowały istotne zaburzenia wynikające z nieprawidłowego fałdowania białek hepatocytów wtórnie do zaburzenia w ich strukturze drugorzędowej. Stężenie neurofilamentów było wyższe w surowicy 4-miesięcznych txJ, współwystępowało z uchwytymi zmianami składu biochemicznego wątroby i wyprzedzało wystąpienie

zaburzeń składu pierwiastkowego i biochemicznego prądkowia. Rozmieszczenie Cu i Zn w mózgach txJ i myszy kontrolnych było dość równomierne, bez przewagi w żadnej strukturze anatomicznej, ale wyłącznie w prądkowiu i wzgórzu txJ zaobserwowano znaczące zmiany w strukturze drugorzędowej białek. Przebieg choroby zaobserwowany u samic txJ różnił się od tego obserwowanego u samców w zakresie wątrobowego stężenia miedzi, wapnia i cynku oraz stężenia miedzi i żelaza w prądkowiu. Zaobserwowano także niższe osoczowe stężenia ceruloplazminy u samic. Najwyraźniejsze różnice pomiędzy manifestacją choroby u samców i samic obserwowano w 4 miesiącu życia.

Wnioski

U myszy txJ z powodu mutacji w genie *Atp7b* dochodzi do zmiany składu pierwiastkowego i biochemicznego wątroby i mózgu. Wraz z rozwojem choroby zmianie ulega także skład pierwiastkowy serca, dwunastnicy i oka. Uszkodzenie wątroby związane z gromadzeniem miedzi współlistnieje z podwyższeniem stężenia neurofilamentów w surowicy. W przebiegu choroby txJ zaobserwowano liczne podobieństwa do obrazu klinicznego i wyników pacjentów chorych na WD. Występowanie najwyraźniejszych różnic pomiędzy płciami txJ w 4 miesiącu życia sugeruje ich możliwy związek z modyfikującym wpływem hormonów płciowych.

Streszczenie w języku angielskim

Biochemical characterization of the mouse model of Wilson's disease.

Introduction

Wilson's disease (WD) is a rare autosomal recessive genetic disorder characterized by impaired copper metabolism. The primary organs affected by the disease are the liver and the brain. The Jackson toxic milk mouse (txJ) is a mouse strain with a mutation in the *Atp7b* gene, homologous to the human *ATP7B* gene, mutations of which are responsible for WD.

Aim

The aim of the study was to describe the biochemical changes in selected structures (striatum, liver, heart, duodenum, eye) in txJ mice. Additionally, the study analyzed sex-related differences in the course of the disease in mice.

Methods

TxJ and control mice were sacrificed at 2, 4, 8, and 14 months of age. Total reflection X-ray fluorescence spectroscopy was used to determine elemental concentrations in organs. The biochemical composition of tissues was measured using Fourier-transform infrared spectroscopy. Additionally, hybrid multimodal microimaging of the brain was performed. Serum concentration of ceruloplasmin, neurofilaments, albumin, bilirubin, transaminases, and alkaline phosphatase were also assessed.

Results

Significantly elevated copper concentration was observed in the liver, striatum, eye, heart, and duodenum of txJ mice. Copper concentration disturbances were accompanied by changes in calcium content, especially in the liver and heart, and to a lesser extent in other organs. In the striatum of the oldest txJ mice, a lower lipid content and a higher proportion of saturated fats in the overall biochemical composition were observed. The secondary structure of striatal proteins was disrupted in txJ mice. In the liver, higher levels of saturated and oxidized fats were found. The biochemical composition of the txJ liver was dominated by significant disturbances resulting from improper folding of hepatocyte proteins due to secondary structure abnormalities. Neurofilament levels were elevated in the serum of 4-month-old txJ mice and

coincided with detectable biochemical changes in the liver, preceding the onset of elemental and biochemical disturbances in the striatum. The distribution of Cu and Zn in the brains of both groups was relatively uniform, with no dominance in any anatomical structure, but significant changes in the secondary structure of proteins were observed only in the striatum and thalamus of txJ mice. The disease course in female txJ mice differed primarily in hepatic concentrations of copper, calcium, and zinc, as well as copper and iron levels in the striatum. Lower plasma ceruloplasmin levels were also observed in females. The most pronounced sex-related differences in disease manifestation were observed at 4 months of age.

Conclusions

In txJ mice, the *Atp7b* gene mutation leads to changes in the elemental and biochemical composition of the liver and brain. As the disease progresses, the elemental composition of the heart, duodenum, and eye also changes. Liver damage associated with copper accumulation coincided with elevated serum neurofilament concentration. The course of the disease in txJ mice shows many similarities to the clinical picture and findings in human WD patients. The most pronounced sex-related differences at 4 months of age of txJ suggest a possible modifying influence of sex hormones.

Wstęp

Miedź jest mikroelementem skąpo reprezentowanym w skorupie ziemskiej, w ilości zaledwie 50 części na milion (ppm) [1]. Metal ten z powodu łatwości oddawania elektronu, przy zmianie stopnia utlenienia, jest szeroko wykorzystywany jako kofaktor wielu istotnych enzymów biorących udział w procesach fotosyntezy i oddychania komórkowego przez organizmy żywe. Całkowita ilość miedzi w organizmie dorosłego człowieka waha się między 100 mg a 150 mg. Dzielne zapotrzebowanie na ten pierwiastek to 1,3 mg dla kobiet i 1,6 mg dla mężczyzn [2, 3]. Miedź dostarczona wraz z pokarmem jest wchłaniana przez enterocyty głównie w dwunastnicy i proksymalnym odcinku jelita czczego. Wraz z krwią wrotną trafia do wątroby, gdzie w zależności od zapotrzebowania organizmu kierowana jest do różnych narządów lub – w przypadku jej nadmiaru – jest sekwestrowana przez aparat Golgiego hepatocytu i wydalana wraz z żółcią do światła dwunastnicy. Opisano dwa najczęstsze genetycznie uwarunkowane defekty metabolizmu miedzi, które prowadzą do dwóch skrajnych, letalnych chorób: choroby Menkesa, związanej z upośledzeniem jelitowego wchłaniania miedzi, skutkującego jej niedoborem, oraz choroby Wilsona (*Wilson's disease* – WD), powiązanej z defektem wydalania miedzi i w efekcie przeładowaniem organizmu miedzią. Pierwszy opis WD, czyli zwyrodnienia wątrobowego-soczewkowego, został opublikowany w 1912 r. przez Samuela Aleksandra Kinniera Wilsona w czasopiśmie „Brain”. Było to szczegółowe studium 12 przypadków choroby zatytułowane „Postępujące zwyrodnienie soczewkowate: rodzinna choroba nerwowa związana z marskością wątroby” [4]. Najprawdopodobniej nie jest to jednak pierwsza wzmianka o tym schorzeniu. Na podstawie analizy pojedynczych opisów historycznych z XVII i XIX w. przedstawionych przez Morgagniego i Freicha, opisujących pacjentów prezentujących objawy uszkodzenia wątroby i zaburzenia neurologiczne, należy uznać, że były to pierwsze opisy pacjentów chorych na WD. W swojej pracy Wilson przedstawił 4 własne opisy leczonych przez niego pacjentów, 6 pojedynczych opisów opublikowanych wcześniej przez innych lekarzy i dwie nieopublikowane wcześniej obserwacje. Doktor Wilson opisał współwystępowanie uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (oun) z marskością wątroby. Dominować w opinii autora miał przebieg hepatologicznie bezobjawowy, a marskość ujawniać miała się dopiero w badaniu autopsyjnym. Należy odnotować jednak fakt, że dwoje spośród jego pacjentów przed wystąpieniem objawów neurologicznych rozwinęło przejściową żółtaczkę, a jeden chory zmarł w przebiegu krwawienia z żyłaków przełyku, będących następstwem zaawansowanej i zdekompenzowanej choroby wątroby. Jeden z leczonych przez dr Wilsona

pacjentów w okresie poprzedzającym wystąpienie uszkodzenia neurologicznego rozwinął ostry zespół psychiatryczny. Wilson opisywał chorobę jako występującą rodzinnie, a jej przyczynę upatrywał w bliżej niezidentyfikowanej toksynie. Rozprawa Wilsona z całą pewnością stworzyła fundament dla pracy pokoleń naukowców starających się wyjaśnić dostrzeżony przez niego fenomen. Na cześć lekarza chorobę nazwano jego imieniem. Dość szybko za sprawą badań Halla z 1921 r. dotyczących spodziewanego modelu dziedziczenia zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego uznano, że dziedziczenie choroby jest zgodne z zasadami Mendlowskimi w modelu autosomalnym recesywnym [5].

WD jest przewlekłą i postępującą chorobą uwarunkowaną genetycznie, w której na skutek nieprawidłowej funkcji białka ATP7B dochodzi do gromadzenia się miedzi w wątrobie i innych narządach. Szczegółowy opis budowy i funkcji białka ATP7B jako ATP-azy typu P pojawił się w literaturze w 1993 r. za sprawą trzech jednocześnie opublikowanych, niezależnych opisów [6-8]. Gen *ATP7B* kodujący to białko zlokalizowany jest na ramieniu długim 13 chromosomu ludzkiego w lokalizacji 13q14.3. Składa się on z 21 eksonów kodujących białko zbudowane z 1465 aminokwasów. Białko ATP7B zawiera w swojej budowie 4 podstawowe domeny: domenę wiążącą miedź (CXXC) – zdolną do związania 6 jonów miedzi; domenę ATP-azy (P) – zdolną do hydrolizy wiązań wysokoenergetycznych ATP i dostarczania energii dla transportu miedzi przez błony komórkowe, o budowie konserwatywnej, charakterystycznej dla wszystkich ATP-az typu P; domenę fosforylacji (A) – zdolną do tymczasowej fosforylacji białka zmieniającej jego strukturę oraz domenę defosforylacji (N) – odpowiedzialną za usunięcie grupy fosforanowej i powrót konformacji białka do stanu pierwotnego, co umożliwia dalszy aktywny transport jonów. Ponadto w budowie białka wyróżnia się 8 domen transbłonowych, kotwiczących je w błonie komórkowej oraz domenę regulatorową, kontrolującą pozycję i lokalizację białka w komórce, umożliwiając mu pełnienie funkcji adekwatnych do aktualnego zapotrzebowania komórki. Podstawową funkcją ATP7B jest transport jonów Cu^+ przez błony komórkowe. W przypadku hepatocytów ATP7B transportuje miedź do pęcherzyków cytoplazmatycznych, które biorą udział w wydalaniu nadmiaru wchłoniętej w jelitach miedzi do światła kanalików żółciowych. Ponadto ATP7B transportuje miedź do apo-ceruloplazminy, co pozwala na uwalnianie kompletnej cząsteczki białka holo-ceruloplazminy z wątroby do krwi.

Kliniczna manifestacja choroby Wilsona

Dominujące objawy choroby podzielono na 3 kategorie: wątrobowe, neurologiczne i psychiatryczne. Wraz z rosnącym doświadczeniem w leczeniu choroby Wilsona zidentyfikowano nowe objawy, wynikające z zajęcia innych narządów, tj. objawy. nerkowe, sercowe, hematologiczne, okulistyczne i stawowe.

Manifestacje wątrobowe

W obrazie klinicznym WD najczęstszą manifestacją, dominującą u około 50–60% pacjentów, jest różnego stopnia uszkodzenie wątroby. Jawna klinicznie dysfunkcja wątroby u części chorych wyprzedza wystąpienie objawów neurologicznych nawet o 10 lat. U pacjentów chorych na WD opisano szerokie spektrum objawów wątrobowych. Począwszy od niemej klinicznie, utrzymującej się przez lata podwyższonej aktywności enzymów wątrobowych, poprzez stłuszczenie, włóknienie, aż do piorunującej martwicy, przebiegającej z pełnoobjawową, zagrażającą życiu ostrą niewydolnością narządu, wymagającą przeszczepienia wątroby. Zwykle pierwsze objawy choroby występują pomiędzy 5. a 40. rokiem życia. Dostępne są jednak opisy zarówno przeszczepienia wątroby u 5-letniego dziecka z powodu ostrej niewydolności wątroby, jak i rozpoznanie WD u chorej w 72. roku życia [9, 10]. Jak dotąd nie odkryto jednoznacznej korelacji genotypu z fenotypem u chorych na WD pozwalającej przewidzieć kierunek rozwoju choroby u poszczególnych pacjentów. Najbardziej prawdopodobną hipotezą dotyczącą podłoża uszkodzenia wątroby wydaje się uszkodzenie struktur komórkowych wynikające z aktywności oksydoredukcyjnej miedzi. W pierwszej kolejności obserwuje się zmiany w obrębie mitochondriów – organelli komórkowych najbardziej podatnych na stres oksydacyjny. Stres oksydacyjny doprowadza do istotnych zmian w metabolizmie cholesterolu i lipidów. Koreluje to w sposób wyraźny z początkowymi zmianami obserwowanymi w mikroskopii świetlnej w postaci odkładania się kropeł tłuszczu w obrębie hepatocytów. Obraz stłuszczenia wątroby obecny jest w około 15% biopatów wątroby pobranych od chorych na WD [11]. W populacji pediatrycznej częstość występowania stłuszczenia w biopsji wątroby sięga 50%, a według niektórych opracowań nawet 80% [12]. Niewyjaśnionego pochodzenia stłuszczenie wątroby, u młodych osób, bez współwystępowania innych cech zespołu metabolicznego bywa ukrytą, wczesną manifestacją choroby Wilsona i zawsze wymaga szczegółowego różnicowania z tą jednostką chorobową. Do 10% pacjentów chorujących na WD nie ma opisywanych nieprawidłowości w badaniu histopatologicznym biopatu wątroby lub są one minimalne [11]. Zapalenie i włóknienie indukowane zależnym od

miedzi uszkodzeniem hepatocytu wydają się postępować równolegle z indukcją apoptozy na drodze aktywacji kaskady zależnej od kaspazy, uwolnienia kompleksu cytochromu c i w konsekwencji nacieku komórek zapalnych. Postępujące włóknienie wynika przede wszystkim z zaburzenia równowagi pomiędzy odkładaniem macierzy pozakomórkowej a jej degradacją, zależną od funkcji komórek gwiazdzistych (Ito) zlokalizowanych w przestrzeniach okołozatokowych Dissego. Pod wpływem uwalnianych z uszkodzonych hepatocytów ciałek apoptotycznych, transformującego czynnika wzrostu β oraz mediatorów zapalnych komórki Ito przechodzą transformację w miofibroblasty, zdolne do odkładania znacznych ilości kolagenu. Wydaje się, że aktywacja komórek Ito i następne włóknienie są naturalną odpowiedzią obronną mającą ograniczyć progresję uszkodzenia wątroby. Jest to mechanizm nieswoisty, obserwowany również w uszkodzeniu wątroby przez wirusy, alkohol i inne czynniki. W przypadku nieleczonej WD wraz z nasileniem zaburzeń gospodarki miedzią dochodzi do niebilansowanej przetrwałej aktywacji komórek gwiazdzistych, co ostatecznie doprowadza, na drodze dalszego odkładania kolagenu, do całkowitej przebudowy marskiej ze wszystkimi jej konsekwencjami. Wynikający z nadmiaru istoty pozakomórkowej wzrost oporu naczyń zatokowych wątroby doprowadza do rozwoju nadciśnienia wrotnego (>13 mmHg), z wtórnym poszerzeniem naczyń żylnych łożyska trzewnego. Krew płynąca w kierunku układu żyły głównej dolnej napotyka opór w miększu wątroby i zaczyna płynąć naczyniami o mniejszym oporze. Poszerza się przez to światło naczyń obocznych z nasileniem przepływu przez żyły żołądkowe krótkie i żyłę żołądkową lewą, łączące układ wrotny z układem żyły nieparzystej. Krew przepływająca tą drogą przez sploty podśluzówkowe przełyku powoduje ich znaczne poszerzenie, doprowadzając do powstania żylaków przełyku, zagrażających wystąpieniem groźnych dla życia krwawień do światła przewodu pokarmowego. W 10 letniej obserwacji 35% chorych na WD rozwinęło powikłania nadciśnienia wrotnego, w tym 30% – splenomegalię, 15% – wodobrzusze, 13% – encefalopatię wątrobową, a 10% – żylaki przełyku. 2% spośród obserwowanych pacjentów przeżyło epizod ostrego krwotoku żylakowego [13]. Drugim co do częstości połączeniem wrotno-systemowym otwierającym się w przypadku istotnego nadciśnienia są sploty żyłne odbytnicy, odbierające krew z układu żyły kręzkowej dolnej. Wobec nadmiernego napływu sploty te poszerzają się i w efekcie dochodzi do powstania żylaków odbytnicy. Rzadko obserwowanym obecnie objawem schyłkowej choroby wątroby i zaawansowanego nadciśnienia wrotnego jest poszerzenie żył okołopępkowych i śródbrzuszych, tworzące na skórze wokół pępka obraz głowy meduzy. Wzrost liczby połączeń żylnych omijających krążenie wrotne zmniejsza ciśnienie w układzie żyły wrotnej, sprzyja jednak upośledzeniu detoksyfikacji krwi, prowadzącej wszelkie metabolity mikrobioty

jelitowej i toksyczne produkty przemian azotowych z jelit. W szczególności amoniak, neutralizowany w prawidłowych warunkach w cyklu mocznikowym zachodzącym w wątrobie, po dostaniu się do krążenia systemowego wywiera toksyczny wpływ na funkcję układu nerwowego, doprowadzając do encefalopatii wątrobowej (HE) dotykającej w skali roku od 2% do nawet 40% chorych z marskością wątroby [14]. Trudnością u pacjentów chorych na WD często bywa odróżnienie wczesnych objawów HE od manifestacji neurologicznych spowodowanych gromadzeniem miedzi w strukturach oun. Poza tym, rozpoznając HE, zawsze należy mieć na uwadze możliwość współistnienia objawów neuropsychiatrycznych czy wtórnych do np. stosunkowo często obserwowanej hiponatremii [15, 16]. Zastój krwi w żylnych naczyniach trzewnych powoduje wspomnianą wcześniej splenomegalię, a wraz z nią zwiększenie powierzchni układu siateczkowo-śródbłonkowego, który sprzyja nadmiernemu niszczeniu elementów morfotycznych krwi. Taki hipersplenizm nierzadko doprowadza do pancytopenii. WD jest przyczyną 6–12% hospitalizacji z powodu ostrej niewydolności wątroby pacjentów <40 r.ż. W populacji pacjentów pediatrycznych odsetek ten jest niższy i wynosi ~3% [17]. Szczególnym przypadkiem wartym wspomnienia jest występujące stosunkowo rzadko piorunujące zapalenie wątroby z martwicą miększu i ostrą niewydolnością narządu. Piorunujący postęp choroby zaobserwowano częściej u kobiet [18].

Manifestacje neurologiczne

Wilson w swoim artykule wskazał jako główną zmianę chorobową uszkodzenie („rozmiękczenie”) w obrębie jądra soczewkowatego prowadzące do powstawania jam. Najwyraźniejszy obraz degeneracji dotyczył skorupy, przy czym gałka biała i jądro ogoniaste zazwyczaj były również zajęte, ale nie w takim stopniu jak skorupa [4]. W trzech przypadkach, z dwunastu opisanych przez Wilsona, oun w ogóle nie był zajęty. Wilsonowi neurologia zawdzięcza pierwszy opis budowy i funkcji układu pozapiramidowego. Już w 1914 r., zgodnie z Bostroem, triada obejmująca młodzieńczą wielopłatową marskość wątroby, zaburzenia chodu oraz zmiany martwicze w układzie pozapiramidowym była uznawana za podstawę odrębnego schorzenia, nazwanego zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (*hepatolenticular degeneration*) [19]. W 1920 r. Spielmeyer wykazał jednoznaczne związki między obiema chorobami i jako pierwszy połączył je jako WD. Objawy neurologiczne choroby Wilsona są zróżnicowane. Najczęściej występuje dyzartria, której stopień nasilenia jest zależny od stopnia i czasu trwania choroby. U większości pacjentów obserwuje się różne rodzaje drżenia, w tym spoczynkowe, zamiarowe oraz pozycyjne, a także charakterystyczne drżenie kończyn górnych pod postacią „bicia skrzydłami” [20]. Około 40% pacjentów z objawami neurologicznymi

doświadcza dystonii, która może być ogniskowa, wieloogniskowa, segmentowa lub uogólniona. W zaawansowanej dystonii często dochodzi do tworzenia się przykurczy. U około 25% pacjentów występują objawy mózdkowe oraz różne ruchy mimowolne [21]. Pozostałe objawy neurologiczne u chorych na WD mają miejsce zdecydowanie rzadziej, zalicza się do nich zespoły bólowe głowy, neuropatie, dysfunkcje układu wegetatywnego i padaczki o różnym stopniu nasilenia. U niemal wszystkich pacjentów prezentujących objawy neurologiczne zauważalne są współistniejące zaburzenia poznawcze, behawioralne czy nawet psychotyczne [22]. W związku z tym nierzadko można spotkać w literaturze opisy informujące o manifestacji neuropsychiatrycznej.

U zdecydowanej większości pacjentów manifestujących postać z dominacją objawów neurologicznych zwykle można wykazać kliniczne i biochemiczne cechy uszkodzenia wątroby. Ułatwia to postawienie rozpoznania choroby Wilsona u chorych leczonych bez efektu z powodu zespołu parkinsonowskiego ze współistniejącym uszkodzeniem wątroby.

Manifestacje psychiatryczne

U ~10% pacjentów (do nawet 25% według niektórych opracowań) zaburzenia psychiatryczne są pierwszymi objawami, które mogą być dominującą manifestacją choroby przez wiele lat. Najczęściej pojawiają się zaburzenia osobowości (45%), depresja (27%) i hiperseksualność (14%) [22]. W opisach przypadków, z racji kazuistycznej natury takich prac, dominują opisy spektakularnych objawów psychotycznych i ciężkich epizodów depresyjnych jako pierwszych objawów psychiatrycznych choroby. Wśród zaburzeń psychicznych u osób z wcześniej rozpoznawaną WD wymienia się przede wszystkim depresję, zmiany osobowości, niedostosowanie zachowań, zaburzenia poznawcze, nadmierną drażliwość oraz psychozy. Wiele badań wskazuje również na zależność między nasileniem objawów psychiatrycznych a pogorszeniem stanu neurologicznego [22]. Warto jednak dodać, że czysto psychiatryczna manifestacja, bez innych towarzyszących objawów, jest spotykana bardzo rzadko, przede wszystkim u młodych dorosłych na wczesnych etapach choroby.

Manifestacje nefrologiczne

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wysunięto tezę, że uszkodzenie komórek nabłonkowych kanalıka bliższego nefronu spotkane u chorych na WD spowodowane jest najprawdopodobniej toksycznym wpływem kompleksów metalotioneina-Cu, uwolnionych w dużych ilościach w przebiegu nasilonego uszkodzenia hepatocytów w zaawansowanych stadiach choroby [23]. Pacjenci mogą wtedy prezentować objawy zespołu Fanconiego, takie

jak ogólne osłabienie, wielomocz, ból i zniekształcenia kości, a niekiedy także patologiczne złamania [24]. Występuje także zmniejszenie napięcia mięśni, aż do wiotkich porażań przy dużym niedoborze potasu. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia tzw. wymiennej (*exchangable*) miedzi odpowiedzialny jest za uszkodzenie komórek nabłonka sześciennego cewki bliższej i włóknienia nerki wywołanego aktywacją oksydazy lizylowej, sprzyjającej tworzeniu się krzyżowych wiązań między kolagenem i elastyną [24]. Wtórnie do upośledzenia procesu resorpcji zwrotnej dochodzi do niespecyficznej aminoacydurii, białkomoczu drobnocząsteczkowego czy glukozurii. Zaburzenie resorpcji wodorowęglanów skutkuje rozwojem kwasicy cewkowej typu II i podwyższeniem pH moczu chorych na WD w kierunku zasadowym (do wartości 6,6–8). W materiale biopsyjnym nerek pacjentów chorych na WD udokumentowano zaburzenia ultrastruktury mitochondriów oraz obecność licznych ciałek o dużej gęstości elektronowej w subapikalnych obszarach cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalika bliższego, sugerujące obecność metaloprotein [23]. Większość autorów podkreśla korzystny wpływ leczenia chelatującego, pozwalający zwykle w ciągu kilku miesięcy istotnie ograniczyć aminoacydurię, białkomocz i znormalizować stężenie kwasu moczowego [23]. Opisano również w literaturze zależne od miedzi uszkodzenie komórek kanalika dystalnego, będące przyczyną rozwoju kwasicy cewkowej typu I na drodze niewydolności sekrecyjnej jonów H^+ [24]. Obie tubulopatie wspólnie przyczyniają się do rozwoju u chorych na WD zespołu utraty potasu, będącego niekiedy przyczyną zagrażającej życiu ciężkiej hipokaliemii. W tym przypadku również opisywano w literaturze stopniową poprawę po włączeniu leczenia chelatującego. Kwasice nerkowe obu typów przyczyniają się do nasilenia procesów demineralizacji kości. Jest to spowodowane wzmożoną utratą z moczem wapnia i fosforanów, które precypitując w świetle kanalików nerkowych sprzyjają rozwojowi kamicy nerkowej. Kwasica metaboliczna sprzyja również nasileniu reabsorpcji cytrynianów, które są naturalnymi inhibitorami precypitacji w obrębie kanalików nefronu. Problem z niedostatecznym zakwaszaniem moczu predysponuje do utrzymywania się podwyższonego pH, co dodatkowo nasila precypitację fosforanu wapnia. W kontekście występowania kamicy nerkowej nie ma w dotychczasowej literaturze przekonujących dowodów informujących o normalizacji calciurii i zmniejszeniu precypitacji pod wpływem leczenia chelatującego [24]. Ważnym zagadnieniem dotyczącym chorych w zaawansowanym stadium choroby jest zespół wątrobowo-nerkowy. Spadek diurezy, do anurii włącznie, spowodowany wazodylatacją trzewną wraz z postępującym uszkodzeniem miąższu nerki jest czynnikiem zdecydowanie pogarszającym rokowanie wszystkich pacjentów z marskością wątroby [25]. Kłębuszki naczyniowe zazwyczaj nie są zajęte w przebiegu WD. Należy jednak wspomnieć o działaniach niepożądanych leczenia D-

penicylamina. Od lat 60. XX w. wiadomo, że nawet do 20% pacjentów w pierwszym roku leczenia może rozwinąć białkomocz, doprowadzający u 30% spośród nich do rozwoju zespołu nerczycowego. Nadmierna urata białka wraz z moczem przyczynia się do powstania obrzęków i ostrego uszkodzenia nerek. U podłoża leży nefropatia błoniasta spowodowana odkładaniem się kompleksów immunologicznych w błonie podstawnej kłębuszków nerkowych. Rola penicylaminy w tym procesie pozostaje jednak niejasna. Częsteczka leku jest zbyt mała, a jej charakter nie jest immunogeny, co potwierdziły odpowiednie badania, w których udowodniono, że penicylamina nie była składową odkładających się kompleksów immunologicznych [23]. Obecnie najbardziej prawdopodobna jest hipoteza, w myśl której penicylamina jest haptenem wywołującym odpowiedź immunologiczną przeciwko innym antygenom [26]. Objawy zespołu nerczycowego wycofują się powoli, nawet do 2 lat po odstawieniu leku. Opisywane są również przypadki gwałtownie postępującego zapalenia nerek po ponownym włączeniu leczenia penicylamina [23].

Manifestacje kardiologiczne

Wśród objawów kardiologicznych opisywano zwiększoną częstość występowania migotania przedsionków i niewydolności serca w populacji pacjentów chorujących na WD [27]. Zwraca się uwagę na opisywaną predyspozycję do wcześniejszego rozwoju miażdżycy tętnic i zaburzeń przemian węglowodanów. Zmiany w zapisie elektrokardiograficznym dotyczą przede wszystkim poszerzenia zespołu QRS i tachykardii zatokowej oraz bradykardii zatokowej [28]. Opisywano również przypadki uszkodzenia odpowiedzi autonomicznej serca będącej przyczyną ortostatycznych spadków ciśnienia oraz spowolnienia reakcji na próbę Valsalvy. Dysautonomia występowała istotnie częściej w populacji chorych z manifestacją neurologiczną [29]. Opisywano jednak pojedyncze przypadki ciężkiej zastoinowej niewydolności serca odpornej na farmakoterapię i wystąpienie groźnych dla życia epizodów migotania komór, również u pacjenta 1 rok po przeszczepieniu wątroby [30].

Manifestacje okulistyczne

Historycznie ciekawy jest fakt publikacji opisu jednego z kluczowych objawów choroby wyprzedzający o około 10 lat pierwotną publikację Wilsona. Charakterystyczny brązowo-złoty pierścień występujący dookoła rąbka tęczówki na linii Schwalbego opisany został przez niemieckich okulistów Kaysera i Fleischera już w 1902 roku [31]. Powstanie pierścienia jest efektem odkładania się miedzi dość równomiernie w obrębie całej rogówki. Jednak wytrącanie

się barwnika w błonie Descemeta spowodowane jest powstawaniem kompleksów miedziowo-siarkowych. Pierścień występuje u niemal 90% pacjentów z manifestacją neurologiczną, 65% pacjentów z manifestacją wątrobową i jedynie u około 20% pacjentów w stadium przedobjawowym [32]. Pomimo skrupulatnej analizy objawów u swoich pacjentów opis pierścienia nie pojawił się w pierwotnym studium Wilsona. Przez kolejne 10 lat po jego publikacji, do 1922 r., autor negował występowanie pierścienia u pacjentów chorujących na opisywaną przez niego chorobę. Jednak pojawiające się liczne doniesienia nie pozostawiały wątpliwości odnośnie do bezpośredniego związku z WD. Przez dziesięciolecia pierścień uznawany był za objaw patognomoniczny dla WD. Choć od lat 70. XX wieku wiadomo, że tzw. pseudopierścień Keisera i Fleischera występuje również w przewlekłych chorobach cholestatycznych wątroby, zwłaszcza u pacjentów ze stężeniem bilirubiny powyżej 5 mg/dL, nadal obecność pierścienia jest jednym z podstawowych kryteriów diagnostycznych choroby Wilsona, uwzględnionym w skali Lipskiej (tabela 1). Powstawanie pierścienia przebiega w sposób niejednorodny i jest zależne między innymi od stopnia nasilenia i czasu trwania zaburzeń gospodarki miedziowej. Początkowo formuje się on jedynie na godzinie 12 rogówki ocenianej jako tarcza zegara. Następnie zajmuje dolne partie linii Schwalbego, by ostatecznie zamknąć okrąg, dopełniając go obustronnie w okolicach godzin 3 i 9. To zjawisko tłumaczone jest jako następstwo kierunków przepływu cieczy wodnistej w przedniej komorze oka [33]. W większości przypadków występowanie pierścienia obserwuje się obustronnie, chociaż zdecydowanie rzadziej, ale odnotowano w literaturze przypadki jednostronnego zajęcia rogówki [32]. U większości pacjentów po około 4–5 latach skutecznego leczenia może on zanikać, w kolejności odwrotnej do procesu formowania, stanowiąc dowód skuteczności farmakoterapii. Nawrót pierścienia Kaysera–Fleischera zwykle sugeruje nieprzestrzeganie zaleceń dotyczących leczenia. Z tego powodu rekomendowane są regularne kontrole okulistyczne u chorych na WD. Rozpoznanie pierścienia wymaga przede wszystkim umiejętnego badania przeprowadzonego przez doświadczonego lekarza z użyciem lampy szczelinowej. Jednakże najnowsze analizy sugerują czułość badania w lampie szczelinowej na poziomie poniżej 50% [33]. Gonioskopia z wykorzystaniem trójlustra Goldmanna ułatwia wizualizację błony Descemeta i w połączeniu z badaniem w lampie szczelinowej poprawia czułość tej metody diagnostycznej [34]. Coraz więcej publikacji poświęconych jest diagnostyce pierścienia z użyciem optycznej koherentnej tomografii (AS-OCT), pozwalającej na dokładniejszą ocenę przedniego odcinka oka [35]. Jej dodatkowymi zaletami jest możliwość wykonania badania przez osoby z mniejszym doświadczeniem, ponieważ metodę charakteryzuje znacznie bardziej stroma krzywa uczenia. Ponadto badanie jest łatwiejsze do

wykonania u pacjentów trudno współpracujących, chociażby z powodu typowych dla postaci neurologicznej WD drżeń czy ruchów mimowolnych. AS-OCT wymaga jedynie kilku sekund stabilnej pozycji – w przeciwieństwie do badania w lampie szczelinowej, gdzie chory musi ściśle współpracować i pozostać w bezruchu przez minimum kilka minut [35, 36].

Zajęcie soczewki oka to kolejny objaw nadmiaru miedzi w WD. Częstość występowania zaćmy słonecznikowej wśród pacjentów jest zróżnicowana i w zależności od źródła osiąga wartości od 2% do 20%. Objaw ten po raz pierwszy opisali Siemerling i Oloff w 1922 r. jako „zmętnienia przypominające układem promienie słońca” [32]. Autorzy pracy już wtedy opisywali wyraźne podobieństwa między zaćmą obserwowaną u pacjentów z WD a tą wywołaną przez wewnątrzgałkowe ciało obce zawierające miedź. Zaćma słonecznikowa wykrywana jest u nieco ponad 1% nowo rozpoznanych, nieleczonych wcześniej pacjentów. Polega ona na odkładaniu się złogów miedzi w torebce soczewki, ale nie w jej korze czy jądrze. Złogi przyjmują postać centralnego dysku z odchodzącymi szprychowymi promieniami, przypominającymi płatki kwiatu. Badania złogów wykazały ich największe gromadzenie w wewnętrznej 1/3 przedniej powierzchni torebki soczewki [32]. W skład złogów wchodzi głównie miedź i siarka. Siarka jest ważnym składnikiem białek wiążących miedź, takich jak metalotioneiny, co wyjaśnia jej wtórnie wysokie stężenia w soczewce. Zaćma słonecznikowa zwykle nie wpływa na sprawność widzenia. Zaćma słonecznikowa nie jest dostrzegalna gołym okiem ani przy użyciu oftalmoskopu. W celu wykrycia zaćmy wymagana jest ocena z wykorzystaniem lampy szczelinowej. Podobnie jak pierścień zaćmy słonecznikowa zazwyczaj ulega regresji wtórnie do leczenia WD.

Manifestacje hematologiczne

Anemia hemolityczna z ujemnym testem Coombsa jest jednym z objawów WD dotyczącym w toku trwania choroby 10–15% pacjentów [37]. Żółtaczką hemolityczną może u niewielkiego odsetka pacjentów wyprzedzać wystąpienie objawów wątrobowych i neurologicznych. Okres przeżycia czerwonych krwinek u chorych na WD jest skrócony [32]. Najwięcej przypadków przełomu hemolitycznego opisywano w gwałtownie postępującej ostrej niewydolności wątroby na tle nasilonego stresu oksydacyjnego spowodowanego uwolnieniem dużych ilości miedzi podczas martwicy hepatocytów [38]. Wydaje się, że do hemolizy dochodzi także na drodze bezpośredniego miedziozależnego uszkodzenia błony komórkowej erytrocytu. Niedokrwistość hemolityczna jako objaw jest jednak na tyle istotna, że została ujęta jako jedno z kryteriów diagnostycznych skali Lipskiej (tabela 1) [39]. Sama choroba Wilsona nie dotyka bezpośrednio komórek macierzystych szpiku i nie wpływa negatywnie na proces hematopoezy.

Zmniejszone stężenie którejkolwiek z linii krwiotwórczych w przebiegu choroby Wilsona, oprócz wyżej wymienionej anemii hemolitycznej, obserwuje się jako efekt wtórny hipersplenizmu lub niepożądane działanie zastosowanych leków [26]. W przypadku stosowanego leczenia u części chorych może rozwinąć się zespół ostrego niedoboru miedzi, którego jedną ze składowych jest zaburzenie hematopoezy, objawiające się przede wszystkim w formie leukopenii współistniejącej niekiedy z trombocytopenią [20]. Wtórnie do dysfunkcji syntetycznej wątroby obserwuje się u chorych na WD globalne obniżenie krzepliwości krwi, związane z niedoborem czynników krzepnięcia (II, V, VII, IX, X, XI), odzwierciedlane przez wydłużenie czasu protrombinowego i wzrost wskaźnika INR.

Manifestacje kostno-stawowe

Dominującymi schorzeniami dotykającymi układ szkieletowy w przebiegu WD są osteopenia, osteoporoza i artropatie. Obniżony obrót kostny, będący następstwem zmniejszonej aktywności osteoblastów w przewlekłej chorobie wątroby, razem z nadmierną utratą wapnia i fosforanów na drodze nerkowej przyczyniają do wtórnych zaburzeń mineralizacji kośćca [40]. W populacji pacjentów chorujących na WD częściej niż w populacji ogólnej obserwuje się skoliozę [40]. Akumulacja miedzi i tworzenie się depozytów w obrębie struktur budujących stawy przyczyniają się do napływu komórek stanu zapalnego, zmian unaczynienia stawu i stopniowo postępującej destrukcji. Stawami najczęściej zajętymi w przebiegu WD są stawy kolanowe i nadgarstkowe. Zapalenie stawów jest opisywane również jako jedno z działań niepożądanych leczenia D-penicylaminą [41]. Nie opisywano jednak negatywnego wpływu na stawy w populacji leczonej solami cynku [40].

Diagnostyka

W diagnostyce choroby Wilsona wykorzystywanych jest kilka podstawowych, obecnie łatwo dostępnych badań. Najpowszechniej wykonywanym badaniem jest pomiar stężenia ceruloplazminy w surowicy krwi. Z powodu nieprawidłowej funkcji ATP7B u chorych na WD holo-ceruloplazmina jest uwalniana z wątroby w mniejszych ilościach, co przekłada się na jej obniżone stężenie we krwi. Oznaczenie stężenia miedzi w surowicy krwi również jest badaniem wykorzystywanym w procesie diagnostycznym. Podstawowe metody diagnostyczne pozwalają na ocenę całkowitego stężenia miedzi, które u chorych na WD jest obniżone. Kolejny test to ocena frakcji miedzi wymiennej (CuEXC) [42]. Oznaczenie polega na wykorzystaniu kompleksowania albuminy i aminokwasów obecnych w surowicy po 1 h inkubacji z kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA) i następczej ultrafiltracji przez błonę półprzepuszczalną

zatrzymującą m.in. albuminę, ceruloplazminę i transkupreninę. Głównymi zaletami tego testu są niepodatność na wahania związane ze stężeniem ceruloplazminy i możliwość dokładnej oceny przeciążenia organizmu miedzią. Stężenie miedzi wymiennej można przedstawić w postaci ilorazu frakcji wymiennej w stosunku do całkowitej miedzi w surowicy, czyli względnego stężenia miedzi wymiennej (*relative exchangeable copper*, REC). Parametr ten osiąga czułość i swoistość w wykrywaniu WD bliską 100% [43]. Czułą metodą do wykrywania choroby i monitorowania leczenia jest oznaczenie stężenia miedzi w dobowej zbiorce moczu, które u chorych na WD jest podwyższone. Przyczyną wyższego niż prawidłowe stężenia miedzi w moczu jest fakt przenikania miedzi niezwiązanej z ceruloplazminą przez filtr kłębuszkowy. U osób zdrowych miedź wbudowana do ceruloplazminy nie przenika do moczu.

Kolejne badanie diagnostyczne to test z miedzią radioaktywną. Polega ono na podaniu dożylnym izotopu miedzi Cu-64 lub Cu-67, który u osób zdrowych jest niemal całkowicie wbudowywany w wątrobie do ceruloplazminy i wspólnie z nią zostaje uwolniony do krwi obwodowej. U chorych na WD z powodu dysfunkcji ATP7B izotop miedzi trafia do wątroby, gdzie nie może zostać wykorzystany i jego stężenie we krwi obwodowej spada. Pomiarów radioaktywności próbek krwi dokonuje się po 2 h, 24 h i 48 h od momentu dożylnego podania izotopu. Niskie wartości promieniowania stwierdzone po 24 h i 48 h charakterystyczne są dla chorych na WD. Metoda charakteryzuje się wysoką czułością i swoistością. Ograniczenie jej wykorzystywania wynika z problemów z dostępnością, jest jednak ważnym, minimalnie inwazyjnym badaniem, wykonywanym w przypadku wątpliwości diagnostycznych [44]. Spośród badań radiologicznych najwięcej informacji w trakcie diagnostyki wstępnej wnosi obrazowanie mózgu metodą rezonansu magnetycznego (MRI). W przypadku uszkodzenia ośrodkowego mózgu wyniki MRI w WD mogą być bardzo zróżnicowane. W obrazach T2 zależnych wiele obszarów mózgu może wykazywać zmiany sygnału. Najczęściej obserwowaną nieprawidłowością jest nadmierna intensywność sygnału w obrębie jąder soczewkowatych. Dodatkowe obszary, w których często występują nieprawidłowości sygnału T2, obejmują jądra ogoniaste, gałki białe, boczne części wzgórza oraz głębokie jądra śródmózgowia.

W półkulach mózgowych u około 25% pacjentów można zaobserwować symetryczną, wieloogniskową leukoencefalopatię. Opisano również kilka objawów radiologicznych, z których żaden nie jest patognomoniczny dla WD: objaw głowy pandy wielkiej, wynikający z otaczającego jądro czerwienne i istotę czarną wysokiego sygnału T2 pochodzącego z nakrywki śródmózgowia, objaw głowy pandy małej, wynikający z zaangażowania nakrywki mostu. Niekiedy obserwuje się oba te objawy nakładające się na siebie. Objaw rozszczepionego wzgórza zauważalny jest wtedy, gdy między grupami jąder przyśrodkowych i bocznych

występuje wzmożona intensywność sygnału. Objaw wiru jako koncentryczny układ wzmożonego sygnału, wynikający z uszkodzenia jąder soczewkowatych. W obrazach T1 nieprawidłowości sygnału są zmienne i wydają się korelować ze stopniem zajęcia i dysfunkcją wątroby [20].

Jak wspomniano powyżej, ważne miejsce w diagnostyce mają badania okulistyczne. Konieczne są jednak czujność i odpowiednie doświadczenie diagnozującego okulisty, zważywszy na fakt, że pierścień Kaysera i Fleischera może nie występować nawet u 50% pacjentów prezentujących cechy uszkodzenia wątroby. W wątpliwych klinicznie przypadkach poddaje się analizie materiał pochodzący z biopsji gruboigłowej wątroby. Biopat pozyskany w ten sposób poddaje się badaniu spektrometrii masowej na zawartość miedzi w suchej tkance. Podwyższone stężenie miedzi przemawia za rozpoznaniem WD. W rutynowej diagnostyce wykonuje się szereg barwień histopatologicznych, przy czym najistotniejsze z perspektywy rozpoznania WD wydaje się barwienie z wykorzystaniem rodaniny. Pozwala ono na wybarwienie miedzi na kolor pomarańczowo-brunatny. Barwienia, np. hematoksyliną i eozyną (H-E) lub z wykorzystaniem trichromu Massona, pozwalają na ocenę stłuszczenia, nacieku komórek zapalnych zaawansowania włóknienia. Żadne barwienia nie są jednak specyficzne dla WD.

Podsumowując, rozpoznanie WD powinno być brane pod uwagę w przypadku różnicowania każdej choroby przebiegającej z uszkodzeniem wątroby do momentu uzyskania wyników pozwalających je wykluczyć.

Narzędziem diagnostycznym pozwalającym na skonsolidowanie wyników badań diagnostycznych i przełożenie na ocenę prawdopodobieństwa występowania WD jest skala Lipska. Została ona zaproponowana pierwotnie w 2001 r. na międzynarodowej konferencji dotyczącej WD i choroby Menkesa, opublikowana przez Petera Ferenciego i zespół ekspertów [39]. Badania wchodzące w skład skali Lipskiej zaprezentowano w tabeli 1.

Tabela 1. Skala Lipska

Cecha	Wynik	Punktacja
Pierścień Kaysera–Fleischera	obecny	2
	nieobecny	0
Objawy neurologiczne lub nieprawidłowości w MRI	ciężkie	2
	łagodne	1
	nieobecne	0
Stężenie ceruloplazminy w osoczu	<0,1 g/l	2
	0,1–0,2 g/l	1
	prawidłowe	0
Wydalenie miedzi w dobowej zbiórce moczu	>2× górnej granicy normy (ggn)	2
	1–2× ggn	1
	prawidłowe	0
	prawidłowe i wzrastające < 5× ggn po penicylaminie	2
Niedokrwistość hemolityczna (Coombs ujemna)	obecna	1
	nieobecna	0
Stężenie miedzi w wątrobie	>5× ggn (>4 μmol/g / >250 mg/kg)	2
	zwiększone (0,8–4 μmol/g / 50–250 mg/kg)	1
	prawidłowe	–1
	dodatnie barwienie z rodaniną	1
Obecność swoistej mutacji	na obu chromosomach	4
	na jednym chromosomie	1
	brak	0
Interpretacja (sumaryczny wynik)	diagnoza bardzo prawdopodobna	4
	diagnoza możliwa	3
	diagnoza mało prawdopodobna	≤ 2

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [45].

Leczenie

Pierwszym lekiem wprowadzonym do terapii choroby Wilsona była D-penicylamina. Jest to pochodna penicyliny posiadająca właściwości chelatujące. Tworzy ona trwałe, rozpuszczalne w wodzie związki kompleksowe z jonami metali ciężkich: miedzi, ołowiu, rtęci, kadmu, talu, cynku, niklu, złota i żelaza. Została zatwierdzona do użytku medycznego przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA) w 1970 r., choć opis jej pierwszego zastosowania przez Johna Walshe’a opublikowany został już w 1956 roku [46]. Jest dobrze wchłaniana z przewodu pokarmowego i osiąga we krwi stężenie maksymalne po upływie 2 godzin od podania doustnego. Działa poprzez tworzenie między grupami tiolowymi a miedzią stabilnych kompleksów, które są wydalone z moczem, redukując w ten sposób zawartość

miedzi w organizmie. Zmniejsza także ilość miedzi wchłanianej z przewodu pokarmowego. Jej metabolizm jest dwufazowy, a penetracja dobra niemal do wszystkich tkanek. Ograniczona penetracja dotyczy oun z powodu słabego przenikania bariery krew–mózg oraz tkanki kostnej i tłuszczowej. Penicylamina jest wydalana z kałem i z moczem. Działania niepożądane są stosunkowo częste, a prawdopodobieństwo ich wystąpienia jest największe w 1. roku leczenia. Penicylamina może powodować leukopenię, agranulocytozę i anemię aplastyczną. Istotne jest również ryzyko wystąpienia kłębuszkowego zapalenia nerek. Najczęstsze są jednak działania niepożądane manifestujące się na skórze i błonach śluzowych w formie wysypki, rumienia i zapalenia jamy ustnej. Występują one 25–50% pacjentów, spośród których około 10% zaprzestaje leczenia penicylamina [26]. Z przyczyn oczywistych nie ma wysokiej jakości danych dotyczących zastosowania penicylaminy w ciąży. W literaturze podkreśla się znaczenie dobrego wyrównania metabolicznego i jonowego WD przed planowanym zajściem w ciążę. Z uwagi na dane sugerujące duże niebezpieczeństwo rozwoju ostrej niewydolności wątroby po gwałtownym odstawieniu penicylaminy autorzy rekomendacji sugerują zmniejszenie dawki leku w 1. trymestrze i jeśli to możliwe, kontynuację leczenia przez cały okres ciąży [20].

Trientyna (trietylenotetramina) jest kolejnym chelatorem wykorzystywanym w leczeniu WD, zwłaszcza u chorych, którzy nie tolerują penicylaminy. Jest ona lekiem selektywnym dla jonów dwuwartościowych (wiąże się również z jonami żelaza i cynku). Oprócz zwiększania nerkowego wydalania miedzi ogranicza również o około 80% jej wchłanianie ze światła przewodu pokarmowego. Charakteryzuje się lepszym profilem bezpieczeństwa, a działania niepożądane wynikają przede wszystkim z rozwijającego się wtórnie niedoboru żelaza. U pacjentów obserwowano niedokrwistość mikrocytarną, syderoblastyczną i trombocytopenię. Dostępne dane sugerują względne bezpieczeństwo stosowania trientyny w ciąży, jednak brakuje szczegółowych danych na ten temat. Nie zaobserwowano niedoborów miedzi, żelaza czy cynku u dzieci urodzonych przez matki stosujące w ciąży trientynę. Podobnie jak powyżej wytyczne dopuszczają wykorzystanie tego leku w ciąży w sytuacji, w której korzyści wynikające z leczenia matki przewyższają potencjalne ryzyko dla płodu [17].

Najczęściej stosowanym lekiem w Polsce są sole cynku, których mechanizm działania opiera się na zwiększeniu syntezy metalotionein w enterocytach. Powinowactwo tych białek do jonów miedzi jest na tyle duże, że wiążą one zdecydowaną większość miedzi wchłanianej ze światła przewodu pokarmowego i zabezpieczają przed jej przenikaniem do krwi żyłnej. Wraz z naturalnym złuszczeniem komórek nabłonkowych jelita miedź związana przez metalotioneiny w enterocytach jest wydalana wraz z kałem. Indukcja syntezy metalotionein zachodzi z opóźnieniem trwającym około 3 tygodni od włączenia leku. Dzięki wytworzeniu

ujemnego bilansu miedziowego sole cynku sprzyjają stopniowej redukcji depozytów miedzi. Najczęściej zgłaszanym działaniem niepożądanym siarczanu cynku są objawy dyspeptyczne, które mogą wynikać z tworzenia się nadżerek i owrzodzeń w żołądku [12]. Rzadziej obserwuje się łagodne podwyższenie aktywności enzymów trzustkowych, zwykle bez klinicznych objawów zapalenia trzustki. Ze względu na rozwijający się czasem w następstwie długotrwałego leczenia niedobór miedzi niekiedy obserwuje się wtórną niedokrwistość czy neuropatię obwodową ruchowo-czuciową. W leczeniu solami cynku pacjentek w ciąży nie jest wymagana redukcja dawki w 1. trymestrze, jak jest to zalecane przypadku chelatorów. Jednak z uwagi na przenikanie do mleka kobiecego wszystkich 3 opisanych powyżej leków, obecnie uważa się, że dzieci matek chorych na WD nie powinny być karmione piersią, w celu uniknięcia zaburzeń gospodarki miedzi, żelaza czy cynku u noworodków i niemowląt [21].

Trwają badania nad terapią genową dla choroby Wilsona, która wydaje się obiecującą metodą leczenia. Produkt UX701 do zapewnienia stabilnej ekspresji ATP7B wykorzystuje wektor AAV9 z rodziny adenowirusów. W badaniach klinicznych 1. fazy wykazano długoterminową poprawę metabolizmu miedzi u *Jackson toxic milk mouse* [47].

Ważnym zaleceniem w postępowaniu z pacjentami chorymi na WD jest również stosowanie odpowiedniej diety z ograniczeniem produktów bogatych w miedź. Chorzy powinni unikać jedzenia wątróbki i innych podrobów oraz ograniczyć spożywanie czekolady, orzechów, owoców morza i grzybów. Ważne jest również stosowanie naczyń i przyborów kuchennych niezawierających miedzi, mogącej przenikać do gotowanego jedzenia.

Zwierzęce modele choroby Wilsona

Zainteresowanie badaczy chorobą Wilsona zaowocowało odkryciem wstępowania zaburzeń wydalenia miedzi u zwierząt. W toku dalszych badań udało się opisać podłoże tych zaburzeń i wyodrębnić poszczególne grupy zwierząt chorujących wskutek mutacji genów homologicznych do ludzkiego *ATP7B*.

Gryzonie

Modele szczurze

Long-Evans cinnamon (LEC)

LEC to szczep wsobny szczurów Long-Evans opisany w 1985 r. Pełne sekwencjonowanie szczurzego genu *Atp7b* wykonano i opisano w 1994 r. U LEC *Atp7b* charakteryzuje się częściową delecją, co najmniej 900 par zasad z regionu kodującego

zlokalizowanego na końcu 3' oraz co najmniej 400 par zasad z niepodlegającego translacji regionu dalszego. Szczury LEC oprócz mutacji w genie *Atp7b* posiadają również zmutowany gen N-acetylotransferazy serotoniny (*Nat*) zaangażowanej w proces powstawania melatoniny, której brak skutkuje występowaniem jasnej (cynamonowej) sierści. Naturalny przebieg choroby u szczurów LEC charakteryzuje się rozwojem ostrego zapalenia wątroby w wieku około 4 miesięcy, podostrą i ostrą martwicą hepatocytów, z co najmniej 30–40% śmiertelnością zwierząt. Nielezione szczury prezentują postępujące uszkodzenie wątroby, osiągając aktywność enzymów wątrobowych aminotransferazy asparaginianowej (AST) i aminotransferazy alaninowej (ALT) przekraczającą 500 U/L, a stężenie bilirubiny, będące wykładnikiem niewydolności narządu, osiąga wartości ponad 30 mg/dL. Szczury, które przeżyją okres zapalenia wątroby, rozwijają włóknienie wątroby i w wieku ~1 roku prezentują całkowitą przebudowę marską z pojawiającymi się ogniskami raka wątrobowokomórkowego i raka dróg żółciowych. [48] U szczurów LEC udokumentowano nieprawidłowe gromadzenie miedzi w wątrobie, z towarzyszącym niskim stężeniem miedzi w surowicy krwi obwodowej i niskim stężeniem ceruloplazminy. Stężenie miedzi w wątrobie osiąga ponad 1000 mg/kg suchej masy do 8. tygodnia życia [49]. Pierwotne zaburzenie metabolizmu miedzi współwystępuje z nagromadzeniem żelaza w wątrobie, które najpewniej przyczynia się do rozwoju i postępu uszkodzenia wątroby [50].

Patologia wątroby

W wieku 6 tygodni w badaniu mikroskopowym wątroby LEC wykazano zmiany w wielkości jąder komórkowych i obrzęk hepatocytów oraz zwiększoną liczbę figur mitotycznych. Apoptoza, zwiększona liczba komórek Browicza–Kupffera, nacieki leukocytów wielojądrzastych oraz komórki olbrzymie występowały rzadziej, ale opisywane były również we wczesnych stadiach aktywnej choroby, przed pojawieniem się żółtaczki. Przy nasilonej żółtaczce i wysokich stężeniach bilirubiny obserwowano ponadto zwyrodnienie pierzaste cytoplazmy hepatocytów i proliferację przewodników żółciowych związane z cholestazą oraz martwicę hepatocytów i erytrofagocytozę. Wykazano, że progresja choroby wątroby i gromadzenie się miedzi w wątrobie u szczurów LEC są związane z podwyższeniem stężenia mRNA genów kodujących białka związane z cytochromem P-450, stresem oksydacyjnym, uszkodzeniami kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) i apoptozą [51]. W zaawansowanych stadiach choroby opisano cholangiofibrozę, której nasilenie było skorelowane z wiekiem zwierząt [52]. Progresja uszkodzenia wątroby była związana z mechanizmami stresu oksydacyjnego, w tym ze wzrostem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD),

nieprawidłowo obniżonym stosunkiem form glutationu (GSH/GSSG) oraz wyraźnie podwyższonym stężeniem substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym, będącym markerem utlenienia lipidów [53]. Zmiany w obrębie mitochondriów wątroby są typową cechą patologii w przebiegu choroby u szczurów LEC, co upodabnia je do pacjentów z chorobą Wilsona. Sternlieb i współautorzy opisali w 1995 r. obrazy spod mikroskopu elektronowego pochodzące z próbek wątrób szczurów LEC, charakteryzujące się wyraźnym pleomorfizmem mitochondriów, zmianami w gęstości macierzy oraz nieprawidłową morfologią grzebieni mitochondrialnych, w tym ich wydłużeniem, poszerzeniem, układaniem się w stosy lub całkowitym zanikiem. Zmiany zaobserwowane w mitochondriach szczurów LEC wykazują podobieństwo z tymi występującymi u pacjentów chorych na WD [54]. Zmiana ultrastruktury mitochondrialnej jest jedną z pierwszych możliwych do zaobserwowania patologii pojawiających w związku z nieprawidłowym gromadzeniem miedzi. Późniejsze analizy proteomu potwierdziły zwiększony poziom ekspresji białek macierzy mitochondrialnej [55]. Mitochondria są pierwszym celem toksyczności miedzi, która prowadząc do powstawania wiązań krzyżowych, sprzyja rozrywaniu błon mitochondrialnych i ostatecznie doprowadza do obumierania hepatocytów. [56] Postęp destrukcji mięszu wątroby jest związany z poważnymi zmianami w metabolizmie lipidów. Levy i współautorzy w 2007 r. wykazali, że 12-tygodniowe szczury LEC miały podwyższone stężenie trójglicerydów, wolnego cholesterolu i jego estrów [57]. Podwyższona zawartość lipidów w wątrobie była według autorów najprawdopodobniej spowodowana zmniejszeniem wydalania tłuszczów z wątroby. Szczury LEC były również badane jako model raka wątrobowokomórkowego. Proces hepatokarcynogenezy u LEC wynika najprawdopodobniej z zaburzeń apoptozy, gromadzenia się uszkodzeń nici DNA spowodowanych pęknięciem oraz wysokim poziomem proliferacji komórek [58]. Stężenia transkryptów metylotransferaz DNA, enzymów typowo związanych z rakiem wątroby, były podwyższone w tkankach pochodzących z guzkowo przebudowanej wątroby szczurów LEC [57].

Patologia mózgu

Patologia mózgu i objawy neurologiczne u szczurów LEC były badane mniej intensywnie niż patologia wątroby. Miedź gromadzi się we wszystkich obszarach mózgu szczurów LEC, osiągając szczyt około 24. tygodnia życia i znacząco przewyższając wartości obserwowane u osobników kontrolnych. W tym samym okresie zaobserwowano pojawiające się pęknięcia nici DNA w jądrach komórkowych neuronów i komórek glejowych [59]. Wykazano istotne zaburzenia stężenia mRNA genów związanych z rozwojem neuronów,

stresem oksydacyjnym, apoptozą i stanem zapalnym. W szczególności wykazano zmiany w ekspresji czynnika zespołu dehydrogenazy bursztynianowej 2 (*Sdhaf2*) oraz podjednostki B7 oksydoreduktazy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (*Ndufb7*), które są kluczowe w szlaku oksydacyjnej fosforylacji mitochondrialnej [60]. Istotny wzrost aktywności dysmutazy manganowej w istocie czarnej i prążkowie szczurów LEC w porównaniu ze szczurami kontrolnymi odzwierciedlał wzmożony stres oksydacyjny toczący się w jądrach podstawnych [61]. Zaobserwowano zmiany strukturalne neuronów monoaminergicznych pod postacią zmniejszonej gęstości włókien immunoreaktywnych tyrozynazy i 5-hydroksytryptaminy u szczurów w wieku od 4 tygodni do 20 tygodni. W testach behawioralnych szczury LEC wykazywały istotnie większą aktywność lokomotoryczną, spowolnioną habituację na powtarzalny bodziec przestachu oraz zmniejszone hamowanie przedimpulsowe w porównaniu ze szczurami kontrolnymi [62].

Podsumowując, szczury LEC stanowią model szybkiego gromadzenia miedzi w wątrobie, z wysoką śmiertelnością w wieku 4. miesięcy z powodu ciężkiego zapalenia wątroby oraz rozwojem raka wątrobowokomórkowego w późniejszym okresie życia. Szczury LEC są odpowiednim modelem do badań interwencyjnych ze względu na szybki postęp ciężkiej choroby wątroby.

Szczury PINA/ATP7B (-) (LPP)

W celu wyeliminowania wpływu mutacji *Nat* na fenotyp szczurów LEC dokonano kojarzenia ze szczurami Piebald-Virol-Glaxo posiadającymi dziki wariant kodujący *Nat*. W efekcie prac powstał szczep szczurów LPP o klasycznym (dzikim) odcieniu sierści, posiadających zmutowany gen *Atp7b* i prawidłowy *Nat* [63].

Patologia wątroby

Szczury LPP kumulują nadmiar miedzi w wątrobie i prezentują pierwsze objawy choroby wątroby w wieku około 90 dni. Nielezione umierają w ciągu kolejnych 30 dni z powodu ciężkiej ostrej niewydolności wątroby. Z racji szybkiej progresji wykorzystywane są od 2005 r. w badaniach oceniających potencjalne leki wpływające na gospodarkę miedzią w ostrej niewydolności wątroby [64].

Patologia mózgu

Dotychczas nie ukazały się prace oceniające zaburzenia neurologiczne u szczurów LPP.

Modele mysie

Toxic milk mouse (txR)

Pierwszy myszy model choroby Wilsona został odkryty przez Raucha w 1983 r. Nazwa szczepu –toxic milk Rauch (txR) pochodzi od nazwiska badacza oraz wynika z wczesnych obserwacji osesków, umierających pod wpływem karmienia mlekiem matek, jak się pierwotnie wydawało „toksycznym”. Mysie noworodki, zwłaszcza płci żeńskiej, charakteryzują się słabym wzrostem, hipopigmentacją sierści, drżeniem i umierają w ciągu kilku, rzadziej kilkunastu dni po urodzeniu z powodu ostrego niedoboru miedzi, który dodatkowo pogłębia się po porodzie z powodu znacznie obniżonej zawartości miedzi w mleku matki. Myszy można uratować dzięki karmieniu zastępczemu przez normalne samice lub poprzez doustne czy dożylnie uzupełnianie miedzi [65]. Za brak miedzi w mleku odpowiada nieprawidłowa lokalizacja uszkodzonego białka Atp7b w gruczole mlekowym myszy txR, co prowadzi do znacznie obniżonego wydzielania miedzi z mlekiem [66]. W przeciwieństwie do tego modelu w ludzkim mleku matek z chorobą Wilsona opisano prawidłowe stężenie miedzi, a niedobór miedzi z okresu płodowego nie jest istotnym problemem klinicznym u noworodków matek chorych na WD [67]. W 1995 r., dwa lata po odkryciu ludzkiego genu *ATP7B*, Rauch i Wells donieśli o mutacji występującej u txR w chromosomie 8. Ostatecznie wykazano, że mutacja ta dotyczy homologu ludzkiego *ATP7B* [68]. Theophilos w 1996 r. wyizolował i wykonał pełne sekwencjonowanie cDNA kodującego myszy homolog Atp7b [69]. U myszy txR występuje spontaniczna mutacja Met1386Val (A4066G, ekson 20), podobna do jednej z wielu (ponad 1200) występującej u ludzi. Skutkiem mutacji jest zamiana jednego aminokwasu w ósmej domenie transbłonowej białka. Dalsze badania dotyczące transportu miedzi przy użyciu modeli in vitro dostarczyły dowodów, że zamiana Met1386Val powodowała nieprawidłowe kotwiczenie białka w błonach komórkowych oraz utratę aktywności enzymu związanego z transportem miedzi [70]. Porównywalne wyniki pokazano dla wielu ludzkich wariantów *ATP7B*, zarówno in vitro, jak i in vivo [71, 72].

Patologia wątroby

Na wczesnym etapie życia myszy txR dochodzi do gromadzenia dużej ilości miedzi w wątrobie, co prowadzi do jej uszkodzenia. W wieku 6 miesięcy wątroby wykazują cechy histopatologiczne zwłóknienia i przebudowy guzkowej, z hiperplazją dróg żółciowych i towarzyszącą infiltracją komórek zapalnych. Już w pierwotnym opisie modelu Rauch zawarł informacje na temat obniżonej aktywności ceruloplazminy we krwi. Wy tłumaczeniem tego zjawiska jest upośledzone włączanie jonów miedzi do apo-ceruloplazminy za pośrednictwem

dysfunkcyjnego białka Atp7b, co w efekcie skutkuje obniżonym stężeniem holo-ceruloplazminy we krwi obwodowej myszy [73]. Ekspresja mRNA ceruloplazminy pozostawała na prawidłowym poziomie. Dalsze badania nad analizą zawartości pierwiastków śladowych oraz zajęcia innych narządów wskazały na patologiczne gromadzenie miedzi w wątrobie, nerkach, śledzionie, mięśniach, mózgu i czerwonych krwinkach. Ważnym mechanizmem obronnym przeciwko podwyższonej koncentracji miedzi w wątrobie, nerkach i śledzionie jest zaobserwowana u txR zwiększona produkcja metalotionein, białek, które mają za zadanie wiązać i sekwestrować Cu, podobnie jak ma to miejsce u ludzi.

Patologia mózgu

Ważne jest, że poza drżeniem u noworodków myszy, które można przypisać niedoborowi miedzi, nie zaobserwowano oczywistych objawów neurologicznych u myszy txR. W kilku badaniach opisano podwyższone stężenie miedzi w mózgach myszy txR [74, 75]. Mutanty miały znacząco większą zawartość miedzi w korze mózgowej, jądrze ogoniastym, wzgórz, podwzgórz oraz rdzeniu przedłużonym w porównaniu z myszami kontrolnymi. Co więcej, myszy txR miały znacząco wyższy poziom metalotionein we wszystkich badanych obszarach mózgu, co sugeruje istnienie mechanizmu ochronnego ośrodkowego układu nerwowego przed toksycznością miedzi i może częściowo wyjaśniać brak objawów neurologicznych. Model myszy txR został wykorzystany z sukcesem w badaniu przedklinicznym tetrathiomolibdenianu, potencjalnego nowego leku chelatującego miedź [76].

Jackson toxic milk mouse

Niemal dekadę po pierwszych opisach txR opisano kolejny model chorych myszy, u których wykryto spontaniczną mutację punktową w pozycji 2135 w eksonie 8, prowadzącą do zamiany Gly712Asp w drugim regionie transbłonowym Atp7b [77]. Szczep txJ zaobserwowany został w The Jackson Laboratory, dostarczającym zwierzęta między innymi do badań naukowych. Nazwa została zaczerpnięta z powodu oczywistej analogii w stosunku do txR dotyczącej konieczności zapewnienia oseskom mleka zdrowych mamek. Oseski txJ urodzone przez homozygotyczną matkę txJ z uwagi na dysfunkcję Atp7b zlokalizowanego w matczynej części łożyska z powodu głębokiego niedoboru miedzi rodzą się mniejsze, słabsze i pokrywają się srebrną sierścią. Pozostawione przy matce i karmione mlekiem ubogim w miedź, z powodu dysfunkcji Atp7b w gruczole mlekowym matki, rozwijają zespół neurologiczny ostrego niedoboru miedzi przebiegający z zaburzeniem koordynacji ruchów

kończyn, drżeniami i prężeniem kończyn tylnych. Po upływie 7 dni dochodzi do zgonu myszy, jeśli nie będą karmione mlekiem zdrowych matek.

Patologia wątroby

Naturalny przebieg choroby wątroby u txJ charakteryzuje się powolnym postępem zmian histologicznych wątroby prowadzących do marskości. Obraz mikroskopowy do 3.–4. miesiąca właściwie jest prawidłowy [78, 79]. Obecność powiększonych jąder hepatocytów, około dwa razy większych niż u myszy kontrolnych, jest jedną z pierwszych nieprawidłowości obserwowaną w 4. miesiącu życia. Podobny obraz zmian jądrowych zauważalny jest u LEC, jednak szczury rozwijają patologię już w 6. tygodniu życia. Począwszy od 5. miesiąca u txJ pojawia się wyraźny naciek miąższu wątroby przez komórki immunokompetentne i zaobserwować można początki stłuszczenia drobnokropelkowego. Proces powolnego włóknienia i przebudowy guzkowej postępuje od 6.–7. miesiąca i ostatecznie prowadzi do marskości w wieku 12 miesięcy [80].

Zawartość miedzi w wątrobie wzrasta 40–50-krotnie powyżej normalnego poziomu po 2 miesiącach życia i pozostaje podwyższona przez pierwszy rok życia. Zmiany w morfologii, ultrastrukturze i funkcji mitochondriów są typowymi pierwszymi objawami dla wszystkich gryzoni, związanymi z gromadzeniem miedzi. W wątrobach płodów txJ wykazano zmniejszenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego wiążącego elementy regulacyjne steroli 1 (*Srebfl*), kluczowego w lipogenezie, oraz palmitoilotransferazy karnitynowej 1A (*Cpt1A*), i aktywowanego receptora proliferatora peroksysomów alfa (*Ppara*), ważnych w oksydacji kwasów tłuszczowych, jak również genów związanych z metabolizmem metioniny, w tym hydrolazy S-adenozylhomocysteiny (SAH) [79]. Począwszy od 3. miesiąca życia w obrazach mikroskopii elektronowej widoczne są torbielowate poszerzenia grzebieni mitochondrialnych. Biochemicznie w 5. miesiącu życia opisywano zwiększoną aktywność mitochondrialnej syntazy cytrynianowej i zmniejszoną aktywność kompleksu IV w łańcuchu oddechowym [78]. Opisywano również zaburzenie metabolizmu metioniny powstałe na tle gromadzenia miedzi, prowadzące do regulacyjnego obniżenia aktywności dwukierunkowego enzymu hydrolazy SAH, który jest odpowiedzialny za metabolizm SAH do homocysteiny lub odwrotnie, w zależności od dostępności substratu. Podwyższenie stężenia SAH, będące efektem tych zmian, jest związane z hamowaniem metylacji DNA, co potwierdza zaobserwowaną globalną hipometylację DNA w wątrobie txJ [81].

Patologia mózgu

W wieku 12 miesięcy w mózgach txJ wykazano zwiększone stężenie miedzi w prążkowie, hipokampie, mózdku i korze mózgowej [80, 82]. Zmiany zapalne opisano głównie w prążkowie, co charakteryzowało się podwyższonym poziomem markerów aktywacji astrocytów i mikrogleju. Jednocześnie zaobserwowano podwyższony poziom transkrypcji genów związanych ze stanem zapalnym, w tym interleukiny-1 beta (IL-1 β), interleukiny 4 (IL-4), czynnika martwicy nowotworów (TNF) i syntazy tlenku azotu 2 (Nos2). W testach behawioralnych txJ wykazywały łagodne nieprawidłowości, w tym preferencję używania przedniej łapy oraz wolniejsze osiąganie maksymalnej wydajności w teście wydolności lokomotorycznej z użyciem Rotarod. Dodatkowo txJ prezentowały istotne zaburzenia pamięci przestrzennej w teście labiryntu wodnego Morrisa [80]. Ekspresja enzymów specyficznych dla neuronów dopaminergicznych, noradrenergicznych i serotonergicznych nie wykazała istotnych różnic, w stosunku do grupy kontrolnej. Na modelu txJ przeprowadzono także ważne badanie opisujące wpływ podstawowego leku chelatującego – penicylaminy – na metabolizm miedzi w mózgu. Podawanie penicylaminy przez okres do 14 dni było związane ze zwiększeniem stężenia wolnej miedzi i zmniejszeniem stężenia miedzi związanej z białkami. Wzrost poziomu markerów stresu oksydacyjnego, w tym zmniejszony stosunek GSH/GSSG oraz zwiększone stężenie malonyldialdehydu, obserwowano w korze mózgowej i jądrach podstawnych [83]. Może to stanowić wyjaśnienie nasilenia objawów neurologicznych krótko po rozpoczęciu leczenia penicylaminą w dużej dawce, czyli tzw. wczesnego pogorszenia neurologicznego u pacjentów chorych na WD. Mysz txJ stanowi wartościowy model choroby Wilsona, charakteryzujący się powolnym postępem uszkodzeń wątroby w ciągu 1. roku po urodzeniu oraz zmianami metabolicznymi w wątrobie i – co istotniejsze – w mózgu. Opiswane odchylenia w testach behawioralnych sugerują możliwość wykorzystania modelu w badaniach nad manifestacją neurologiczną WD.

Myszy *Atp7b*^{-/-} (*knockout*)

W 1999 r. metodami inżynierii genetycznej uzyskano mysz *Atp7b*^{-/-} na podłożu hybrydowego szczepu C57Blx129S6/SvEv poprzez wprowadzenie licznych kodonów STOP do eksonu 2 genu *Atp7b*. Proces ten spowodował powstanie skróconego mRNA, co doprowadziło do całkowitego zahamowania powstawania białka Atp7b i utraty jego funkcji enzymatycznej. Myszy *Atp7b*^{-/-} rodzą się z małą ilością miedzi w wątrobie, która wzrasta 27-krotnie już w 1. miesiącu życia, w porównaniu do wartości obserwowanych u zdrowych kontroli i 50-krotnie w 2. miesiącu. Wraz z dalszym upływem czasu nie obserwuje się

zwiększenia zawartości miedzi w wątrobie [84]. Wysokie stężenie miedzi występuje również w nerkach, mózgu, gruczole mlekowym i łożysku tych zwierząt. W przeciwieństwie do miedzi w wątrobie ilość miedzi w mózgu wzrasta przez całe życie myszy. Podobnie jak u txJ zawartość miedzi w mleku samic mutantów jest niska. Gdy program hodowlany obejmuje heterozygotyczne samice *Atp7b*^{+/-} i homozygotyczne samce, młode *Atp7b*^{-/-} nie wykazują oczywistych nieprawidłowości neurologicznych, pomimo zmian biochemicznych w mózgu [Lutsenko Svetlana, 2020 r., dane nieopublikowane]. Jeśli żadne z rodziców nie posiada *Atp7b*, potomstwo może mieć objawy neurologiczne, takie jak drżenie i ataksja. Gdy takie młode się rodzą, objawy ujawniają się wcześniej, a większość myszy umiera w ciągu 3 tygodni od urodzenia, chyba że są zastępczo karmione przez zdrowe mamki. Myszy *Atp7b*^{-/-} wykazują upośledzone wydalenie miedzi z żółcią, defekty włączenia miedzi do ceruloplazminy i zwiększone wydalenie miedzi z moczem [85, 86].

Patologia wątroby

Patologia wątroby u myszy *Atp7b*^{-/-} rozwija się z wprost proporcjonalnie do wieku. Analizując dane z badań na myszach *Atp7b*^{-/-}, zaproponowano podział choroby wątroby, w zależności od wieku, na 3 podstawowe fazy.

Stadium I (do 8. tygodnia) charakteryzuje się łagodną patologią wątroby, z pleomorfizmem jąder i mitochondriów, widocznym w mikroskopie świetlnym. W surowicy krwi obwodowej aktywność transaminaz i stężenie bilirubiny całkowitej są podwyższone. Zaobserwować można gromadzące się niewielkie złogi miedzi, w jądrach komórkowych i cytoplazmie hepatocytów. Uważa się, że brak wyraźnego stresu oksydacyjnego na tym etapie jest wynikiem sekwestracji miedzi poprzez metalotioneiny, których ekspresja jest istotnie podwyższona [87]. Podwyższona zawartość miedzi powoduje znaczne zmiany w profilach mRNA, wpływając na składowe mechanizmów splicingu i transportu mRNA oraz zaburzając aktywność receptorów jądrowych [88-90]. Pochodne genów związanych z mechanizmem cyklu komórkowego i naprawą DNA są wyraźnie podwyższone, podczas gdy metabolizm lipidów jest obniżony [91].

W stadium II (między 13. a 20. tygodniem) obserwuje się w miąższu wątroby nasilające się rozległe zapalenie i martwicę. Uwagę zwraca także dalsze powiększenie jąder komórkowych i proliferacja przewodników żółciowych. Pojawiają się wyraźne wewnątrzkomórkowe złogi miedzi. Geny kodujące białka cytoszkieletu i związane z adhezją komórek są pobudzone [87]. W tym okresie zaburzony jest również status homeostazy żelaza u myszy *Atp7b*^{-/-} [85].

Stadium III (po 28 tygodniach) charakteryzuje się regeneracją miększu wątroby oraz intensywną proliferacją przewodów żółciowych, co stanowi podłoże rozwoju raka (cholangiocarcinoma). Obserwuje się zwiększoną transkrypcję genów zaangażowanych w odpowiedź zapalną oraz włóknienie [90]. Zmiany makroskopowe w wątrobie myszy *Atp7b*^{-/-} widoczne są po siedmiu miesiącach, kiedy to wątroba przyjmuje nieregularny kształt za sprawą pojawiających się guzków regeneracyjnych. Zauważalne są biochemiczne oznaki stresu oksydacyjnego, w tym zmiany ilości GSH oraz zwiększony stosunek GSSG do GSH [92]. Zmiany strukturalne w mitochondriach obejmują kondensację i zwiększoną gęstość macierzy, utratę struktury grzebieni mitochondrialnych. W kolejnym etapie można zaobserwować postępującą utratę macierzy mitochondrialnej i tworzenie się wodniczek. Pojawiają się także gigantyczne mitochondria o zwiększonej liczbie grzebieni [93]. Dochodzi do krytycznych zaburzeń funkcji łańcucha oddechowego, ze zwiększoną aktywnością kompleksu I i zmniejszoną aktywnością kompleksów II i III. Coraz więcej badań wskazuje na rolę zaburzenia metabolizmu lipidów w patogenezie WD. Zmiany w metabolizmie lipidów i stężeniu lipoprotein były po raz pierwszy udokumentowane u szczurów LEC, jednak większość badań w tym zakresie przeprowadzono na myszach *Atp7b*^{-/-}. Supresja genów związanych z metabolizmem lipidów i cholesterolu dostrzegalna jest na wszystkich etapach choroby w wątrobach myszy *Atp7b*^{-/-} [87, 91]. Jednocześnie obserwuje się zmniejszone stężenia lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) oraz cholesterolu w wątrobie.

Patologia mózgu

Zwiększona zawartość miedzi w mózgach myszy *Atp7b*^{-/-} została opisana w pierwotnym badaniu charakteryzującym ten model [84]. W późniejszych badaniach opisano dwukrotnie wyższą w porównaniu z myszami kontrolnymi zawartość miedzi w mózgach 11-miesięcznych myszy [94]. Gromadzenie miedzi było podobne we wszystkich badanych obszarach mózgowych, a różnice w obrazie zaburzeń mikroskopowych autorzy wytłumaczyli zmienną wrażliwością regionalną poszczególnych struktur mózgowych na miedź. Z drugiej strony stężenie miedzi było obniżone w obszarach okołokomorowych, co wytłumaczono aktywnym transportem miedzi do płynu mózgowo-rdzeniowego poprzez inne niż *Atp7b* białka. W innym badaniu nie wykazano istotnych różnic w stężeniu miedzi w badanych strukturach (jądra podstawne, kora mózgowa, mózdzek i cały mózg) [95]. W powyższym badaniu opisano ponadto istotne nieprawidłowości w morfologii organelli komórkowych neuronów jąder podstawnych (głównie mitochondriów i cytoszkieletu aksonów). Autorzy wyjaśnili

uszkodzenie neuronów niezidentyfikowanymi czynnikami patogenetycznymi, które najprawdopodobniej wzmacniają toksyczne działanie miedzi w mózgu *Atp7b*^{-/-}.

Inne ssaki

Modele psie

U kilku ras psów opisano dziedziczną skłonność do zaburzeń w homeostazie miedzi prowadzącą do jej nadmiernego gromadzenia w narządach. Przedstawiono takie przypadki wśród dalmatyńczyków, west highland white terierów, dobermanów, bedlington terierów oraz labradorów retrieverów [96]. Choroba u bedlington terierów była najdłużej postrzegana jako model WD u psów, jednak ostatecznie odkrycie mutacji odpowiedzialnej za to schorzenie doprowadziło do identyfikacji nowego białka związanego z homeostazą miedzi – COMMD-1, co jednoznacznie wykluczyło rolę *Atp7b* w patogenezie zaburzeń u psów rasy bedlington terier. [97].

Labrador retriever

W 2016 r. przeprowadzono badanie całego genomu labradorów retrieverów prezentujących zaburzenia metabolizmu miedzi. Odkryto, że za objawy choroby odpowiedzialna jest mutacja C-końcowego odcinka *Atp7b*, skutkująca zamianą argininy na glutaminę. Zadecydowało to o włączeniu psów do dalszych badań pozwalających na poznanie charakterystyki kolejnego modelu zwierzęcego WD [98].

W badaniach z wykorzystaniem hodowli komórkowej wykazano, że zmutowane białko, podobnie jak u ludzi, traci funkcję wydalania miedzi do żółci. Schorzenie to w populacji labradorów częściej występuje u samic [99].

Patologia wątroby

Wystąpienie jawnego klinicznie zapalenia wątroby z takimi objawami jak utrata masy ciała, żółtaczka i wodobrzusze obserwuje się w 7. roku życia. Dotknięte chorobą psy po wystąpieniu objawów wykazują szybką progresję w ciągu kilku dni lub tygodni, co przy braku leczenia doprowadza do śmierci. Zwierzęta dobrze reagują na standardowe leczenie penicylaminą. W badaniu histopatologicznym wykazano depozyty miedzi w środkowej strefie zrazika wątrobowego oraz w obrębie lizosomów. Wszystkie te zmiany nasilone w czasie odpowiadały za postępujące zwłóknienie mięszu wątroby [100]. Pomimo znacznych podobieństw do choroby u ludzi obraz mikroskopowy jest inny. Autorzy zwracają uwagę na brak ciałek Mallory’ego i stosunkowo małe nasilenie stłuszczenia mięszu wątroby [98].

Patologia mózgu

Nie zaobserwowano dotąd objawów neurologicznych u labradorów retrieverów, a pierścienie Keisera–Fleischera nie były obecne [98].

Inne kręgowce

Danio pręgowany *Atp7b*^{-/-} (Danio Rerio)

W związku ze swoją wrodzoną wrażliwością na miedź Danio pręgowany był obiektem wielu badań opisujących wewnątrzkomórkowe szlaki metabolizmu miedzi u organizmów wielokomórkowych. Wykazano, że u zdrowych zarodków gen *Atp7b* ulega ekspresji zarówno w wątrobie, jak i w mózgu [101]. Osobniki z mutacją *Atp7b* opisano pierwszy raz w 2020 r. Dezaktywację *Atp7b* przeprowadzono za pomocą kompleksu rybonukleoproteinowego Cas9/gRNA, a miejsce docelowe gRNA (GAGACGGTTAAGGGTTCC) wybrano w eksonie 2 [102]. Stworzono 2 linie ryb. Pierwsza zawierała delecję punktową (1 pary zasad) skutkującą przesunięciem ramki odczytu w kodonie 238, co wprowadziło przedwczesny stop w kodonie 258. Druga linia zawierała dłuższą delecję (4 par zasad) doprowadzając do przesunięcia ramki odczytu w kodonie 238, co wprowadziło przedwczesny stop w kodonie 257. Stężenie Cu było niższe u 5-dniowych zarodków, 45-dniowych larw i 4-miesięcznych dorosłych osobników *Atp7b*^{-/-}, stężenie cynku i żelaza było porównywalne ze stężeniem w zarodkach dzikich [103].

Patologia wątroby

Wykazano stłuszczenie mięszu wątroby u 45-dniowych larw *Atp7b*^{-/-}, a stłuszczenie i początki włóknienia wątroby udokumentowano u 4-miesięcznych mutantów [103].

Patologia mózgu

Opisano wpływ mutacji *Atp7b* na gromadzenie się Cu i zaburzenie rozwoju siatkówki larw ryb *Atp7b*^{-/-} [104]. Opisano również zaburzenia motoryczne i behawioralne u mutantów. Ryby chore wykonywały mniej ruchów, przez co poruszały się wolniej niż zdrowe, ponadto pływały w stosunkowo ograniczonym obszarze zbiornika i na krótsze odległości niż osobniki zdrowe [103].

Cel pracy

1. Analiza zmian biochemicznych u myszy txJ.
2. Analiza wpływu płci na przebieg choroby u myszy txJ.

Material i metody

W badaniu wykorzystano myszy szczepu C3HeB/FeJ*Atp7b*^{tx-J}/J (The Jackson Laboratory, Maine, USA), grupę kontrolną utworzono z myszy szczepu C3HeB/FeJ (The Jackson Laboratory, Maine, USA). O planowanym projekcie poinformowano i uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie. Zamówiono po 5 par myszy do każdej z grup, przy użyciu których rozpoczęto hodowlę w Zwierzętarńi Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Hodowlę prowadzono w zgodzie z Dyrektywą Europejską 63/2010 oraz ustawą o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych z 2015 r. Zwierzęta utrzymywane były w liczbie maksymalnie 6 sztuk jednej płci na jedną standardową klatkę plastikową. Dostęp do standardowej paszy i wody pitnej był nieograniczony. Warunki temperatury i wilgotności powietrza ściśle monitorowano. Oświetlenie sztuczne funkcjonowało w trybie standardowym w cyklu 12-godzinnym.

Z powodu niedoboru miedzi w mleku matek txJ, oseski txJ w 1. dobie po urodzeniu były odstawiane do zastępczych matek karmiących – myszy szczepu BALB/cByJ, pochodzących ze Zwierzętarńi Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, i w ten sposób karmione mlekiem o normalnej zawartości miedzi. Jako metodę przeciwdziałania stresowi po utracie potomstwa wśród matek txJ oraz w celu weryfikacji prawidłowego dziedziczenia zmutowanych alleli w hodowli pozostawiano jednego oseska txJ przy matce txJ. Oseski karmione naturalnie przez matki txJ zdychały między 4. a 7. dniem po urodzeniu z powodu niedoboru miedzi. Wszystkie mioty włączone do badania zostały uprzednio zweryfikowane przy użyciu wyżej wymienionej metody.

Ostatecznie do badania włączono 61 txJ oraz 81 myszy kontrolnych podzielonych na 4 grupy wiekowe, przy założeniu stosunku płci 1 : 1. Rozkład grup zaprezentowano w tabeli 2.

Tabela 2. Rozkład wiekowy i płci myszy włączonych do projektu

Wiek w miesiącach	txJ <i>n</i> = 61		Kontrolne <i>n</i> = 81	
	samce	samice	samce	samice
2	9	9	9	8
4	9	9	9	9
8	8	9	9	9
14	3	5	14	14

Liczebność i podział grup wiekowych zostały dobrane na podstawie spodziewanych wyników projektu i dotychczasowych doświadczeń zespołu z wykorzystaniem tego modelu mysiego. Pierwotnym założeniem projektu było utworzenie grupy najstarszej w wieku 18 miesięcy składającej się z 9 osobników w każdej podgrupie. Jednak z uwagi na wysoką śmiertelność txJ podjęto ostateczną decyzję o włączeniu do projektu 8 osobników txJ w wieku 14 miesięcy.

Myszy po osiągnięciu odpowiedniego wieku uśmiercono poprzez dyslokację kręgów szyjnych. Pobierano krew, mózg, wątrobę, serce, gałkę oczną lewą, dwunastnicę do dalszych oznaczeń. Próbkę krwi po uformowaniu skrzepu odwirowywano z prędkością 1000 obrotów na minutę przez 10 minut. Supernatant pobierano do probówek Eppendorf PCR Clean o objętości 1,5 mL. Tkanki i narządy mrożono w temperaturze -80°C .

Skład pierwiastkowy

Pomiar stężenia pierwiastków przeprowadzono metodą całkowitego odbicia promieniowania rentgenowskiego (*total reflection X-ray fluorescence* – TXRF). Technika ta pozwala na wykorzystanie fluorescencji rentgenowskiej do ilościowej analizy próbek ciekłych za pośrednictwem zjawiska całkowitego wewnętrznego odbicia i została zaproponowana w 1971 r. przez japoński zespół naukowców kierowany przez Yonedę [105].

W wykorzystanej w projekcie metodzie TXRF promieniowanie wzbudzające pada na próbkę pod kątem mniejszym niż krytyczny ($0,1^{\circ}$). Przed dotarciem do próbki promieniowanie jest odpowiednio modyfikowane przez układy optyczne, co sprawia, że po całkowitym odbiciu większość docierającego do detektora promieniowania składa się jedynie z promieniowania charakterystycznego. Taki sposób pracy znacznie redukuje poziom szumu tła, co z kolei istotnie obniża granice wykrywalności, zwłaszcza pierwiastków śladowych. TXRF oferuje nowe możliwości analityczne, do których należy zaliczyć znacznie niższe niż w innych metodach granice wykrywalności, możliwość bezpośredniego pomiaru próbek ciekłych oraz możliwość pomiaru próbek o niewielkiej masie. W przemyśle elektronicznym metoda TXRF już ponad dekadę temu stała się standardem w procesie kontroli jakości.

TXRF wykorzystano do pomiarów mających określić zawartość i stężenie pierwiastków (S, Cl, K, Ca, Cr, Fe, Mn, Ni, Cu, Zn, Ga, Se, Br, Rb, Sr) w prążkowie, wątrobie, sercu, dwunastnicy i gałce ocznej. Do badania wytypowano te tkanki i narządy, które w sposób istotny dotknięte są w przebiegu WD [32].

Z uwagi na ograniczenia finansowe zdecydowano zbadać prądkowie i wątrobę we wszystkich 4 grupach wiekowych, zaś dwunastnicę, serce i gałkę oczną poddano pomiarom u myszy 2- i 8-miesięcznych. Prądkowie wypreparowano z mózgu natychmiast po rozmrożeniu. Przygotowano odpowiednich rozmiarów próbki z wątroby, serca, dwunastnicy oraz gałki ocznej. Próbki umieszczono w naczyniach odpornych na działanie kwasu (Anton Parr, Austria), a następnie dodano kwas azotowy (V) (jakości supra-pure) (0,5–0,6 mL) oraz perhydrol (50 μ L). Naczynia zostały szczelnie zamknięte i umieszczone w piecu na 8 godzin w temperaturze 200°C. Po wytrawieniu dodano do próbek wewnętrzny standard w postaci 10 μ L roztworu Ga (1000 mg/L) (Merck, Niemcy) w celu umożliwienia dalszej analizy ilościowej. Ostateczne stężenie Ga wahało się od 40 mg/L do 95 mg/L, w zależności od wagi próbki. Pomiarów dokonano na szkiełkach Menzel Glaser SuperFrost (Thermo Scientific, USA) w trzech powtórzeniach na spektrometrze TXRF, Nanohunter II (Rigaku, Japonia). Użyto lampy rentgenowskiej molibdenowej przy energii 55 kV i prądzie 12 mA, z czasem pojedynczego pomiaru wynoszącym 1000 sekund.

Skład biochemiczny

Do określenia składu biochemicznego pobranych próbek zastosowano metodę Fourierowskiej spektroskopii w podczerwieni (FTIR). Metoda ta wykorzystuje zjawisko pochłaniania promieniowania podczerwonego przez cząsteczki. Promieniowanie pochłaniane jest przy określonych częstotliwościach, które odpowiadają energiom drgań wiązań chemicznych w cząsteczce. Kiedy energia drgań wiązań chemicznych i energia promieniowania podczerwonego są sobie równe, wiązanie pochłania tę energię. Różne wiązania w cząsteczce pochłaniają różne długości fal promieniowania podczerwonego, co tworzy charakterystyczne dla danej cząsteczki widmo absorpcji.

Przygotowano łącznie 285 próbek przekrojów czołowych mózgu i wątroby o grubości 10 μ m. Używano kriostatu CM1860UV (Leica, Niemcy), wymiennych ostrzy o niskim profilu DB80LX (Leica, Niemcy) oraz kleju kriogenicznego OCT (Leica, Niemcy). Przekroje wykonywano w temperaturze –20°C. Przekroje umieszczono na okrągłych szkiełkach z fluorku wapnia CaF₂ o średnicy 25 mm i grubości 2 mm (Crystan, Wielka Brytania). Próbki suszono liofilizacyjnie w temperaturze –80°C oraz metodą próżniową. Pomiary wykonano w trybie transmisyjnym, używając spektrometru Nicolet 8700 (Thermo Scientific) w zakresie spektralnym 4000–1000 cm^{-1} , z rozdzielczością spektralną 4 cm^{-1} , oraz odpowiednio

128 i 32 skanami na spektrum tła i tkanki. Do apodyzacji interferogramów zastosowano funkcję Happ–Genzel.

Przetwarzanie danych FTIR przeprowadzono przy użyciu autorskiego kodu w programie Python 2.7, wykorzystując pakiety numpy, pandas oraz matplotlib. Rozwiązania te oparte były na prostym obliczaniu pola powierzchni pod szczytami lub ich wysokości z podstawową korekcją liniową bazową. Pasmo w zakresie 1600 cm^{-1} do 1700 cm^{-1} – parametr Amid I max. – jest kluczowe w analizie struktury białek. Informuje głównie o drganiach rozciągających grupy karbonylowej ($\text{C}=\text{O}$) w szkielecie peptydowym białek. Jest ono bardzo czułe na zmiany w strukturze wtórnej białek, takich jak α -helisy, β -kartki. Zmiany w strukturze wtórnej mogą wpływać na kształt i położenie pasma Amid I, co pozwala na analizę konformacyjną białek. Opisując problem w największym skrócie, można posłużyć się uproszczeniem, że im bardziej szczyt pasma Amid I oddalony jest od wartości 1655 cm^{-1} , tym większe zachodzą aberracje w strukturze drugorzędowej białek wchodzących w skład tkanki. Amid I, czyli całka z pasma Amid I, które znajduje się w zakresie $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, informuje o ilości białka w badanej próbce. Im większa całka, tym większa zawartość białka. Pozwala ona na półilościową ocenę zaburzeń stężenia białek w badanej tkance. Pasmo w okolicach 1730 cm^{-1} w spektroskopii FTIR jest również charakterystyczne dla drgań rozciągających grupy karbonylowej ($\text{C}=\text{O}$). Jest ono jednak bardziej typowe dla estrów, aldehydów i kwasów karboksylowych. Pasmo to jest często obserwowane w przypadku estrów, gdzie drgania rozciągające występują w zakresie $1735\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$. W przypadku aldehydów pasmo to może pojawiać się w zakresie $1720\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$, a w przypadku kwasów karboksylowych – w zakresie $1700\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$. Analiza tego pasma może dostarczyć informacji o obecności i typie grup karbonylowych w badanej próbce, co jest przydatne w identyfikacji i charakterystyce związków organicznych. Pasma w okolicach 2920 cm^{-1} i 2990 cm^{-1} w spektroskopii FTIR są charakterystyczne dla drgań rozciągających wiązań C-H , jak i całych grup metylowych (CH_3) i metylenowych (CH_2) w związkach organicznych. Analiza tego pasma jest przydatna w identyfikacji i charakterystyce biochemicznej alkanów, lipidów i polimerów. Pasmo to może być wykorzystywane do szczegółowej biomedycznej charakterystyki tłuszczów i olejów. Pasmo w okolicach 3020 cm^{-1} w spektroskopii FTIR jest związane z drganiami rozciągającymi wiązań C-H w grupach alkenowych ($\text{C}=\text{H}$) oraz aromatycznych (C-H) w związkach organicznych. W przypadku związków aromatycznych rozchodzące się drgania widoczne są w zakresie $3000\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$. Pozwala to na identyfikację obecności pierścieni aromatycznych w składzie biomolekuł. Analiza zawartości fosforanów organicznych w spektroskopii FTIR przy pasmie $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ polega na identyfikacji i ilościowym określeniu obecności grup

fosforanowych w próbce. Pasma to jest charakterystyczne dla drgań rozciągających wiązań $P=O$ oraz drgań asymetrycznych wiązań $P-O-C$ w fosforanach organicznych.

W celu ułatwienia interpretacji wyników zdefiniowano charakterystyczne wskaźniki umożliwiające ilościową analizę. Wskaźniki te obejmowały stosunek lipidów do białek. Stosunek struktur drugorzędowych białek α/β , który informował o zmianie budowy wtórnej, w kontekście zaburzenia ich konformacji: β -arkuszy do α -helis. Wskaźnik nienasycenia lipidów odzwierciedlał zmiany struktury lipidów w tkankach i był obliczany jako stosunek zintegrowanego pola powierzchni wiązań CH olefinowych w nienasyconych łańcuchach lipidowych do zintegrowanego pola powierzchni asymetrycznego rozciągania $-CH_3$ charakterystycznego dla bocznych łańcuchów lipidowych.

„Fingerprint” w pomiarach odnosi się do specyficznego obszaru widma podczerwieni (zwykle $1500-400\text{ cm}^{-1}$), który zawiera unikalne pasma absorpcyjne charakterystyczne dla poszczególnych molekuł. Ten obszar obejmuje złożone wibracje, które odpowiadają za unikalny wzorzec spektralny dla analizowanego materiału. Region „odcisku palca” jest często wykorzystywany do identyfikacji i różnicowania związków chemicznych, ponieważ różne substancje mają unikalne wzorce absorpcji w tym obszarze, wynikające z ich struktury molekularnej. Porównanie widm „odcisku palca” próbki nieznannej z widmami referencyjnymi umożliwia identyfikację składu chemicznego i obecnych grup funkcyjnych. W przeprowadzonej analizie, ze względu na złożoność próbek, „odcisk palca” przedstawia całkowitą zawartość molekularną w próbce.

Mikroobrazowanie FTIR i μ -XRF

Wykonano mapowanie przekrojów czołowych u 2- i 14-miesięcznych osobników w celu porównania map rozkładu istotnych pierwiastków (microXRF) z mapami składu chemicznego (FTIR). Wszystkie próbki mózgu do podwójnego obrazowania FTIR i mikroXRF pocięto na skrawki o grubości $20\text{ }\mu\text{m}$ w temperaturze -20°C przy użyciu kriostatu CM1860UV (Leica, Niemcy), ostrzy niskoprofilowych DB80LX (Leica, Niemcy) oraz kleju do przymrażania preparatów OCT Tissue Freezing Medium (Leica, Niemcy). Następnie przekroje czołowe mózgów umieszczono na filmie Ultralene (SPEX SamplePrep, USA) o grubości $4\text{ }\mu\text{m}$, zawieszonym na uchwycie z pleksiglasu o średnicy 36 mm . Próbki suszono liofilizacyjnie w temperaturze -80°C .

Mapowanie FTIR przekrojów mózgu przeprowadzono w trybie transmisyjnym, używając spektrometru Nicolet 8700 (Thermo Scientific, USA) połączonego z mikroskopem

IR Continuum (Thermo Scientific, USA) w zakresie spektralnym $3900\text{--}850\text{ cm}^{-1}$, z rozdzielczością spektralną 8 cm^{-1} , za pomocą pojedynczego otworu nożowego ($20\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$). Widma absorpcji FTIR zbierano przy użyciu detektora rtęciowo-kadmowo-tellurkowego (MCT) chłodzonego ciekłym azotem. Przetwarzanie danych mikroobrazowania FTIR było takie samo jak w badaniach FTIR, co umożliwiło określenie poziomów molekularnych parametrów lipidów i białek w kolejnych punktach pomiarowych na próbkach, a następnie rekonstrukcję dwuwymiarowych (2D) map rozkładu parametrów molekularnych. Graficzną wizualizację obrazów 2D wykonano w programie Surfer v. 27 (Golden Software, USA).

Pomiary μ -XRF wykonano za pomocą spektrometru M4 Tornado Plus (Bruker, Szwajcaria) z użyciem lampy rentgenowskiej z anodą rodową, działającej z mocą 30 W (50 kV, 600 μ A). Promieniowanie rentgenowskie skupiano do plamki o średnicy $20\text{ }\mu\text{m}$ za pomocą soczewki polikapilarnej. Wzbudzone promieniowanie charakterystyczne pierwiastków wykrywano przy użyciu dwóch krzemowych detektorów dryfowych (SDD) o aktywnej powierzchni 60 mm^2 i rozdzielczości energetycznej poniżej 145 eV (dla linii Mn-K α). Pomiary przeprowadzano w próżni pod ciśnieniem 2 mbar. Przekroje mózgu skanowano z rozmiarem piksela $20 \times 20\text{ }\mu\text{m}$ i czasem ekspozycji 125 ms. Ilościowe obliczenia oparto na danych z wytypowanych regionów zainteresowania (ROI) netto uzyskanych dla każdego piksela, eksportowanych z oprogramowania urządzenia.

Badania biochemiczne krwi

Aktywność ceruloplazminy

Stężenie ceruloplazminy w surowicy każdego zwierzęcia określono przy użyciu zmodyfikowanej metody opisanej przez Schosinsky'ego [106]. Do 50 μ l surowicy dodawano 4 ml buforu octanowego. Roztwór ogrzewano do 37°C w łaźni wodnej. Do próbek dodawano 500 μ l 0,05% wodnego roztworu chlorowodoru p-fenyloalaniny. Następnie roztwór inkubowano przez 1 h w temperaturze 37°C w łaźni wodnej. Po inkubacji dodawano do probówek 500 μ l azydki sodu. Próbkę analizowano w jednorazowych kuwetach (Biochrom, Wielka Brytania) z użyciem kolorymetru WPA CO7500 (Biochrom, Wielka Brytania) przy długości fali $\lambda = 530\text{ nm}$. Za wynik końcowy uznano średnią arytmetyczną z dwukrotnego pomiaru.

Testy funkcji wątroby

Oznaczenie ilościowe aktywności AST oraz ALT w surowicy mysiej zostało wykonane przy użyciu testu ASTLP zgodnie z zaleceniami producenta na analizatorze cobas 8000CC (Roche, Szwajcaria) w 3 powtórzeniach.

Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) oznaczono w sposób zgodny z zaleceniami producenta metodą kolorymetryczną w analizatorze cobas c 701/702 (Roche Diagnostics, USA) w 3 powtórzeniach, z których wyciągnięto średnią arytmetyczną. Wykorzystano test opierający się na metodzie referencyjnej według wytycznych Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej (The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine – IFCC) [107].

Oznaczenie stężenia bilirubiny całkowitej zostało wykonane zgodnie z zaleceniami producenta na analizatorze cobas 8000CC (Roche, Szwajcaria). Do pomiaru wykorzystano test BILT-3, służący do ilościowego oznaczenia stężenia bilirubiny całkowitej w surowicy. Za ostateczny wynik uznano średnią arytmetyczną z 3 pomiarów.

Pomiar ilościowy stężenia albuminy w surowicy krwi mysiej został przeprowadzony zgodnie z zaleceniami producenta na analizatorze cobas 8000CC (Roche, Szwajcaria) z wykorzystaniem testu ALBT2, opartego na metodzie immunoturbidymetrycznej. Za ostateczny wynik uznano średnią arytmetyczną z 3 pomiarów.

Stężenie neurofilamentów (Nf-L)

Oznaczenie stężenia Nf-L w surowicy mysiej zostało przeprowadzone przy użyciu kolorymetrycznego testu ELISA Mouse NF-L ELISA Kit (Novus Biologicals, USA) nr katalogowy NBP2-80299. Odczytów dokonano za pomocą spektrofotometru Multiskan FC (Thermo Fischer Scientific, USA) przy długości fali $\lambda = 450$ nm. Stężenie Nf-L obliczono na podstawie krzywej wzorcowej wykonywanej oddzielnie dla każdej płytki ELISA. Za wynik ostateczny przyjęto średnią arytmetyczną z 2 powtórzeń.

Analiza statystyczna

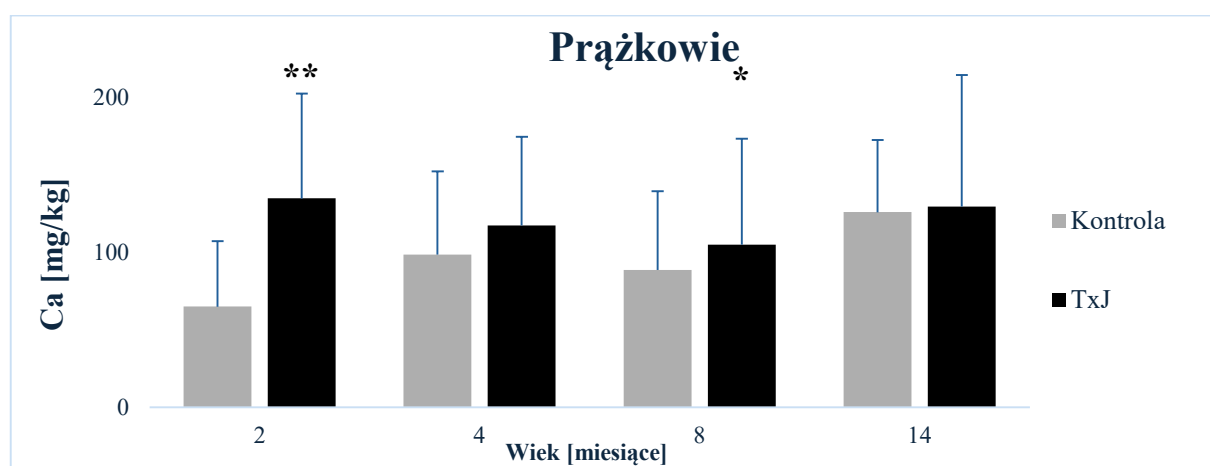
Dobór wielkości grup opracowany został na podstawie analizy wyników dotychczasowych publikacji, poprzednich projektów przeprowadzanych przez promotora z wykorzystaniem modelu txJ oraz spodziewanych wyników doświadczenia. Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu programu Statistica w wersji 13.3 (StatSoft, Polska). Weryfikację rozkładu normalnego danych przeprowadzono z użyciem testu Shapiro–Wilka.

Ze względu na małą liczebność każdej grupy zwierząt (~9 osobników) ostatecznie zdecydowano się na użycie testu U Manna-Whitneya do wszystkich obliczeń w tym projekcie. Różnicę istotną określono standardowo – $p < 0,05$.

Wyniki

Prądkowie – skład pierwiastkowy

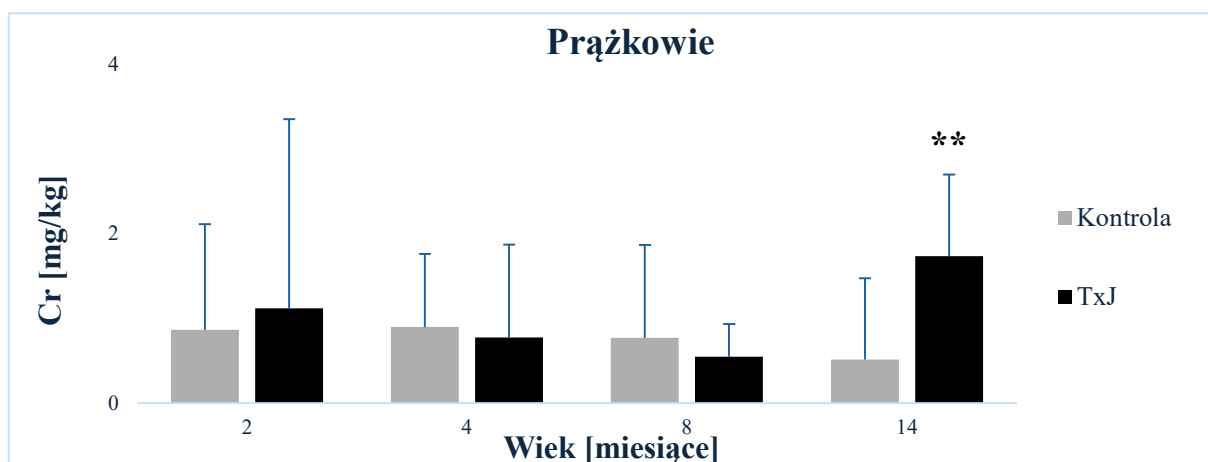
W prądkowiu 2-miesięcznych txJ stężenie wapnia było istotnie wyższe niż u myszy z grupy kontrolnej, odpowiednio 134,89mg/kg i 65,0 mg/kg; $p < 0,01$. U 8-miesięcznych txJ zaobserwowano niższe stężenia wapnia, przy czym wartości pozostawały wyższe niż w grupie kontrolnej, odpowiednio 105,0 mg/kg i 88,62 mg/kg; $p < 0,05$. U myszy 14-miesięcznych stężenie wapnia było porównywalne w obu grupach (wykres 1). Mediana stężenia wapnia u 8-miesięcznych samic kontrolnych przewyższała obserwowaną w populacji samic txJ. Różnica jednak nie była statystycznie istotna (tabela 4). U samców stężenie wapnia było istotnie wyższe w populacji txJ 2- i 8-miesięcznych (tabela 5). Stężenie wapnia w prądkowiu samców i samic txJ było podobne (tabela 6).



Wykres 1. Stężenie wapnia w prądkowiu (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

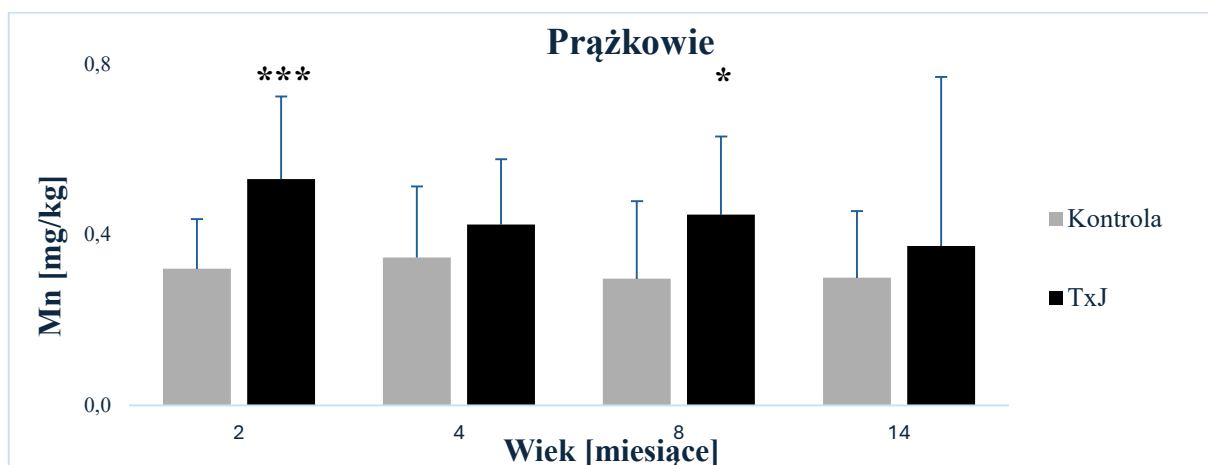
Stężenie chromu w prądkowiu myszy 2-, 4-, i 8-miesięcznych było podobne w grupie txJ i kontrolnej. Trend zmiany stężenia u starszych txJ był spadkowy (wykres 2). W pomiarze wykonanym u myszy 14-miesięcznych stężenie chromu było wyraźnie wyższe w populacji txJ (tabele 3 i 5). Stężenie chromu różniło się istotnie w prądkowiu najmłodszych samic: w populacji txJ 4-krotnie przewyższało wartości obserwowane w grupie kontrolnej, odpowiednio: 2,08 mg/kg; 0,56 mg/kg; $p = 0,03$ (tabela 4). Płeć txJ nie była czynnikiem różnicującym stężenie chromu w prądkowiu (tabela 6).



Wykres 2. Stężenie chromu w prążkowie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie manganu było wyższe w prążkowie txJ niż w grupie kontrolnej, różnice istotne statystycznie odnotowano u myszy 2- i 8-miesięcznych (tabela 3). Różnice pomiędzy grupami zmniejszyły się w starszych grupach wiekowych (wykres 3). Zarówno u samic, jak i u samców różnice były najsilniej wyrażone u myszy najmłodszych (tabele 4 i 5), a w samej populacji txJ nie odnotowano różnic w zakresie stężenia manganu w prążkowie pomiędzy samcami a samicami (tabela 6).

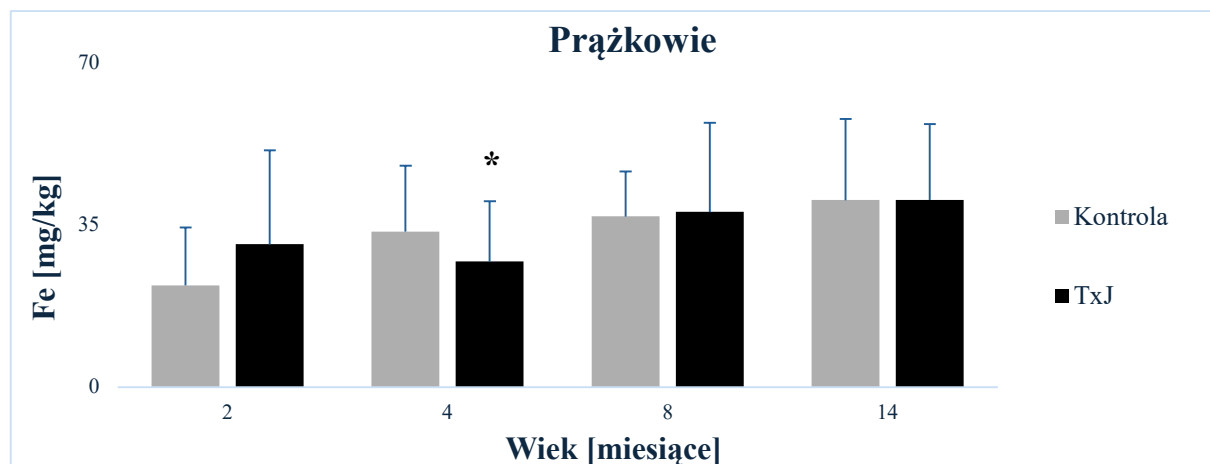


Wykres 3. Stężenie manganu w prążkowie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

W grupie myszy kontrolnych stężenie żelaza było coraz wyższe w każdej grupie wiekowej. U 2-miesięcznych txJ stężenie żelaza w prążkowie przewyższało wartości obserwowane w grupie kontrolnej. U 4-miesięcznych txJ było mniejsze w porównaniu do 2-miesięcznych txJ. U myszy 8- i 14-miesięcznych wyniki były porównywalne między grupami

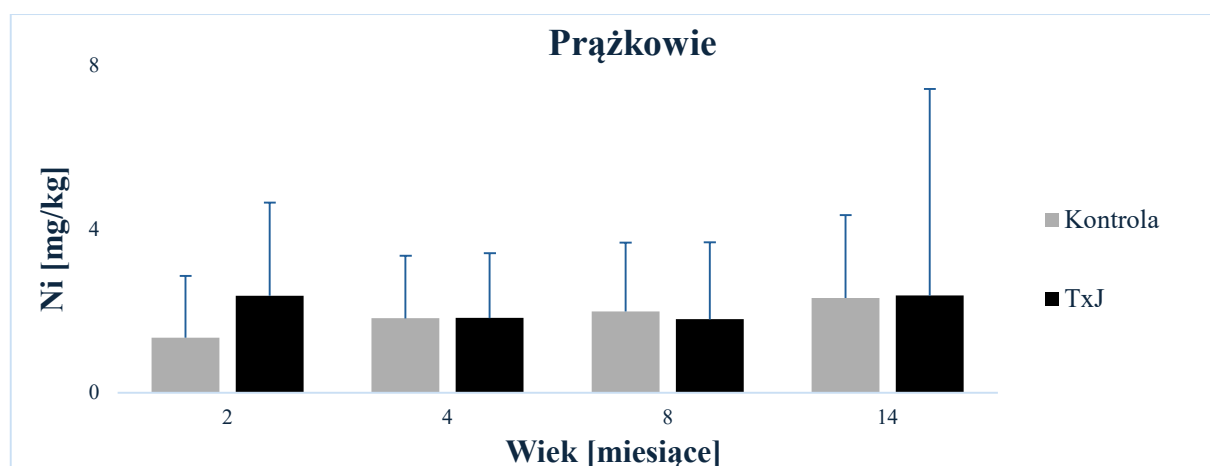
(wykres 4). W przypadku populacji samic u txJ zauważono istotnie niższe stężenie żelaza w prążkowie w porównaniu z samicami kontrolnymi jedynie w przypadku myszy 4-miesięcznych (tabela 4). Nie opisano istotnych różnic zależnych od płci myszy wewnątrz populacji txJ (tabela 6).



Wykres 4. Stężenie żelaza w prążkowie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie niklu było wyższe jedynie w grupie 2-miesięcznych txJ. W żadnej grupie wiekowej nie wystąpiły różnice istotne statystycznie (wykres 5). Próba rzetelnej analizy stężenia niklu okazała się trudna i obciążona dużym błędem, co zostało omówione szczegółowo w dyskusji.

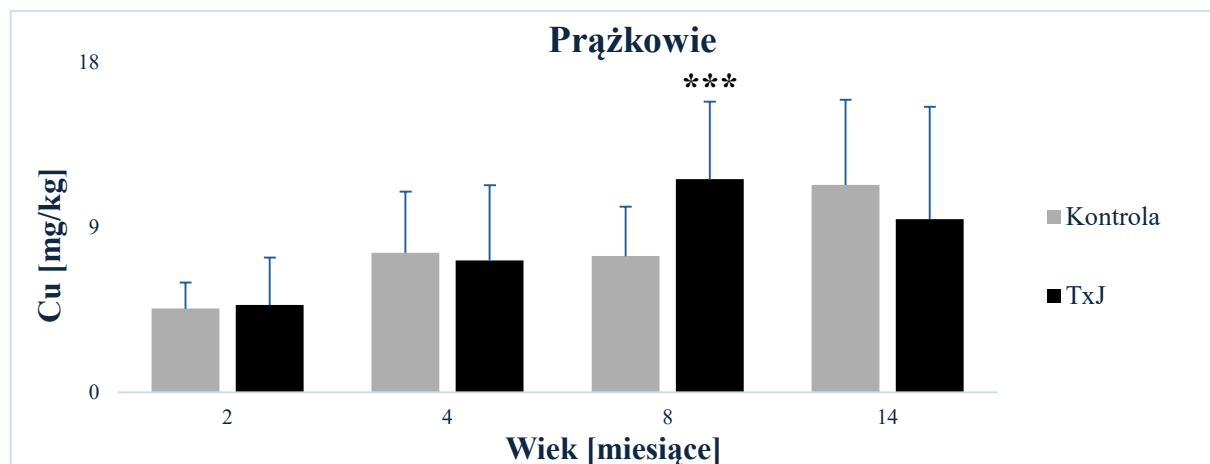


Wykres 5. Stężenie niklu w prążkowie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie miedzi w grupie txJ było coraz wyższe u myszy 2-, 4- i 8-miesięcznych. Istotną różnicę zaobserwowano u 8-miesięcznych txJ, u których stężenie miedzi w prążkowie było

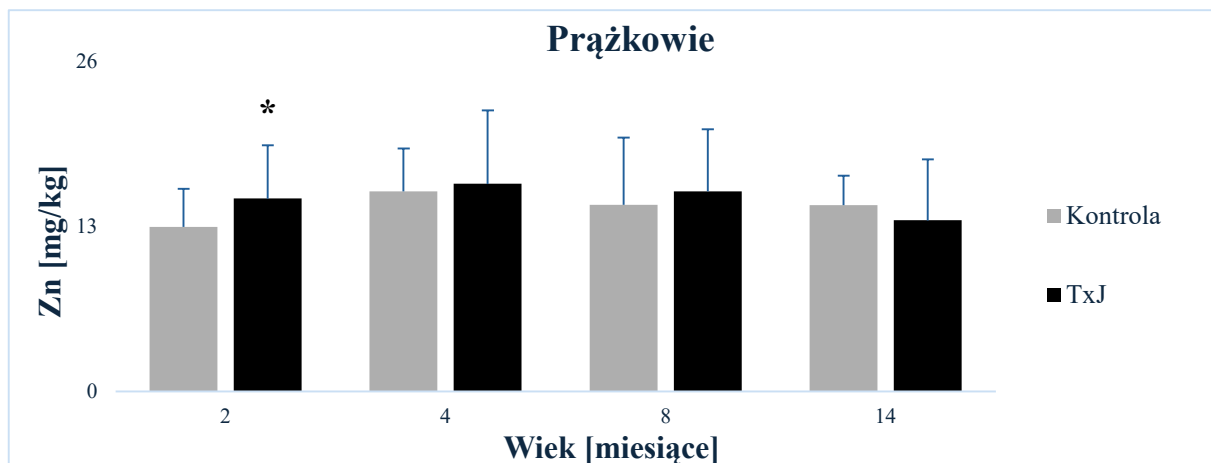
wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (wykres 6). Różnica ta była również zauważalna u obu płci z osobna (tabele 4 i 5). U myszy 14-miesięcznych stężenie miedzi w prążkowie txJ było niższe niż u 8-miesięcznych txJ, a różnica względem grupy kontrolnej nie była istotna statystycznie. Nie odnotowano różnic pomiędzy samicami i samcami txJ (tabela 6).



Wykres 6. Stężenie miedzi w prążkowie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie cynku w prążkowie u 2-miesięcznych txJ było istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej, odpowiednio 15,2 mg/kg i 12,96 mg/kg; $p = 0,01$ (wykres 7). W pomiarach u myszy 4-, 8- i 14-miesięcznych stężenie utrzymywało się na porównywalnym poziomie w obu grupach. Zaobserwowano podobny trend początkowego wzrostu z plateau między 4. a 8. miesiącem, aby w pomiarze u osobników najstarszych osiągnąć w obu grupach wartości niższe niż u myszy 8-miesięcznych (tabela 3). W populacji 2-miesięcznych samic w przeciwieństwie do samców nie zaobserwowano opisywanej powyżej różnicy (tabele 4 i 5). Wartości stężenia cynku w prążkowiach samic i samców txJ były porównywalne we wszystkich grupach wiekowych (tabela 6)



Wykres 7. Stężenie cynku w prądkowiu (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Tabela 3. Stężenie pierwiastków w prążkowi w mg/kg

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Pierwiastek	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	65	42,25	134,89	67,75	0,00	98,56	53,81	117,44	57,31	0,68	88,62	50,86	105	68,49	0,04	125,99	46,52	129,54	84,99	0,99
Cr	0,86	1,25	1,12	2,24	0,14	0,9	0,86	0,77	1,1	0,49	0,77	1,1	0,55	0,39	0,07	0,51	0,96	1,73	0,97	0,00
Mn	0,32	0,12	0,53	0,19	0,00	0,35	0,17	0,42	0,15	0,12	0,3	0,18	0,45	0,18	0,03	0,3	0,16	0,37	0,4	0,29
Fe	21,89	12,49	30,76	20,3	0,13	33,5	14,23	27,03	13,05	0,04	36,76	9,7	37,74	19,24	0,9	40,28	17,5	40,33	16,37	0,87
Ni	1,35	1,51	2,37	2,28	0,06	1,82	1,53	1,83	1,58	0,45	1,99	1,68	1,8	1,88	0,79	2,32	2,02	2,37	5,05	0,79
Cu	4,57	1,43	4,76	2,59	0,78	7,61	3,34	7,19	4,11	0,75	7,42	2,71	11,63	4,22	0,00	11,31	4,65	9,44	6,14	0,43
Zn	12,96	3	15,2	4,19	0,01	15,76	3,38	16,35	5,8	0,99	14,7	5,3	15,76	4,89	0,06	14,67	2,33	13,48	4,81	0,35
Ga*	0,17	0,05	0,2	0,05	0,02	0,22	0,08	0,2	0,09	0,13	0,22	0,07	0,24	0,09	0,26	0,23	0,1	0,2	0,06	0,15

Tabela 4. Stężenie pierwiastków w prążkowi u samic w mg/kg (kontrola F – samice grupy kontrolnej, txJ F – samice txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Pierwiastek	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	82,88	102,19	110,52	97,66	0,20	86,40	43,95	120,80	53,85	0,14	111,79	42,88	101,62	75,17	0,96	115,47	55,16	118,53	772,09	0,89
Cr	0,56	0,51	2,08	2,50	0,03	1,15	1,03	0,62	0,53	0,08	0,47	0,25	0,41	0,27	0,47	0,52	1,05	1,07	1,03	0,28
Mn	0,35	0,16	0,54	0,19	0,03	0,40	0,26	0,42	0,21	0,53	0,35	0,17	0,41	0,14	0,27	0,31	0,13	0,40	0,29	0,28
Fe	18,92	4,71	31,82	13,65	0,10	34,82	13,31	21,70	10,97	0,04	35,30	10,82	29,71	10,98	0,81	40,70	12,66	38,36	14,12	0,42
Ni	0,79	1,90	2,33	1,93	0,17	1,70	1,17	1,51	0,87	0,50	2,74	2,93	1,31	1,41	0,23	1,95	0,99	2,58	8,92	0,79
Cu	5,03	1,73	4,79	2,31	0,61	7,21	3,26	6,79	2,21	0,89	8,57	2,60	10,36	2,63	0,02	9,82	3,57	8,99	7,57	0,89
Zn	13,58	1,72	13,28	4,67	0,70	14,61	3,75	17,37	3,58	0,47	15,00	6,45	15,76	3,72	0,19	14,74	1,87	12,83	10,29	0,59
Ga*	0,17	0,04	0,20	0,05	0,12	0,21	0,15	0,19	0,07	0,60	0,22	0,07	0,26	0,06	0,39	0,26	0,07	0,19	0,12	0,42

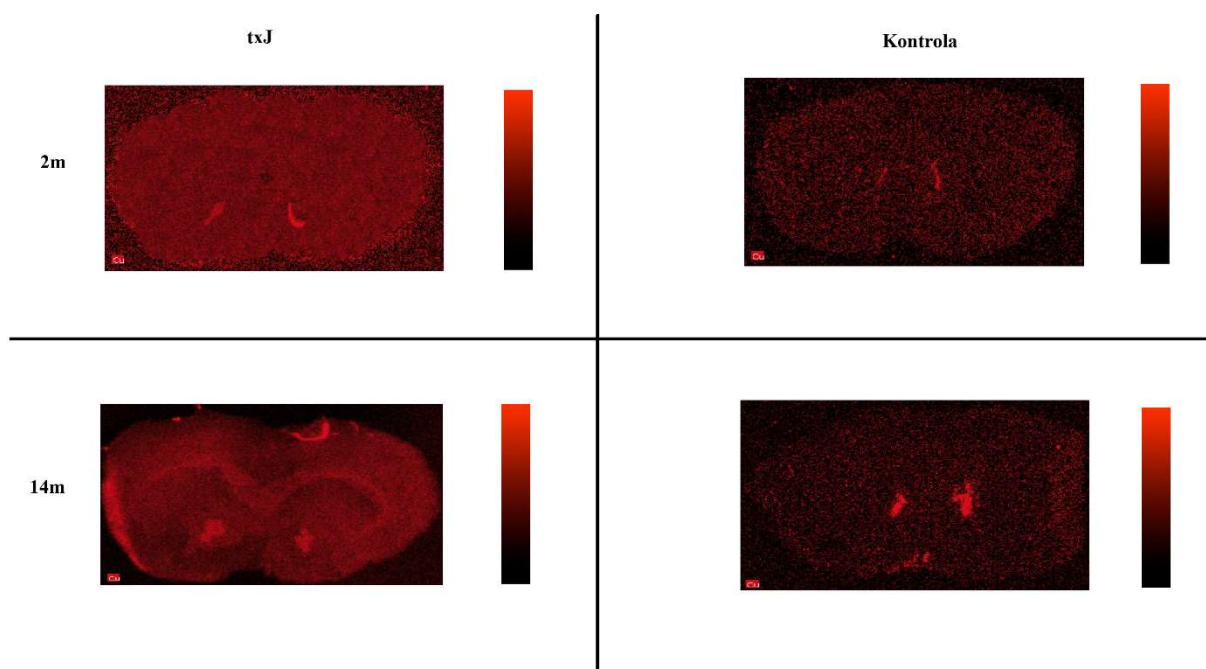
Tabela 5. Stężenie pierwiastków w prążkowi u samców w mg/kg (kontrola M – samce grupy kontrolnej, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Pierwiastek	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	55,34	24,97	176,78	73,96	0,02	121,85	64,71	109,23	72,55	0,60	73,38	29,74	122,85	83,58	0,01	134,68	111,20	140,54	100,60	0,58
Cr	1,38	1,08	0,85	1,86	0,69	0,64	0,51	1,11	2,01	0,60	1,57	0,55	0,69	0,32	0,05	0,51	0,35	1,75	1,76	0,01
Mn	0,29	0,06	0,48	0,17	0,01	0,34	0,14	0,43	0,06	0,11	0,28	0,14	0,49	0,48	0,09	0,28	0,13	0,31	0,68	0,61
Fe	27,18	11,30	23,87	27,56	0,95	28,71	14,64	28,33	11,54	0,60	41,38	12,33	43,24	36,41	0,71	37,20	17,89	42,30	28,03	0,94
Ni	1,75	1,02	3,03	3,83	0,33	1,82	3,99	2,06	1,11	0,86	1,83	0,63	2,45	6,05	0,27	2,64	3,03	2,17	5,05	1,00
Cu	4,05	0,95	4,40	3,81	0,45	7,61	3,29	8,14	3,21	0,86	7,20	1,72	13,15	11,23	0,00	12,68	6,01	9,90	6,78	0,30
Zn	11,52	3,78	15,39	3,70	0,02	16,01	2,07	15,05	5,80	0,43	14,06	4,72	16,81	6,67	0,23	14,50	3,80	14,13	5,15	0,34
Ga*	0,15	0,05	0,18	0,06	0,09	0,23	0,06	0,20	0,07	0,09	0,20	0,08	0,21	0,07	0,79	0,21	0,05	0,20	0,10	0,43

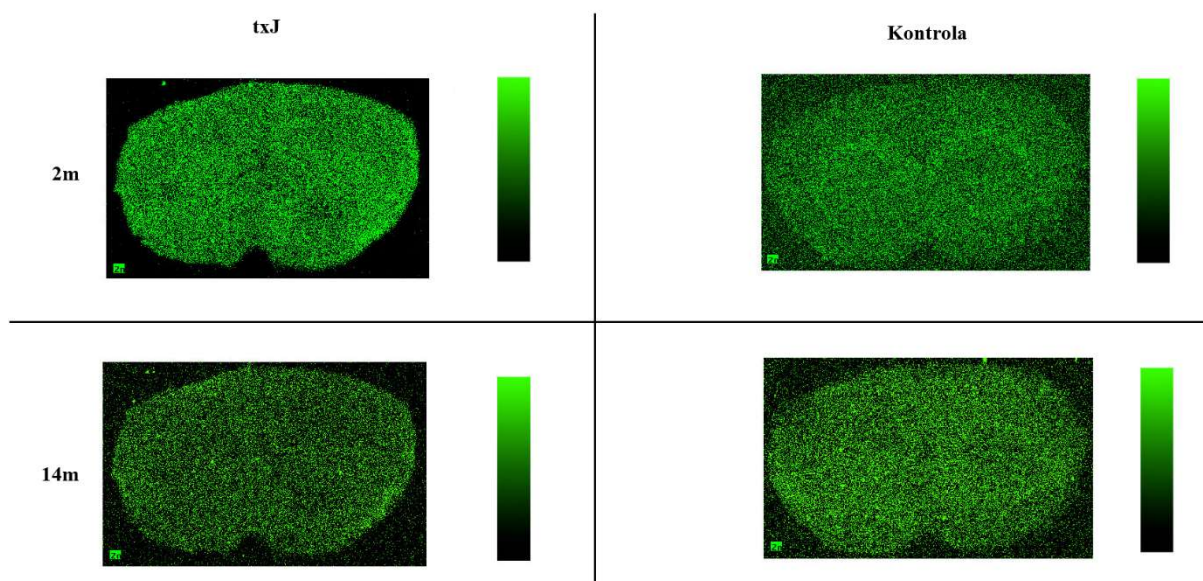
Tabela 6. Stężenie pierwiastków w prążkowi txJ w mg/kg w zależności od płci (txJ F – samice txJ, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Pierwiastek	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	110,52	97,66	176,78	73,96	0,37	120,80	53,85	109,23	72,55	0,79	101,62	75,17	122,85	83,58	0,47	118,53	772,09	140,54	100,60	0,47
Cr	2,08	2,50	0,85	1,86	0,44	0,62	0,53	1,11	2,01	0,16	0,41	0,27	0,69	0,32	0,19	1,07	1,03	1,75	1,76	0,19
Mn	0,54	0,19	0,48	0,17	0,70	0,42	0,21	0,43	0,06	0,86	0,41	0,14	0,49	0,48	0,41	0,40	0,29	0,31	0,68	0,41
Fe	31,82	13,65	23,87	27,56	0,70	21,70	10,97	28,33	11,54	0,29	29,71	10,98	43,24	36,41	0,27	38,36	14,12	42,30	28,03	0,27
Ni	2,33	1,93	3,03	3,83	0,94	1,51	0,87	2,06	1,11	0,08	1,31	1,41	2,45	6,05	0,19	2,58	8,92	2,17	5,05	0,19
Cu	4,79	2,31	4,40	3,81	1,00	6,79	2,21	8,14	3,21	0,43	10,36	2,63	13,15	11,23	0,31	8,99	7,57	9,90	6,78	0,31
Zn	13,28	4,67	15,39	3,70	0,20	17,37	3,58	15,05	5,80	0,72	15,76	3,72	16,81	6,67	0,74	12,83	10,29	14,13	5,15	0,74
Ga*	0,20	0,05	0,18	0,06	0,22	0,19	0,07	0,20	0,07	0,54	0,26	0,06	0,21	0,07	0,14	0,19	0,12	0,20	0,10	0,14

Na mapie 1 przedstawiono lokalizację miedzi w przekroju czołowym mózgu na poziomie prążkowania myszy 2- i 8-miesięcznych. Uwagę zwraca wyraźnie intensywniejszy sygnał na obu mapach wykonanych u txJ. Rozkład miedzi wydaje się jednorodny w obrębie całych przekrojów. Analogicznie na mapie 2 zobrazowano rozkład dla cynku. W przypadku tego pierwiastka stopień intensywności sygnału jest porównywalny pomiędzy grupami z dyskretnym wzmożeniem w populacji 2-miesięcznych txJ. Również w przypadku cynku dystrybucja wydaje się homogenna na całym przekroju.



Mapa 1. Rozkład przestrzenny miedzi wOUN na przekroju czołowym (txJ – grupa *Jackson toxic milk mouse*)

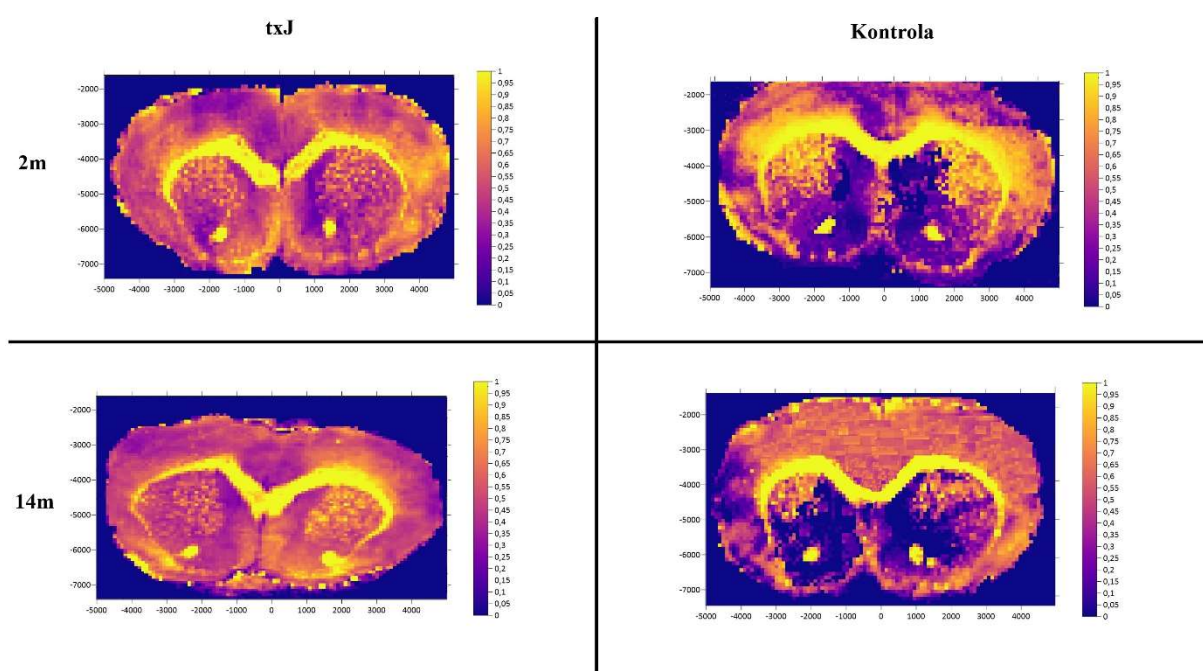


Mapa 2. Rozkład przestrzenny cynku w oun na przekroju czołowym (txJ – grupa *Jackson toxic milk mouse*)

Prążkowie – skład biochemiczny

W analizie zawartości białka na podstawie pomiarów Amid I można zauważyć, że we wszystkich grupach wiekowych zawartość białek w prążkowie txJ była niższa niż u myszy kontrolnych. Istotne różnice zaobserwowano w pomiarze prążkowie myszy 2-miesięcznych. Poziom białek u 14-miesięcznych txJ uległ niemal wyrównaniu do wartości zaobserwowane u kontroli. Jeśli zaś chodzi o aberracje struktury drugorzędowej, istotną statystycznie różnicę zaobserwowano w pomiarze Amid I max. i stosunku struktur β do α u 14-miesięcznych txJ. Również względna zawartość białka w stosunku do ogólnej zawartości cząsteczek w próbce prążkowie różniła się u myszy 8- i 14-miesięcznych. W przypadku txJ proporcja obniżyła się z 0,21 u 8-miesięcznych do 0,14 u 14-miesięcznych, zaś u myszy kontrolnych było odwrotnie – wzrosła odpowiednio z 0,16 do 0,18, przy czym p wynosiło 0,06 (tabela 7). Zaobserwowano zmianę względnej zawartości tłuszczów w stosunku do wszystkich biomolekuł badanej próbki prążkowie. W pomiarach wykonanych u myszy 2-, 4-, i 8-miesięcznych poziom był porównywalny między grupami. W obu grupach zaobserwowano wzrost proporcjonalnego udziału tłuszczów. W przypadku 14-miesięcznych txJ względny poziom tłuszczów obniżył się, osiągając istotnie niższą wartość w stosunku do grupy kontrolnej. Zaobserwowano istotnie wyższy poziom nasycenia łańcuchów lipidowych u 14-miesięcznych txJ (tabela 7). U 4-miesięcznych samic txJ w analizie struktury drugorzędowej białek stwierdzono istotnie niższy

stosunek form β do α , w porównaniu do samic kontrolnych. Względna zawartość białka w prążkowie 8-miesięcznych samic txJ była wyższa w porównaniu do samic kontrolnych. Nasylenie tłuszczów w prążkowie 8-miesięcznych samic txJ było niższe niż w populacji samic kontrolnych (tabela 8). W prążkowie 4- i 8-miesięcznych samców txJ poziom Amid I max. istotnie różnił się od samców kontrolnych. W pomiarach struktury drugorzędowej 4- i 8-miesięcznych samców txJ zaobserwowano istotnie niższy stosunek form β do α białek w porównaniu do samców kontrolnych. W prążkowie 8-miesięcznych samców txJ istotnie wyższy niż u samców kontrolnych był też względny poziom białka. Podobnie jak w przypadku samic poziom nasyconych tłuszczów w prążkowie 4- i 8-miesięcznych samców txJ był istotnie niższy (tabela 9). Nie odnotowano znaczących różnic w składzie biochemicznym prążkowie pomiędzy samcami a samicami txJ (tabela 10). Na mapie 3 zobrazowano rozmieszczenie aberracji struktury 2-rzędowej białek w przekroju czołowym mózgu. Zaobserwowano odchylenie obrazu w rzucie prążkowie i wzgórza txJ, gdzie wiódce były zaburzenia fałdowania białek z przewagą struktury β .



Mapa 3. Rozkład przestrzenny aberracji struktury drugorzędowej białek przedstawiony jako stosunek form β/α w ośn na przekroju czołowym (txJ – grupa *Jackson toxic milk mouse*)

Tabela 7. Skład biochemiczny prądkowia

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Amid I	1,68	1,97	0,78	1,49	0,04	1,39	1,51	0,89	1,55	0,84	1,75	1,08	1,23	1,46	0,95	1,15	1,98	1,11	1,56	0,85
Amid I max.	1652,21	5,30	1652,21	7,71	0,26	1652,21	2,89	1652,94	1,93	0,68	1652,21	2,41	1654,14	2,41	0,15	1653,90	2,41	1650,29	4,34	0,02
Pasmo 1730	0,25	0,36	0,25	0,56	0,69	0,18	0,19	0,17	0,24	0,89	0,22	0,16	0,21	0,13	0,92	0,19	0,17	0,14	0,06	0,21
Pasmo 2920	0,14	0,18	0,07	0,16	0,10	0,20	0,16	0,12	0,23	0,96	0,25	0,16	0,20	0,15	0,89	0,21	0,24	0,14	0,13	0,54
Pasmo 2990	0,04	0,04	0,03	0,03	0,14	0,04	0,03	0,02	0,04	0,99	0,05	0,03	0,03	0,04	0,97	0,04	0,05	0,03	0,03	0,96
Pasmo 3020	0,01	0,01	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,74	0,01	0,00	0,00	0,01	0,95	0,01	0,01	0,00	0,00	0,38
Fingerprint	12,17	9,16	9,66	11,02	0,24	7,59	10,14	5,58	5,99	0,99	9,87	7,74	5,68	9,99	0,65	7,00	9,89	7,47	8,95	0,33
Fosforany	0,34	0,62	0,33	0,45	0,42	0,38	0,46	0,47	0,55	0,67	0,52	0,24	0,44	0,64	0,68	0,47	0,54	0,24	0,35	0,30
Białka względnie	0,11	0,09	0,06	0,13	0,22	0,20	0,06	0,20	0,07	0,91	0,16	0,05	0,21	0,10	0,00	0,18	0,08	0,14	0,04	0,06
α helisa	0,05	0,05	0,03	0,03	0,17	0,04	0,04	0,03	0,05	0,86	0,06	0,03	0,04	0,04	0,84	0,04	0,05	0,04	0,04	0,85
β harmonijka	0,05	0,03	0,04	0,03	0,17	0,03	0,04	0,03	0,03	0,94	0,04	0,03	0,03	0,03	0,51	0,03	0,04	0,03	0,03	0,23
β harmonijka / α helisa	0,97	0,24	1,05	0,46	0,66	0,71	0,16	0,68	0,34	0,80	0,75	0,21	0,67	0,11	0,02	0,68	0,14	0,96	0,13	0,00
Tłuszcze / białka	0,85	0,31	0,94	0,59	0,83	0,89	0,10	0,85	0,16	0,19	0,87	0,14	0,86	0,19	0,65	0,97	0,26	0,93	0,25	0,47
Tłuszcze względnie	0,09	0,04	0,08	0,09	0,76	0,17	0,06	0,17	0,08	0,76	0,16	0,09	0,20	0,07	0,07	0,18	0,08	0,13	0,04	0,02
Tłuszcze utlenione	0,16	0,29	0,17	0,54	0,94	0,12	0,15	0,18	0,09	0,08	0,19	0,14	0,16	0,14	0,73	0,13	0,09	0,13	0,10	0,99
Tłuszcze nienasycone	0,03	0,02	0,03	0,05	0,51	0,02	0,01	0,02	0,02	0,47	0,02	0,01	0,02	0,01	0,73	0,03	0,01	0,02	0,01	0,68
Tłuszcze nasycone	0,24	0,08	0,24	0,25	0,75	0,18	0,06	0,19	0,05	0,94	0,19	0,05	0,18	0,02	0,06	0,18	0,02	0,24	0,03	0,00

Tabela 8. Skład biochemiczny prążkowania u samic (kontrola F – samice grupy kontrolnej, txJ F – samice txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Amid I	0,73	1,50	0,79	1,09	0,67	1,17	1,31	1,98	1,55	0,16	1,16	1,27	1,05	1,46	0,96	1,11	2,45	2,44	1,74	0,68
Amid I max.	1649,08	6,27	1652,21	18,32	0,77	1652,21	2,41	1654,14	0,96	0,09	1654,14	2,41	1654,14	2,41	0,73	1649,08	18,32	1652,21	0,48	0,22
Pasmo 1730	0,29	0,15	0,22	0,30	0,67	0,17	0,08	0,23	0,19	0,19	0,27	0,08	0,21	0,06	0,14	0,13	0,27	0,07	0,07	0,61
Pasmo 2920	0,11	0,18	0,07	0,15	0,44	0,11	0,12	0,30	0,21	0,09	0,20	0,15	0,19	0,15	0,67	0,00	0,09	0,06	0,08	0,88
Pasmo 2990	0,02	0,03	0,03	0,02	0,80	0,03	0,03	0,05	0,04	0,16	0,03	0,03	0,03	0,04	0,96	0,01	0,05	0,04	0,03	0,54
Pasmo 3020	0,00	0,01	0,00	0,00	0,93	0,00	0,00	0,01	0,00	0,06	0,01	0,00	0,00	0,01	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
Fingerprint	10,06	4,56	7,42	8,84	0,44	7,26	5,37	8,94	5,86	0,43	6,04	6,39	4,42	10,40	0,74	10,40	10,17	15,21	12,16	0,68
Fosforany	0,38	0,60	0,32	0,30	0,67	0,26	0,37	0,56	0,17	0,01	0,56	0,29	0,44	0,65	0,60	0,44	0,88	0,76	0,37	0,68
Białka względnie	0,07	0,08	0,09	0,11	0,67	0,18	0,06	0,21	0,02	0,09	0,18	0,06	0,25	0,12	0,03	0,15	0,09	0,14	0,03	0,75
α helisa	0,03	0,03	0,03	0,02	0,93	0,04	0,04	0,06	0,04	0,25	0,04	0,03	0,04	0,04	0,96	0,04	0,06	0,07	0,04	0,49
β harmonijka	0,03	0,02	0,03	0,02	0,80	0,03	0,03	0,04	0,03	0,60	0,03	0,03	0,02	0,03	0,96	0,04	0,05	0,06	0,03	0,55
β harmonijka / α helisa	1,09	0,27	1,11	0,50	0,80	0,81	0,17	0,66	0,03	0,01	0,65	0,10	0,67	0,12	0,96	1,07	0,29	1,03	0,04	0,55
Tłuszcze / białka	1,01	0,33	1,00	0,63	0,93	0,90	0,08	0,87	0,08	0,72	0,96	0,23	0,86	0,09	0,14	0,27	0,32	0,23	0,22	0,89
Tłuszcze względnie	0,08	0,06	0,08	0,09	0,67	0,15	0,07	0,19	0,03	0,33	0,20	0,05	0,22	0,13	0,74	0,03	0,07	0,03	0,03	0,96
Tłuszcze utlenione	0,33	0,52	0,15	0,23	0,30	0,11	0,15	0,19	0,12	0,06	0,21	0,15	0,16	0,08	0,53	0,04	0,17	0,13	2,37	0,21
Tłuszcze nienasycone	0,02	0,02	0,03	0,05	0,27	0,02	0,01	0,02	0,01	0,33	0,03	0,00	0,02	0,01	0,31	0,03	0,05	0,02	0,01	0,89
Tłuszcze nasycone	0,22	0,03	0,24	0,24	0,93	0,22	0,05	0,18	0,01	0,02	0,17	0,02	0,18	0,02	0,67	0,14	0,42	0,48	0,55	0,54

Tabela 9. Skład biochemiczny prążkowania u samców (kontrola M – samce grupy kontrolnej, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Amid I	1,97	2,07	0,61	1,64	0,07	1,62	1,80	0,71	0,51	0,48	2,08	1,06	1,57	1,45	0,74	2,18	2,64	1,56	2,52	0,97
Amid I max.	1652,21	3,62	1652,21	7,23	0,35	1654,62	2,89	1652,21	5,30	0,05	1651,73	0,48	1654,14	2,41	0,02	1651,73	5,79	1651,97	11,81	0,90
Pasmo 1730	0,21	0,51	0,30	0,73	0,32	0,19	0,21	0,06	0,07	0,16	0,13	0,11	0,22	0,19	0,19	0,09	0,27	0,10	0,10	0,48
Pasmo 2920	0,17	0,17	0,05	0,17	0,34	0,22	0,23	0,07	0,08	0,25	0,25	0,17	0,23	0,19	0,60	0,03	0,27	0,00	0,09	0,37
Pasmo 2990	0,04	0,05	0,03	0,05	0,27	0,04	0,04	0,02	0,01	0,43	0,05	0,03	0,05	0,04	0,96	0,03	0,07	0,02	0,05	0,68
Pasmo 3020	0,01	0,01	0,00	0,01	0,23	0,01	0,01	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,01	0,01	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77
Fingerprint	12,77	22,22	13,16	14,37	0,32	7,92	10,17	4,11	2,53	0,54	11,73	6,25	11,01	9,75	0,60	13,87	13,19	12,69	17,30	0,90
Fosforany	0,34	1,13	0,47	0,68	0,79	0,49	0,53	0,04	0,28	0,11	0,52	0,31	0,56	0,59	0,36	0,68	1,13	0,50	0,86	0,59
Białka względnie	0,14	0,07	0,05	0,13	0,27	0,20	0,02	0,16	0,05	0,11	0,16	0,03	0,20	0,04	0,03	0,14	0,05	0,15	0,04	0,97
α helisa	0,06	0,06	0,04	0,05	0,23	0,04	0,05	0,02	0,02	0,54	0,06	0,02	0,05	0,04	0,81	0,07	0,07	0,04	0,06	0,97
β harmonijka	0,05	0,05	0,04	0,04	0,32	0,03	0,04	0,02	0,01	0,66	0,05	0,02	0,03	0,03	0,27	0,07	0,07	0,05	0,06	0,97
β harmonijka / α helisa	0,91	0,14	0,95	0,41	0,96	0,68	0,06	0,99	0,33	0,02	0,86	0,05	0,68	0,08	0,00	1,02	0,17	1,00	0,17	0,54
Tłuszcze / białka	0,76	0,25	0,94	1,23	0,77	0,88	0,08	0,76	0,16	0,11	0,87	0,05	0,90	0,23	0,41	0,22	0,51	0,08	0,24	0,51
Tłuszcze względnie	0,09	0,04	0,10	0,09	0,71	0,17	0,00	0,12	0,07	0,13	0,12	0,03	0,17	0,04	0,01	0,03	0,09	0,01	0,04	0,58
Tłuszcze utlenione	0,16	0,11	0,56	0,86	0,37	0,13	0,10	0,16	0,07	0,48	0,12	0,12	0,15	0,15	0,31	0,12	0,26	0,03	0,13	0,42
Tłuszcze nienasycone	0,03	0,01	0,03	0,05	0,91	0,03	0,01	0,02	0,02	0,76	0,02	0,01	0,02	0,01	0,89	0,02	0,04	0,04	0,04	0,30
Tłuszcze nasycone	0,27	0,07	0,24	0,24	0,91	0,18	0,00	0,23	0,08	0,02	0,23	0,08	0,18	0,02	0,00	0,18	0,31	0,06	0,58	0,76

Tabela 10. Skład biochemiczny prążkowania txJ w zależności od płci (txJ F – samice txJ, txJ M – samce txJ)

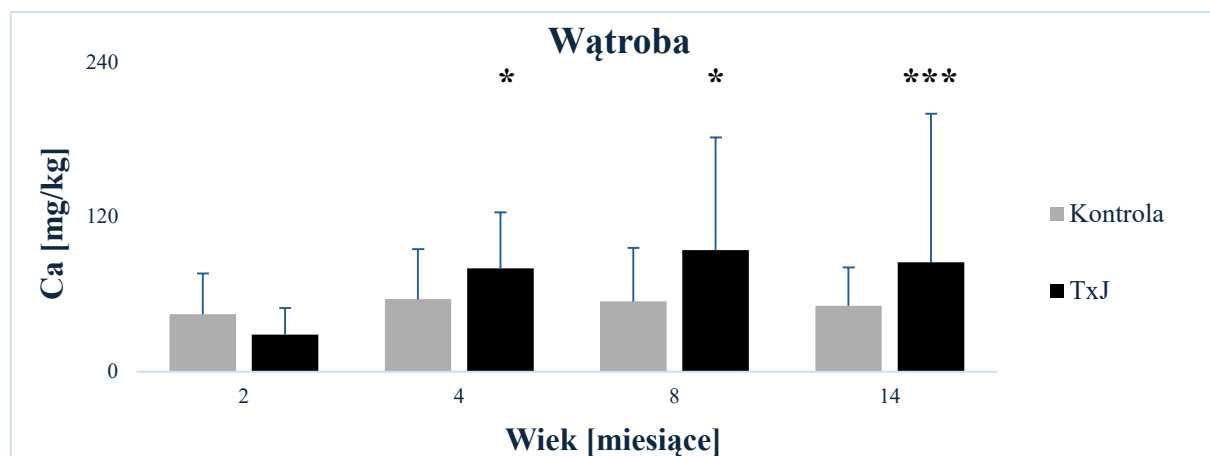
Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Amid I	0,79	1,09	0,61	1,64	0,87	1,98	1,55	0,71	0,51	0,16	1,05	1,46	2,08	1,06	0,81	2,44	1,74	1,56	2,52	0,83
Amid I max.	1652,21	18,32	1652,21	7,23	0,47	1654,14	0,96	1652,21	5,30	0,01	1654,14	2,41	1651,73	0,48	0,77	1652,21	0,48	1651,97	11,81	0,44
Pasmo 1730	0,22	0,30	0,30	0,73	0,32	0,23	0,19	0,06	0,07	0,01	0,21	0,06	0,13	0,11	0,96	0,07	0,07	0,10	0,10	0,94
Pasmo 2920	0,07	0,15	0,05	0,17	0,96	0,30	0,21	0,07	0,08	0,03	0,19	0,15	0,25	0,17	0,74	0,06	0,08	0,00	0,09	0,69
Pasmo 2990	0,03	0,02	0,03	0,05	0,56	0,05	0,04	0,02	0,01	0,13	0,03	0,04	0,05	0,03	0,67	0,04	0,03	0,02	0,05	0,94
Pasmo 3020	0,00	0,00	0,00	0,01	0,96	0,01	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,01	0,00	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58
Fingerprint	7,42	8,84	13,16	14,37	0,67	8,94	5,86	4,11	2,53	0,19	4,42	10,40	11,73	6,25	0,40	15,21	12,16	12,69	17,30	0,83
Fosforany	0,32	0,30	0,47	0,68	0,23	0,56	0,17	0,04	0,28	0,01	0,44	0,65	0,52	0,31	0,53	0,76	0,37	0,50	0,86	0,94
Białka względnie	0,09	0,11	0,05	0,13	0,37	0,21	0,02	0,16	0,05	0,13	0,25	0,12	0,16	0,03	0,11	0,14	0,03	0,15	0,04	0,83
α helisa	0,03	0,02	0,04	0,05	0,32	0,06	0,04	0,02	0,02	0,13	0,04	0,04	0,06	0,02	0,96	0,07	0,04	0,04	0,06	0,94
β harmonijka	0,03	0,02	0,04	0,04	0,49	0,04	0,03	0,02	0,01	0,48	0,02	0,03	0,05	0,02	0,96	0,06	0,03	0,05	0,06	0,94
β harmonijka / α helisa	1,11	0,50	0,95	0,41	0,43	0,66	0,03	0,99	0,33	0,02	0,67	0,12	0,86	0,05	0,89	1,03	0,04	1,00	0,17	0,94
Tłuszcze / białka	1,00	0,63	0,94	1,23	0,68	0,87	0,08	0,76	0,16	0,13	0,86	0,09	0,87	0,05	0,36	0,23	0,22	0,08	0,24	0,41
Tłuszcze względnie	0,08	0,09	0,10	0,09	0,79	0,19	0,03	0,12	0,07	0,19	0,22	0,13	0,12	0,03	0,24	0,03	0,03	0,01	0,04	0,62
Tłuszcze utlenione	0,15	0,23	0,56	0,86	0,16	0,19	0,12	0,16	0,07	0,38	0,16	0,08	0,12	0,12	0,89	0,13	2,37	0,03	0,13	0,14
Tłuszcze nienasycone	0,03	0,05	0,03	0,05	1,00	0,02	0,01	0,02	0,02	0,93	0,02	0,01	0,02	0,01	0,74	0,02	0,01	0,04	0,04	0,27
Tłuszcze nasycone	0,24	0,24	0,24	0,24	0,82	0,18	0,01	0,23	0,08	0,00	0,18	0,02	0,23	0,08	0,74	0,48	0,55	0,06	0,58	0,82

Stężenie neurofilamentów

Stężenie neurofilamentów było wyższe w populacji txJ we wszystkich grupach wiekowych. Istotną różnicę zaobserwowano u myszy 4. i 14. miesięcznych (tabela 31). Nie zaobserwowano różnic między płciami w obrębie populacji txJ (tabela 34).

Wątroba – skład pierwiastkowy

Stężenie wapnia w wątrobie 2-miesięcznych txJ było niższe niż w grupie kontrolnej. W populacji txJ zaobserwowano wzrastające wartości stężenia w pomiarach kolejno u 4- i 8-miesięcznych myszy, osiągające wartość maksymalną u myszy 8-miesięcznych. U 14-miesięcznych txJ wartość była porównywalna ze zbadaną u 8-miesięcznych mutantów. Stężenia u 4-, 8-, i 14-miesięcznych txJ były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej (wykres 8). W populacji kontrolnej stężenie wapnia w wątrobie utrzymywało się na podobnym poziomie u myszy 2-, 4-, 8-, i 14-miesięcznych (tabela 11). Stężenie wapnia zbadane w wątrobie u 14-miesięcznych samic txJ było istotnie wyższe niż w populacji samców txJ. W pozostałych grupach wiekowych nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy płciami w obrębie populacji txJ (tabela 14).

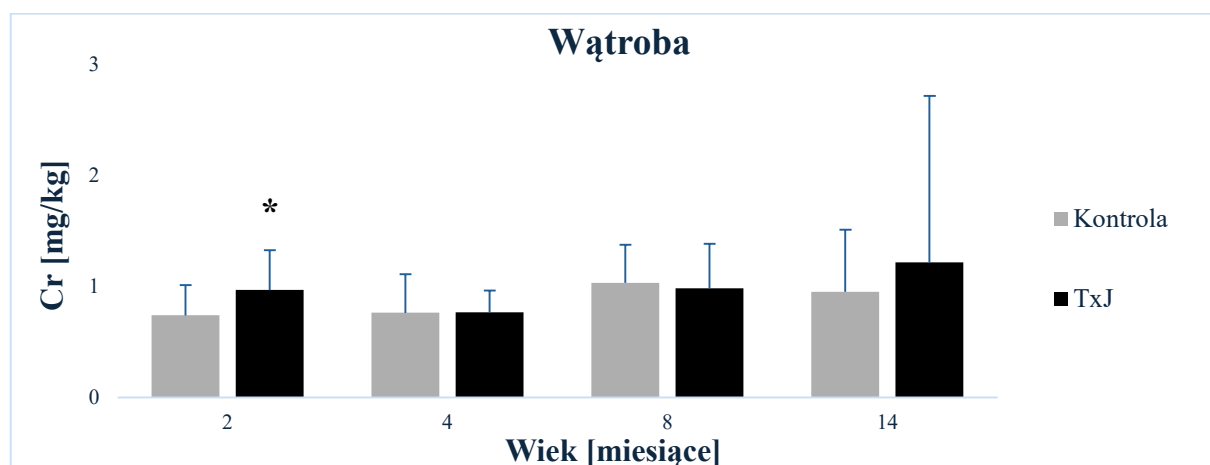


Wykres 8. Stężenie wapnia w wątrobie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie chromu w populacji 2- i 14-miesięcznych txJ było wyższe niż w grupie kontrolnej (wykres 9). Istotną statystycznie różnicę zaobserwowano pomiędzy grupami tylko wśród myszy 2-miesięcznych w populacji ogólnej i w wyodrębnionej populacji samic (tabele 11 i 12). W grupie składającej się z 14-miesięcznych txJ zaobserwowano istotną różnicę

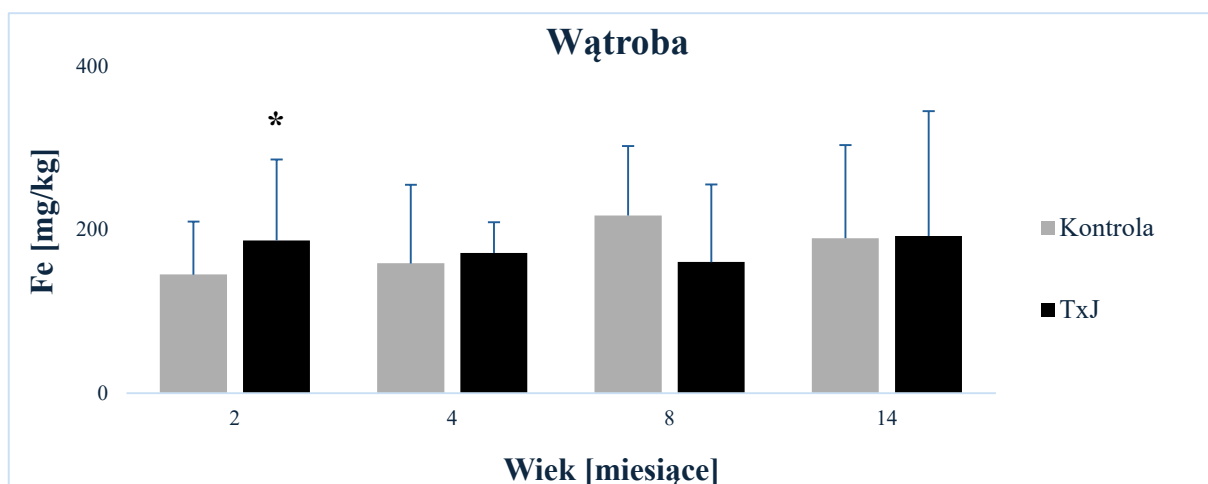
między stężeniem chromu w wątrobie u samic i samców, przy czym stężenie chromu u samic było ponad dwukrotnie wyższe (tabela 14).



Wykres 9. Stężenie chromu w wątrobie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

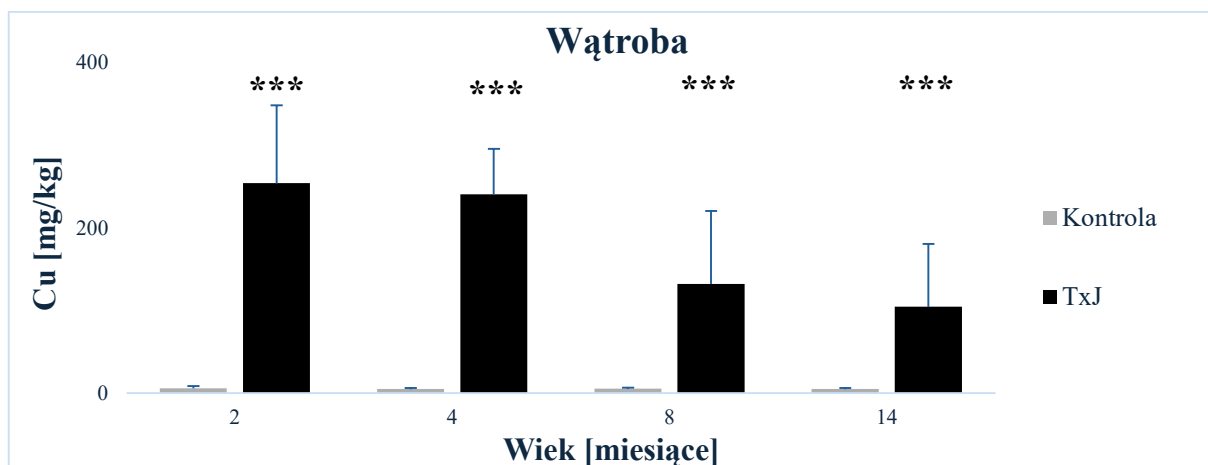
W wątrobie 2-miesięcznych txJ stężenie żelaza było istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej i w przypadku myszy 4- i 8-miesięcznych miało tendencję spadkową. Odwrotna sytuacja wystąpiła w przypadku myszy kontrolnych, u których stężenie żelaza wzrastało w czasie, osiągając maksimum w populacji 8-miesięcznych kontroli. U 14-miesięcznych myszy stężenie żelaza w wątrobie było niemal identyczne w obu grupach (wykres 10). W analizie przeprowadzonej w populacji samic istotne różnice odnotowano również w wątrobach u 4-miesięcznych txJ gdzie stężenie żelaza było znacząco niższe niż w populacji samic kontrolnych (tabela 12). U 4-miesięcznych samców txJ stężenie żelaza w wątrobie było istotnie wyższe w porównaniu z populacją samców kontrolnych (tabela 13). Przy czym było ono wyższe od tego odnotowanego u 2-miesięcznych samców txJ. U 2-miesięcznych txJ zaobserwowano istotnie wyższe stężenie żelaza w wątrobie samic w porównaniu z samcami (tabela 14).



Wykres 10. Stężenie żelaza w wątrobie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie miedzi w wątrobie było istotnie wyższe u txJ we wszystkich pomiarach w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 11). Zaobserwowano trend spadkowy. Analiza przeprowadzona po wyodrębnieniu każdej z płci nie wykazała odstępstw od sytuacji zaobserwowanej dla ogółu (tabele 12 i 13). W przypadku porównania samic i samców txJ zaobserwowano istotne różnice u myszy 2- i 4-miesięcznych. Stężenie miedzi było istotnie wyższe w wątrobie w przypadku samic txJ. W pomiarach u 8- i 14-miesięcznych txJ stężenie miedzi było porównywalne u obu płci (tabela 14).

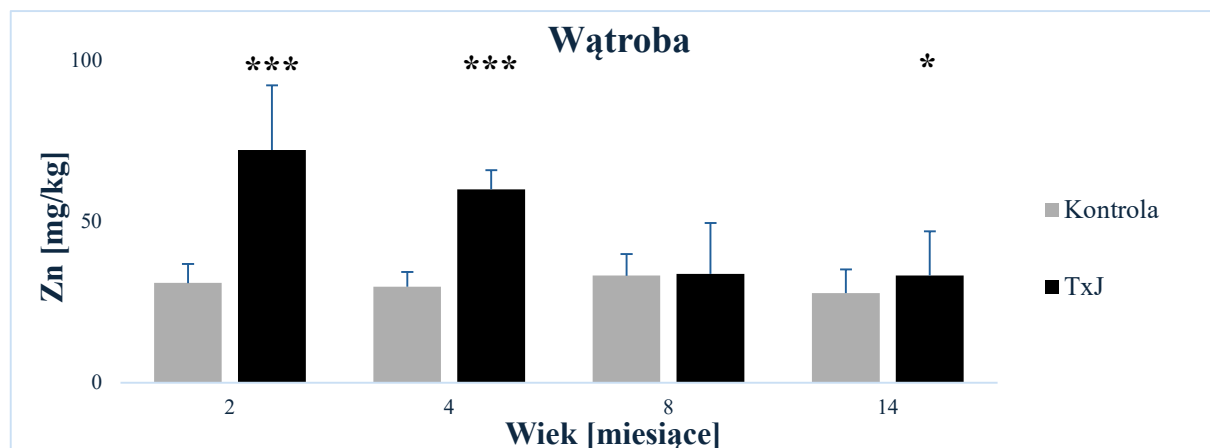


Wykres 11. Stężenie miedzi w wątrobie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie cynku było istotnie wyższe w wątrobie u 2-, 4-, i 14-miesięcznych txJ względem grupy kontrolnej (wykres 12). Wartości obserwowane u myszy kontrolnych utrzymywały się na porównywalnym poziomie w pomiarach u 2-, 4-, 8- i 14-miesięcznych

osobników (tabela 11). Stężenie cynku w wątrobie 2- i 4-miesięcznych samic txJ było istotnie wyższe niż w populacji samic kontrolnych. Podobnie kształtowały się wyniki otrzymane w pomiarach wykonanych u samców txJ w porównaniu samców do kontrolnych. Stężenie cynku w wątrobie 2-miesięcznych samic txJ było istotnie wyższe niż u samców txJ.



Wykres 12. Stężenie cynku w wątrobie (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Wątroba – skład organiczny

Zawartość białka w wątrobie 4-, 8- i 14-miesięcznych myszy nie różniła się pomiędzy grupami. Zaobserwowano zaburzenie struktury drugorzędowej białek we wszystkich grupach wiekowych. Odchylenie pasma Amid I max. od wartości 1655 cm^{-1} w populacji txJ odpowiada nieprawidłowości w budowie i fałdowaniu białek. Wyniki wskazują na istotną różnicę jakościową w zmianie stosunku struktur β/α . W pasmie 1730 cm^{-1} również zauważalne były różnice we wszystkich grupach wiekowych.

U dwumiesięcznych txJ zawartość estrów przewyższała tę obserwowaną u myszy kontrolnych. W kolejnych pomiarach wartości obserwowane w populacji txJ były istotnie niższe.

Stwierdzono istotnie wyższy poziom utlenionych lipidów w grupie 4-, 8- i 14-miesięcznych txJ przy zachowanej na porównywalnym poziomie u obu grup bezwzględnej zawartości tłuszczów w wątrobie. Pomimo wyraźnych zmian charakterystyki względny stosunek struktur białkowych do lipidowych pozostawał na porównywalnym poziomie w obu grupach (tabela 15).

Nasycenie tłuszczów w wątrobie txJ było istotnie wyższe we wszystkich dokonanych pomiarach (tabela 15). Analogiczna sytuacja występowała u każdej z płci z osobna (tabele 16 i 17).

Nie zaobserwowano różnic w składzie molekularnym wątroby w żadnym punkcie czasowym pomiędzy płciami w obrębie populacji txJ (tabela 18).

Tabela 11. Stężenie pierwiastków w wątrobie w mg/kg

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Pierwiastek	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	44,61	31,67	28,83	20,49	0,23	56,21	38,86	79,97	43,71	0,02	54,50	41,52	94,18	87,42	0,04	51,15	29,83	84,87	115,14	0,00
Cr	0,74	0,28	0,97	0,36	0,05	0,76	0,35	0,77	0,20	0,73	1,03	0,34	0,98	0,40	0,55	0,95	0,56	1,22	1,50	0,31
Fe	145,22	65,02	186,81	99,20	0,05	158,88	96,47	171,57	37,93	0,85	217,56	85,18	160,43	95,08	0,08	189,63	114,12	192,34	152,86	0,19
Cu	5,89	2,92	254,32	94,53	0,00	4,95	1,56	240,96	55,03	0,00	5,43	1,20	132,40	88,58	0,00	4,86	1,54	104,57	76,30	0,00
Zn	30,92	5,94	72,23	20,06	0,00	29,77	4,60	59,99	5,96	0,00	33,17	6,75	33,72	15,84	0,23	27,77	7,38	33,22	13,72	0,04
Ga*	248,18	75,33	128,20	16,81	0,00	257,70	144,05	235,67	36,32	0,42	255,80	135,00	220,32	49,98	0,02	255,60	100,70	264,60	168,30	0,84

Tabela 12. Stężenie pierwiastków w wątrobie u samic w mg/kg (kontrola F – samice grupy kontrolnej, txJ F – samice txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Pierwiastek	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	42,10	34,68	28,52	22,36	0,75	42,32	53,38	67,01	43,71	0,11	78,84	77,31	84,61	51,28	0,79	56,95	38,65	199,87	100,12	0,01
Cr	0,73	0,18	0,97	0,14	0,00	0,95	0,44	0,77	0,20	0,19	1,07	0,25	1,09	0,63	0,79	1,10	0,98	2,35	0,74	0,11
Fe	178,24	26,80	223,44	52,36	0,01	232,54	53,19	171,33	61,10	0,04	267,25	89,81	231,58	121,07	0,19	244,28	147,66	340,00	262,06	0,21
Cu	5,90	2,36	290,17	23,06	0,00	5,13	1,85	263,31	54,63	0,00	5,28	1,38	105,93	112,22	0,00	4,86	1,11	109,92	28,17	0,00
Zn	33,05	3,95	79,57	8,66	0,00	27,84	5,75	60,97	7,78	0,00	27,14	4,86	32,22	18,17	0,13	24,67	7,61	32,00	17,27	0,26
Ga*	265,96	100,94	128,20	18,88	0,00	193,83	182,45	222,20	28,54	0,74	249,25	138,67	220,32	33,39	0,64	255,60	141,90	405,60	222,40	0,31

Tabela 13. Stężenie pierwiastków w wątrobie u samców w mg/kg(kontrola M – samce grupy kontrolnej, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Pierwiastek	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	48,45	28,66	29,14	10,84	0,33	59,67	21,60	80,22	28,76	0,09	49,89	22,79	122,48	118,18	0,03	44,36	22,22	68,34	29,07	0,01
Cr	0,83	0,46	0,85	0,69	0,89	0,62	0,29	0,77	0,10	0,05	0,84	0,39	0,90	0,31	0,96	0,88	0,34	1,10	0,63	0,46
Fe	108,61	39,37	131,17	77,88	0,79	136,07	28,98	171,81	22,74	0,01	173,29	23,10	142,56	39,58	0,14	146,00	78,14	171,25	74,16	0,18
Cu	5,52	2,72	195,64	30,61	0,01	4,84	1,30	212,36	35,34	0,00	5,43	1,47	139,31	57,43	0,00	5,12	1,88	98,35	111,70	0,00
Zn	29,15	4,69	59,76	11,81	0,01	32,24	9,14	57,33	7,41	0,00	33,60	5,52	35,38	13,39	0,74	28,63	5,68	34,38	18,31	0,15
Ga*	230,40	59,25	128,20	14,13	0,00	266,95	68,28	249,37	37,40	0,31	268,10	127,10	225,22	80,24	0,05	246,45	83,22	240,15	127,60	0,56

Tabela 14. Stężenie pierwiastków w wątrobie txJ w zależności od płci w mg/kg (txJ F – samice txJ, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Pierwiastek	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	28,52	22,36	29,14	10,84	0,79	67,01	43,71	80,22	28,76	0,79	84,61	51,28	122,48	118,18	0,56	199,87	100,12	68,34	29,07	0,01
Cr	0,97	0,14	0,85	0,69	0,51	0,77	0,20	0,77	0,10	0,93	1,09	0,63	0,90	0,31	0,23	2,35	0,74	1,10	0,63	0,03
Fe	223,44	52,36	131,17	77,88	0,01	171,33	61,10	171,81	22,74	0,60	231,58	121,07	142,56	39,58	0,13	340,00	262,06	171,25	74,16	0,16
Cu	290,17	23,06	195,64	30,61	0,00	263,31	54,63	212,36	35,34	0,01	105,93	112,22	139,31	57,43	0,71	109,92	28,17	98,35	111,70	0,94
Zn	79,57	8,66	59,76	11,81	0,01	60,97	7,78	57,33	7,41	0,05	32,22	18,17	35,38	13,39	0,87	32,00	17,27	34,38	18,31	0,61
Ga*	128,20	18,88	128,20	14,13	0,72	222,20	28,54	249,37	37,40	0,03	220,32	33,39	225,22	80,24	0,53	405,60	222,40	240,15	127,60	0,07

Tabela 15. Skład biochemiczny wątroby

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Amid I	1,82	1,67	1,28	1,24	0,56	1,08	1,77	1,84	1,83	0,05	1,90	2,72	2,51	1,67	0,09	1,45	2,39	1,71	2,59	0,62
Amid I max.	1653,43	17,84	1640,40	22,18	0,01	1652,34	28,44	1649,97	4,82	0,01	1653,87	18,80	1649,21	0,48	0,04	1651,73	17,84	1648,21	5,79	0,04
Pasmo 1730	0,19	0,10	0,34	0,16	0,01	0,27	0,25	0,11	0,08	0,00	0,21	0,23	0,11	0,10	0,02	0,22	0,27	0,08	0,09	0,04
Pasmo 2920	0,00	0,07	0,00	0,00	0,31	0,00	0,06	0,00	0,07	0,79	0,00	0,12	0,04	0,13	0,40	0,00	0,13	0,00	0,08	0,65
Pasmo 2990	0,02	0,03	0,02	0,02	0,96	0,01	0,03	0,02	0,03	0,19	0,02	0,06	0,03	0,03	0,60	0,01	0,05	0,03	0,04	0,78
Pasmo 3020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
Fingerprint	13,37	12,98	12,98	7,13	0,68	8,12	14,11	14,37	8,05	0,02	13,55	17,81	16,88	7,95	0,70	12,24	11,65	15,21	13,79	0,72
Fosforany	0,45	0,61	0,58	0,58	0,89	0,51	0,77	0,70	0,59	0,21	0,75	1,27	0,65	0,27	0,51	0,59	0,82	0,54	0,75	0,98
α helisa	0,05	0,04	0,05	0,03	0,93	0,03	0,04	0,05	0,05	0,06	0,06	0,09	0,07	0,04	0,43	0,04	0,06	0,05	0,06	0,56
β harmonijka	0,05	0,04	0,05	0,02	0,75	0,03	0,04	0,05	0,04	0,12	0,06	0,08	0,06	0,03	0,70	0,04	0,05	0,05	0,05	0,56
β harmonijka / α helisa	1,08	0,18	1,07	0,18	0,83	1,03	0,30	0,95	0,16	0,00	1,02	0,27	0,93	0,07	0,00	1,02	0,27	0,99	0,12	0,01
Białka względnie	0,13	0,06	0,09	0,05	0,05	0,14	0,08	0,14	0,04	0,56	0,13	0,06	0,15	0,02	0,32	0,15	0,06	0,15	0,04	0,88
Tłuszcze / białka	0,10	0,32	0,00	0,14	0,24	0,37	0,59	0,09	0,26	0,03	0,28	0,45	0,22	0,21	0,55	0,23	0,41	0,15	0,24	0,47
Tłuszcze	0,03	0,02	0,06	0,07	0,06	0,09	0,07	0,10	0,08	0,09	0,29	0,59	0,47	0,88	0,22	0,19	1,43	0,13	0,89	0,87
Tłuszcze względnie	0,00	0,04	0,00	0,02	0,40	0,03	0,07	0,01	0,04	0,27	0,05	0,07	0,03	0,03	0,46	0,03	0,08	0,02	0,04	0,61
Tłuszcze utlenione	0,03	0,23	0,11	0,13	0,04	0,05	0,14	0,16	0,15	0,03	0,06	0,02	0,17	0,11	0,04	0,09	0,19	0,19	0,14	0,03
Tłuszcze nienasycone	0,03	0,04	0,07	0,10	0,17	0,03	0,01	0,03	0,05	0,90	0,03	0,03	0,03	0,06	0,78	0,03	0,05	0,04	0,03	0,50
Tłuszcze nasycone	0,09	0,07	0,34	0,26	0,01	0,11	0,05	0,21	0,08	0,00	0,11	0,13	0,27	0,10	0,00	0,18	0,07	0,32	0,09	0,00

Tabela 16. Skład biochemiczny wątroby u samic (kontrola F – samice grupy kontrolnej, txJ F – samice txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Amid I	1,54	2,22	1,27	0,91	0,81	1,44	2,07	2,35	1,70	0,13	2,64	2,34	2,50	1,33	0,96	1,11	2,45	2,44	1,74	0,68
Amid I max.	1653,92	1,76	1646,43	2,01	0,01	1653,43	13,14	1648,73	5,30	0,05	1653,36	3,30	1650,21	2,41	0,01	1654,08	18,32	1648,21	0,48	0,02
Pasmo 1730	0,23	0,07	0,27	0,16	0,31	0,19	0,23	0,11	0,05	0,01	0,35	0,20	0,09	0,06	0,01	0,13	0,09	0,07	0,07	0,61
Pasmo 2920	0,00	0,04	0,00	0,00	0,75	0,02	0,06	0,02	0,09	0,93	0,12	0,18	0,09	0,12	0,75	0,00	0,09	0,06	0,08	0,88
Pasmo 2990	0,03	0,05	0,02	0,01	0,59	0,02	0,03	0,04	0,02	0,21	0,05	0,05	0,04	0,03	0,35	0,01	0,05	0,04	0,03	0,54
Pasmo 3020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,01	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
Fingerprint	15,55	16,99	12,15	6,97	0,53	10,03	14,62	15,91	9,68	0,08	21,30	14,84	16,57	7,62	0,29	10,40	10,17	15,21	12,16	0,68
Fosforany	0,25	0,61	0,41	0,57	0,70	0,56	0,76	0,75	0,47	0,19	1,04	0,77	0,66	0,34	0,16	0,44	0,88	0,76	0,37	0,68
Białka względnie	0,09	0,07	0,09	0,07	0,74	0,17	0,07	0,13	0,03	0,11	0,15	0,06	0,15	0,01	0,66	0,15	0,09	0,14	0,03	0,75
α helisa	0,05	0,06	0,04	0,02	0,74	0,04	0,04	0,06	0,03	0,08	0,08	0,07	0,07	0,03	0,60	0,04	0,06	0,07	0,04	0,49
β harmonijka	0,06	0,06	0,04	0,01	0,47	0,04	0,04	0,06	0,03	0,19	0,08	0,06	0,07	0,03	0,33	0,04	0,05	0,06	0,03	0,55
β harmonijka / α helisa	1,12	0,30	1,10	0,33	0,81	1,03	0,30	0,98	0,09	0,04	1,00	0,04	0,93	0,03	0,02	1,07	0,29	1,03	0,04	0,55
Tłuszcze / białka	0,12	0,27	0,00	0,07	0,22	0,32	0,44	0,16	0,20	0,23	0,41	0,36	0,30	0,23	0,25	0,27	0,32	0,23	0,22	0,89
Tłuszcze względnie	0,01	0,02	0,00	0,01	0,42	0,04	0,08	0,02	0,03	0,48	0,06	0,05	0,04	0,04	0,13	0,03	0,07	0,03	0,03	0,96
Tłuszcze utlenione	0,11	0,52	0,00	0,51	0,63	0,09	0,24	0,18	0,06	0,72	0,17	0,16	0,16	0,15	0,59	0,04	0,17	0,13	2,37	0,21
Tłuszcze nienasycone	0,06	0,09	0,08	0,11	0,63	0,03	0,01	0,04	0,05	0,66	0,03	0,02	0,01	0,03	0,29	0,03	0,05	0,02	0,01	0,89
Tłuszcze nasycone	0,01	0,06	0,29	0,15	0,02	0,12	0,07	0,11	0,09	0,03	0,09	0,04	0,32	0,11	0,00	0,14	0,02	0,48	0,15	0,00

Tabela 17. Skład biochemiczny wątroby u samców (kontrola M – samce grupy kontrolnej, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Amid I	1,82	1,56	1,32	1,07	0,79	0,72	1,59	1,17	1,20	0,25	0,73	1,73	2,66	1,60	0,02	2,18	2,64	1,56	2,52	0,97
Amid I max.	1654,91	3,79	1646,38	6,32	0,00	1654,91	2,89	1649,14	1,93	0,01	1653,89	3,86	1649,97	0,48	0,03	1653,73	5,79	1650,97	1,81	0,01
Pasmo 1730	0,13	0,10	0,40	0,12	0,01	0,30	0,29	0,09	0,08	0,04	0,17	0,08	0,13	0,09	0,05	0,23	0,07	0,11	0,04	0,01
Pasmo 2920	0,00	0,07	0,00	0,00	0,37	0,00	0,04	0,00	0,05	0,92	0,00	0,03	0,04	0,11	0,08	0,03	0,27	0,00	0,09	0,37
Pasmo 2990	0,01	0,03	0,02	0,01	0,72	0,01	0,03	0,01	0,03	0,53	0,01	0,03	0,03	0,04	0,07	0,03	0,07	0,02	0,05	0,68
Pasmo 3020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,01	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77
Fingerprint	7,69	8,75	15,81	6,11	0,19	6,21	7,44	10,91	5,92	0,16	13,25	14,24	16,93	11,47	0,13	13,87	13,19	12,69	17,30	0,90
Fosforany	0,60	0,97	0,70	0,30	0,66	0,47	0,60	0,67	0,57	0,72	0,55	1,00	0,64	0,41	0,64	0,68	1,13	0,50	0,86	0,59
Białka względnie	0,15	0,04	0,10	0,04	0,00	0,13	0,05	0,14	0,04	0,54	0,13	0,05	0,14	0,02	0,37	0,14	0,05	0,15	0,04	0,97
α helisa	0,05	0,04	0,05	0,03	0,72	0,03	0,04	0,04	0,04	0,33	0,03	0,06	0,08	0,04	0,07	0,07	0,07	0,04	0,06	0,97
β harmonijka	0,05	0,04	0,06	0,02	0,86	0,03	0,04	0,04	0,03	0,48	0,04	0,04	0,06	0,04	0,08	0,07	0,07	0,05	0,06	0,97
β harmonijka / α helisa	1,02	0,19	1,07	0,11	1,00	1,02	0,28	0,91	0,14	0,03	1,24	0,38	0,89	0,09	0,00	1,02	0,17	1,00	0,17	0,54
Tłuszcze / białka	0,00	0,32	0,07	0,14	0,71	0,39	0,86	0,00	0,24	0,07	0,03	0,41	0,19	0,19	0,63	0,22	0,51	0,08	0,24	0,51
Tłuszcze względnie	0,00	0,05	0,01	0,02	0,71	0,02	0,06	0,00	0,04	0,40	0,00	0,06	0,03	0,03	0,49	0,03	0,09	0,01	0,04	0,58
Tłuszcze utlenione	0,00	0,15	0,36	0,53	0,19	0,00	0,47	0,00	0,25	0,73	0,00	0,31	0,20	0,24	0,15	0,12	0,26	0,03	0,13	0,42
Tłuszcze nienasycone	0,03	0,01	0,06	0,08	0,19	0,03	0,01	0,02	0,04	0,48	0,03	0,03	0,06	0,03	0,16	0,02	0,04	0,04	0,04	0,30
Tłuszcze nasycone	0,06	0,03	0,36	0,11	0,001	0,08	0,04	0,21	0,04	0,03	0,12	0,06	0,25	0,10	0,00	0,18	0,07	0,32	0,08	0,00

Tabela 18. Skład biochemiczny wątroby txJ w zależności od płci (txJ F – samice txJ, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Amid I	1,27	0,91	1,32	1,07	0,48	2,35	1,70	1,17	1,20	0,22	2,50	1,33	2,66	1,60	0,67	2,44	1,74	1,56	2,52	0,83
Amid I max.	1646,43	2,01	1646,38	6,32	0,79	1648,73	5,30	1649,14	1,93	0,33	1650,21	2,41	1649,97	0,48	0,72	1648,21	0,48	1650,97	1,81	0,44
Pasmo 1730	0,27	0,16	0,40	0,12	0,48	0,11	0,05	0,09	0,08	0,93	0,09	0,06	0,13	0,09	0,31	0,07	0,07	0,11	0,04	0,94
Pasmo 2920	0,00	0,00	0,00	0,00	0,95	0,02	0,09	0,00	0,05	0,44	0,09	0,12	0,04	0,11	0,96	0,06	0,08	0,00	0,09	0,69
Pasmo 2990	0,02	0,01	0,02	0,01	0,54	0,04	0,02	0,01	0,03	0,25	0,04	0,03	0,03	0,04	0,81	0,04	0,03	0,02	0,05	0,94
Pasmo 3020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,01	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58
Fingerprint	12,15	6,97	15,81	6,11	0,38	15,91	9,68	10,91	5,92	0,29	16,57	7,62	16,93	11,47	0,41	15,21	12,16	12,69	17,30	0,83
Fosforany	0,41	0,57	0,70	0,30	0,54	0,75	0,47	0,67	0,57	0,79	0,66	0,34	0,64	0,41	0,81	0,76	0,37	0,50	0,86	0,94
Białka względnie	0,09	0,07	0,10	0,04	0,48	0,13	0,03	0,14	0,04	0,79	0,15	0,01	0,14	0,02	0,31	0,14	0,03	0,15	0,04	0,83
α helisa	0,04	0,02	0,05	0,03	0,29	0,06	0,03	0,04	0,04	0,33	0,07	0,03	0,08	0,04	0,47	0,07	0,04	0,04	0,06	0,94
β harmonijka	0,04	0,01	0,06	0,02	0,33	0,06	0,03	0,04	0,03	0,25	0,07	0,03	0,06	0,04	0,89	0,06	0,03	0,05	0,06	0,94
β harmonijka / α helisa	1,10	0,33	1,07	0,11	0,38	0,98	0,09	0,91	0,14	0,19	0,93	0,03	0,89	0,09	0,31	1,03	0,04	1,00	0,17	0,94
Tłuszcze / białka	0,00	0,07	0,07	0,14	0,56	0,16	0,20	0,00	0,24	0,32	0,30	0,23	0,19	0,19	0,81	0,23	0,22	0,08	0,24	0,41
Tłuszcze względnie	0,00	0,01	0,01	0,02	0,50	0,02	0,03	0,00	0,04	0,41	0,04	0,04	0,03	0,03	0,66	0,03	0,03	0,01	0,04	0,62
Tłuszcze utlenione	0,00	0,51	0,36	0,53	0,44	0,18	0,06	0,00	0,25	0,59	0,16	0,15	0,20	0,24	0,31	0,13	2,37	0,03	0,13	0,14
Tłuszcze nienasycone	0,08	0,11	0,06	0,08	0,43	0,04	0,05	0,02	0,04	0,60	0,01	0,03	0,06	0,03	0,11	0,02	0,01	0,04	0,04	0,27
Tłuszcze nasycone	0,29	0,15	0,36	0,11	0,23	0,11	0,09	0,21	0,04	0,41	0,32	0,11	0,25	0,10	0,19	0,48	0,15	0,32	0,08	0,82

Badania czynnościowe wątroby

Stężenie ceruloplazminy było istotnie niższe w populacji txJ we wszystkich grupach wiekowych niezależnie od płci (tabela 31). Trend ten zaobserwowano także u każdej z płci z osobna (tabele 32 i 33). Odnotowano istotnie niższe stężenie ceruloplazminy u samców txJ w porównaniu z samicami grupy badanej, odpowiednio 0,12 g/l; 0,21 g/l; $p = 0,02$ (tabela 34).

Aktywność AST była trudna do jednoznacznej oceny z powodu hemolizy w konsekwencji zastosowania metody uzyskiwania próbek krwi (tabela 31). Aktywność ALT była wyższa w populacji txJ niż w populacji kontrolnej we wszystkich grupach wiekowych, przy czym istotną różnicę zaobserwowano u myszy 4-, 8- i 14-miesięcznych (tabela 31). Istotnie wyższą aktywność ALT stwierdzono u 8-miesięcznych samców txJ w porównaniu z odpowiednimi samicami txJ (tabela 34).

Stężenie bilirubiny było wyższe w populacji 2-, 4- i 8-miesięcznych txJ względem grupy kontrolnej. Stężenie zaobserwowane u 8-miesięcznych txJ istotnie przewyższało stężenie w populacji kontrolnej. U 14-miesięcznych myszy nie odnotowano różnicy między grupami (tabela 31). Stężenie bilirubiny było istotnie wyższe u 8-miesięcznych samców txJ niż u samic txJ (tabela 34).

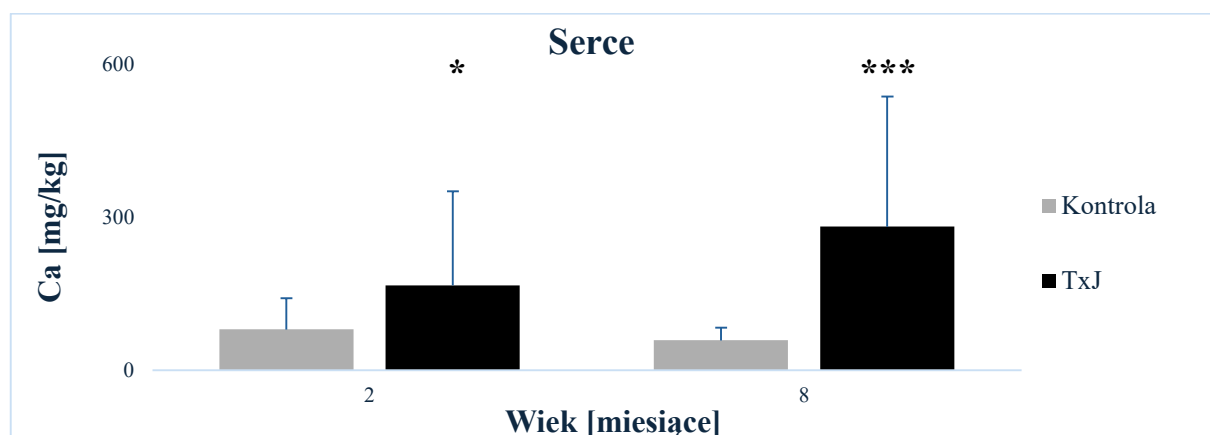
Stężenie albuminy u 2-miesięcznych myszy było porównywalne w obu grupach. Niższe wartości zaobserwowano u 4-, 8- i 14-miesięcznych txJ, przy czym istotną różnicę wykazano jedynie w grupie myszy 14-miesięcznych (tabela 31). Stężenie albuminy było istotnie niższe u samic txJ w porównaniu z samicami kontrolnymi we wszystkich pomiarach (tabela 32). W przypadku samców stężenie było niższe u 8- i 14-miesięcznych txJ, a różnicę istotną statystycznie zaobserwowano pomiędzy grupami najstarszych myszy (tabela 33). Nie stwierdzono różnic w stężeniu albuminy pomiędzy samcami a samicami txJ (tabela 34).

Aktywność fosfatazy alkalicznej była wyższa w populacji txJ niż w grupie kontrolnej u wszystkich zwierząt. Istotną różnicę odnotowano u myszy w wieku 2-, 4- i 8- miesięcy (tabela 31). Taki sam trend zaobserwowano w przypadku każdej z płci z osobna (tabele 32 i 33). U 8 miesięcznych txJ aktywność ALP była istotnie wyższa u samic niż u samców (tabela 34).

Serce – skład pierwiastkowy

Stężenie wapnia w sercu txJ było istotnie wyższe niż w populacji kontrolnej i wykazało przeciwnie niż w przypadku kontroli trend wzrostowy (wykres 13). U samic txJ

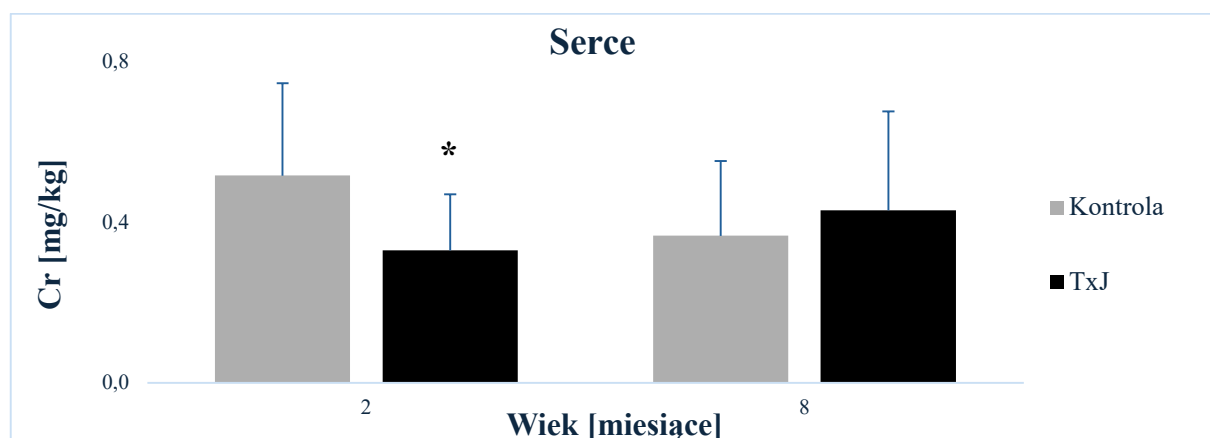
zaobserwowano wyższe stężenia wapnia niż u samców txJ, ale różnice pomiędzy tymi wartościami nie są istotne statystycznie (tabela 22).



Wykres 13. Stężenie wapnia w sercu (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie chromu w sercu było istotnie niższe w grupie 2-miesięcznych txJ w porównaniu do grupy kontrolnej. U myszy 8 miesięcznych stężenie chromu w obu grupach było porównywalne (wykres 14). Nie odnotowano różnic pomiędzy samcami a samicami txJ (tabela 22).



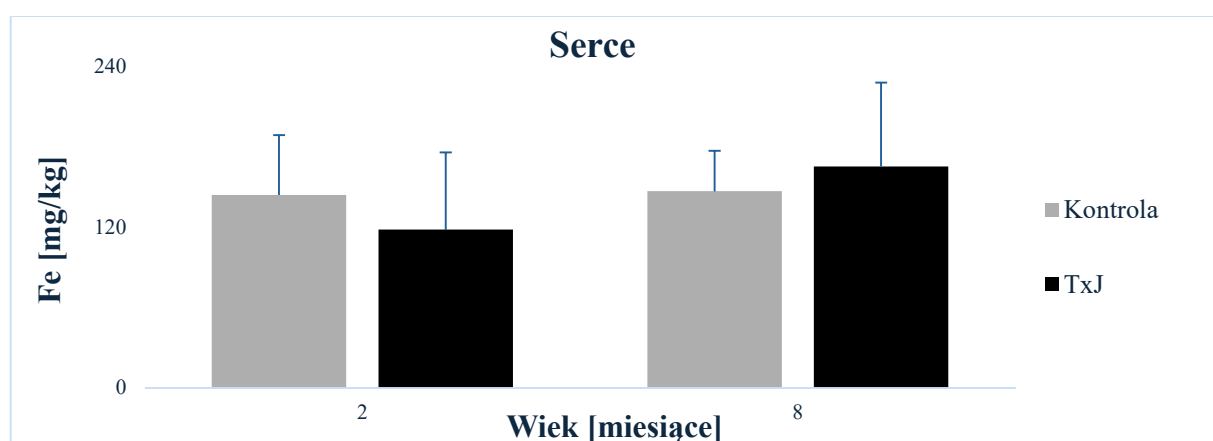
Wykres 14. Stężenie chromu w sercu (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie manganu w sercu udało się zmierzyć przed awarią aparatury tylko w populacji 2-miesięcznych samców (tabele 19 i 20). Nie było możliwości dokonania późniejszych pomiarów ze względu na konieczność jednoczasowego przygotowania i rozmrożenia wszystkich próbek serc. Rozmrożony, niewykorzystany z powodu awarii materiał poddano utylizacji. Dane pozostają niepełne i uniemożliwiają szczegółową analizę. Na podstawie

dostępnych pomiarów zaobserwowano, że stężenie manganu w sercu 2-miesięcznych samców txJ było wyższe niż w grupie kontrolnej, jednak różnica nie była istotna statystycznie (tabela 21).

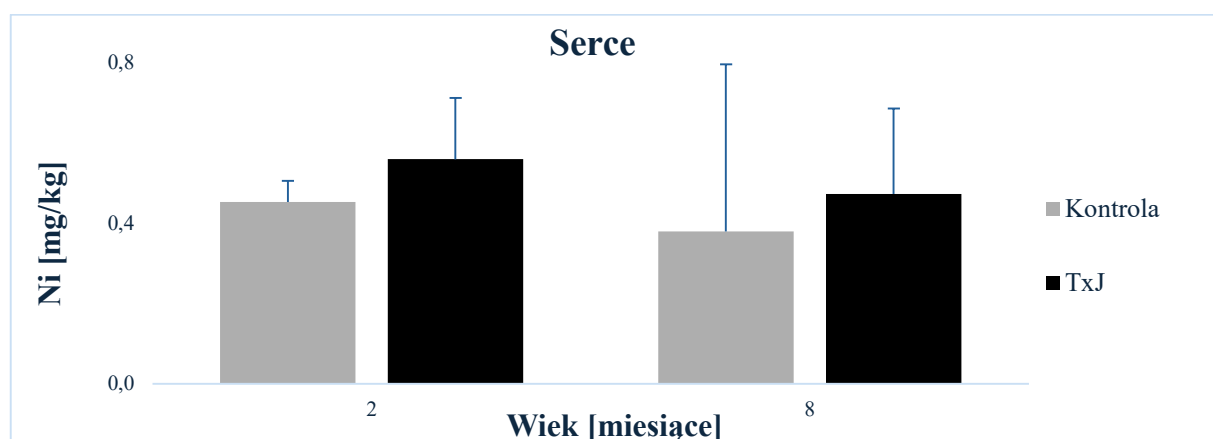
Stężenie żelaza w sercu 2-miesięcznych txJ było niższe niż u myszy z grupy kontrolnej. W pomiarze u myszy 8-miesięcznych zaobserwowano wartości wyższe niż u myszy kontrolnych (wykres 15). Nie zaobserwowano jednak różnic istotnych statystycznie (tabela 19). Nie stwierdzono różnic w stężeniu żelaza w sercu pomiędzy samcami a samicami txJ (tabela 22).



Wykres 15. Stężenie żelaza w sercu (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

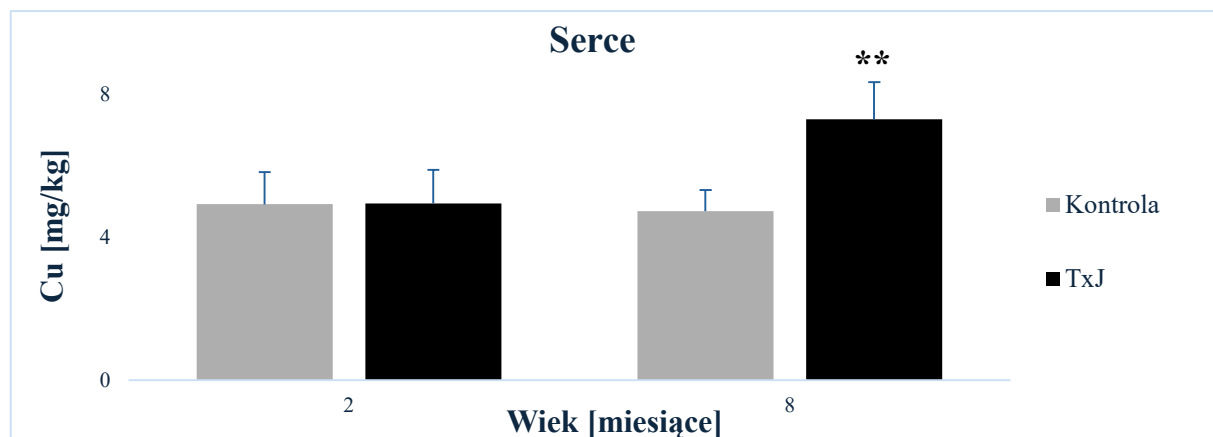
Stężenie niklu w obu populacjach malało wraz ze starzeniem się zwierząt (wykres 16). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic (tabela 19 i 22).



Wykres 16. Stężenie niklu w sercu (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

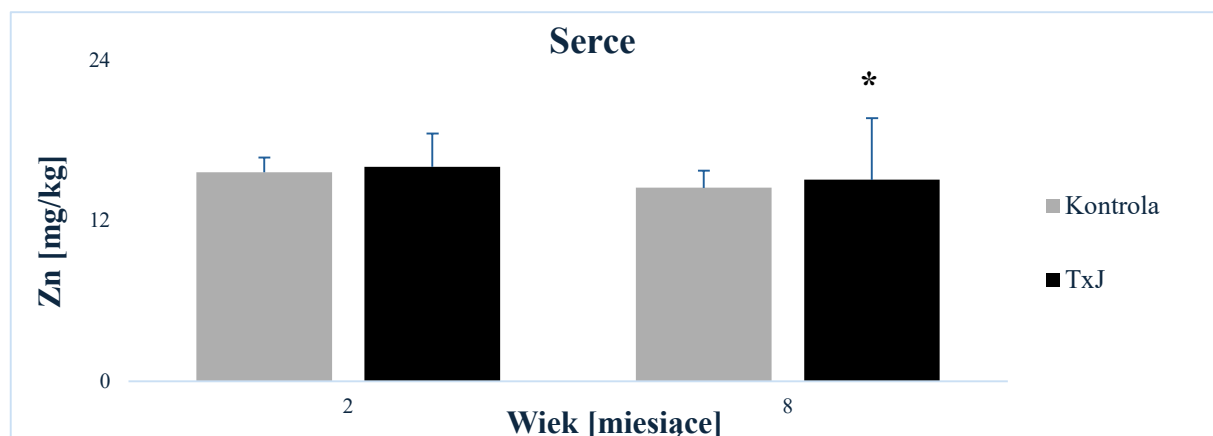
Stężenie miedzi w sercu 8-miesięcznych txJ istotnie przewyższało to zaobserwowane w populacji kontrolnej (wykres 17). U myszy 2- miesięcznych nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy grupami (tabela 19). Podobny obraz przedstawia się przy analizie w obrębie każdej z płci (tabele 20 i 21). Porównanie samców z samicami txJ nie ujawniło różnic (tabela 22).



Wykres 17. Stężenie miedzi w sercu (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie cynku w sercu w obu grupach wiekowych było wyższe w grupie txJ niż w grupie kontrolnej (wykres 18). U zwierząt 8-miesięcznych różnica była istotna statystycznie (tabela 19). Różnica stężeń silniej wyrażona była w populacji samców (tabela 21). Nie odnotowano różnic w stężeniu cynku sercu w obrębie grupy txJ (tabela 22).



Wykres 18. Stężenie cynku w sercu (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Tabela 19. Stężenie pierwiastków w sercu w mg/kg

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	79,59	61,76	165,96	184,91	0,03	58,31	25,22	281,29	255,64	0,00
Cr	0,52	0,23	0,33	0,14	0,02	0,37	0,19	0,43	0,25	0,67
Mn	0,00	0,14	0,03	0,30	0,35	0,00	0,03	0,00	0,00	0,61
Fe	144,30	44,70	118,26	57,89	0,15	146,99	30,48	165,55	62,87	0,63
Ni	0,45	0,05	0,56	0,15	0,03	0,38	0,42	0,47	0,21	0,50
Cu	4,93	0,91	4,95	0,94	0,79	4,74	0,59	7,31	1,05	0,00
Zn	15,63	1,11	16,03	2,51	0,80	14,47	1,29	15,06	4,63	0,03
Ga*	164,60	41,30	194,00	22,40	0,00	138,00	43,60	150,90	37,90	0,16

Tabela 20. Stężenie pierwiastków w sercu samic w mg/kg (kontrola F – samice grupy kontrolnej, txJ F – samice txJ)

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	72,75	54,70	259,96	182,67	0,04	71,15	20,41	312,48	154,71	0,00
Cr	0,54	0,10	0,33	0,14	0,02	0,41	0,16	0,37	0,15	0,35
Mn	0,00	0,00	0,00	0,07	0,21	0,00	0,04	0,00	0,00	0,49
Fe	143,05	13,11	128,26	27,24	0,26	143,05	18,11	160,54	62,87	1,00
Ni	0,46	0,02	0,53	0,11	0,04	0,70	0,30	0,51	0,17	0,17
Cu	5,22	0,47	4,75	0,40	0,11	4,86	0,25	7,56	1,33	0,06
Zn	15,86	0,88	16,03	1,13	0,77	14,71	0,51	14,91	4,57	0,79
Ga*	180,35	11,80	194,00	30,90	0,11	160,80	49,60	150,90	33,90	0,66

Tabela 21. Stężenie pierwiastków w sercu samców w mg/kg (kontrola M – samce grupy kontrolnej, txJ M – samce txJ)

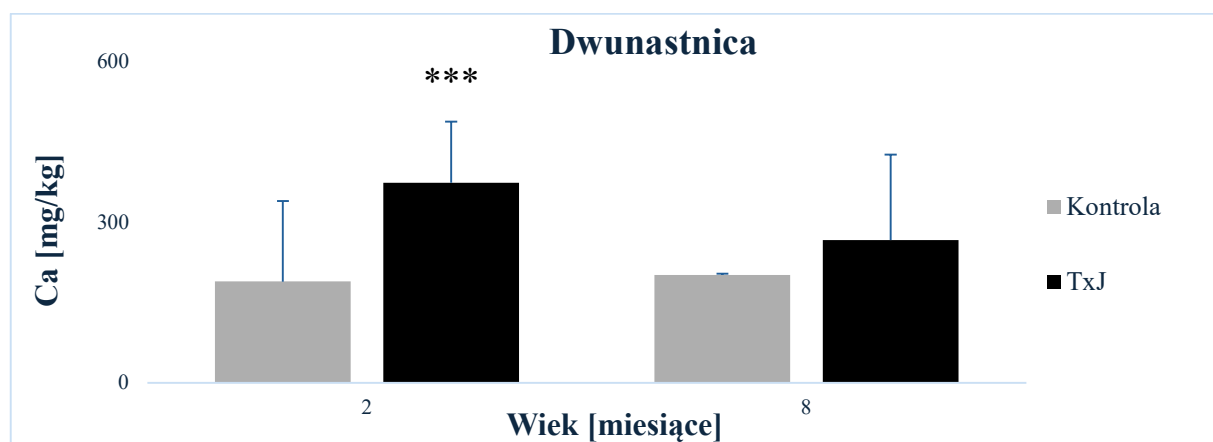
Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	105,59	117,26	148,95	270,61	0,39	47,90	14,48	196,86	250,87	0,02
Cr	0,49	0,68	0,30	0,25	0,18	0,31	0,11	0,45	0,31	0,10
Mn	0,03	0,46	0,21	0,31	0,90	0,00	0,02	0,00	0,00	0,95
Fe	153,48	79,44	92,10	65,49	0,33	154,44	33,38	165,75	73,11	0,49
Ni	0,42	0,65	0,63	0,14	0,35	0,26	0,15	0,45	0,28	0,02
Cu	4,47	1,27	5,21	1,38	0,18	4,41	1,32	7,81	3,33	0,00
Zn	15,37	2,97	16,72	4,08	0,52	13,57	4,07	15,71	2,90	0,01
Ga*	137,10	39,10	193,85	18,10	0,00	107,45	48,10	148,90	37,70	0,01

Tabela 22. Stężenie pierwiastków w sercu txJ w zależności od płci w mg/kg (txJ F – samice txJ, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	259,96	182,67	148,95	270,61	0,67	312,48	154,71	196,86	250,87	0,16
Cr	0,33	0,14	0,30	0,25	0,92	0,37	0,15	0,45	0,31	0,29
Mn	0,00	0,07	0,21	0,31	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,95
Fe	128,26	27,24	92,10	65,49	0,53	160,54	62,87	165,75	73,11	0,67
Ni	0,53	0,11	0,63	0,14	0,21	0,51	0,17	0,45	0,28	0,85
Cu	4,75	0,40	5,21	1,38	0,27	7,18	1,33	7,81	3,48	0,11
Zn	16,03	1,13	16,72	4,08	0,96	14,91	4,57	15,71	2,90	0,60
Ga*	194,00	30,90	193,85	18,10	0,67	150,90	33,90	148,90	37,70	0,85

Dwunastnica – skład pierwiastkowy

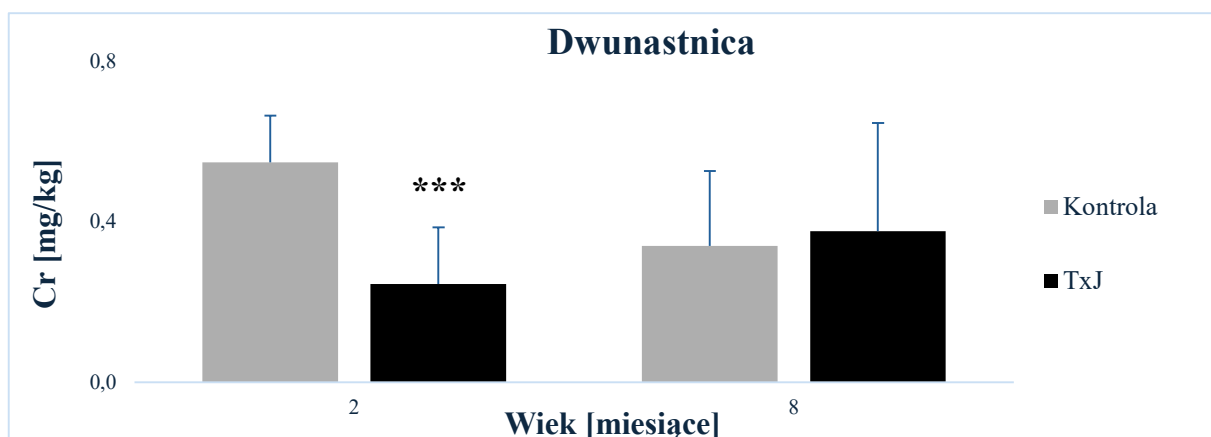
Stężenie wapnia w dwunastnicy było istotnie wyższe u 2-miesięcznych txJ w porównaniu do grupy kontrolnej. U 8-miesięcznych stężenie wapnia również było wyższe w grupie txJ, ale różnica nie była istotna statystycznie (wykres 19). Stężenie wapnia w dwunastnicach grupy kontrolnej było porównywalne w obu grupach wiekowych (tabela 23). Różnica w stężeniu wapnia była istotnie zaznaczona w populacji samców, u których w grupie txJ odnotowano wartość znamiennej wyższą (tabela 25). W obrębie populacji txJ nie zaobserwowano różnic (tabela 26).



Wykres 19. Stężenie wapnia w dwunastnicy (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

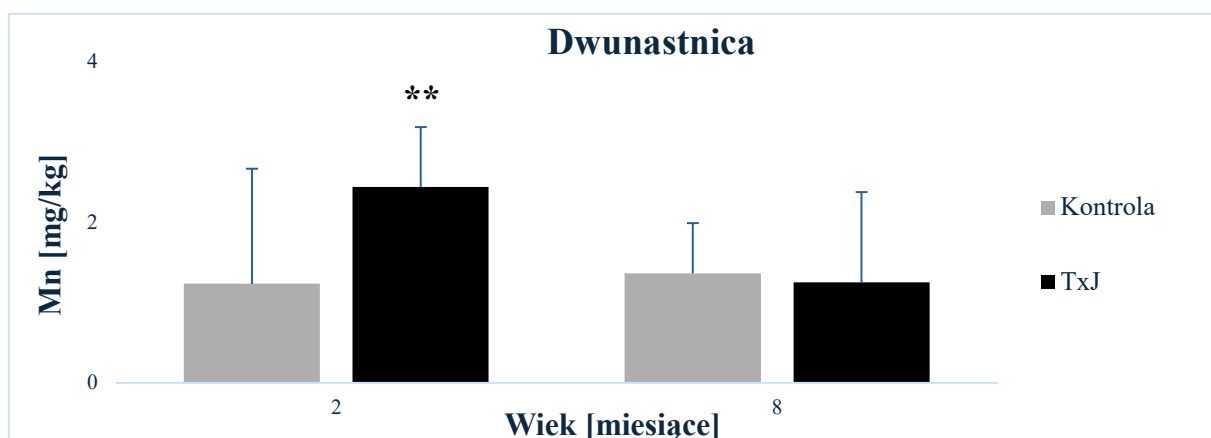
U 2-miesięcznych txJ odnotowano istotnie niższe stężenie chromu w dwunastnicy względem kontroli (tabela 23). Stężenie chromu w dwunastnicy 8-miesięcznych txJ było wyższe niż w grupie kontrolnej (wykres 20). Odwrotny trend (spadkowy) zaobserwowano w populacji kontrolnej. Analogiczny obraz uzyskano po wyodrębnieniu danych dla każdej płci z osobna (tabele 24 i 25). U myszy 8-miesięcznych zaobserwowane stężenia chromu były do siebie zbliżone we wszystkich wyodrębnionych podgrupach. Nie odnotowano różnic w stężeniu chromu w dwunastnicy względem płci w populacji txJ (tabela 26).



Wykres 20. Stężenie chromu w dwunastnicy (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

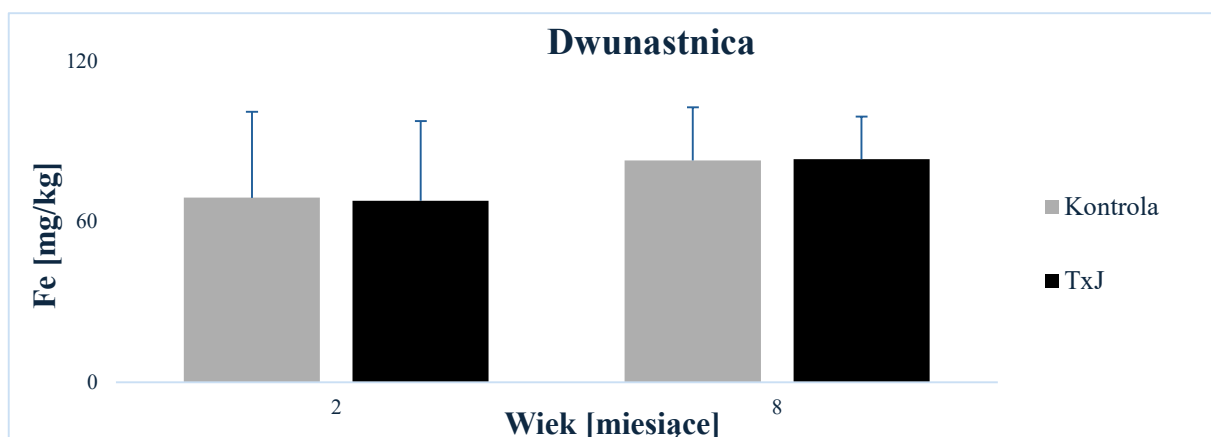
Stężenie manganu w dwunastnicy 2-miesięcznych txJ było istotnie wyższe względem grupy kontrolnej (tabela 23). Stężenie u 8-miesięcznych txJ było niższe i osiągnęło poziom porównywalny z grupą kontrolną, w której zaobserwowano stabilny poziom manganu w obu grupach wiekowych (wykres 21). Istotnie wyższe stężenie manganu w dwunastnicy odnotowano u 2-miesięcznych samców txJ w porównaniu z samcami kontrolnymi (tabela 25), przy braku różnic wewnątrz populacji txJ (tabela 26).



Wykres 21. Stężenie manganu w dwunastnicy (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

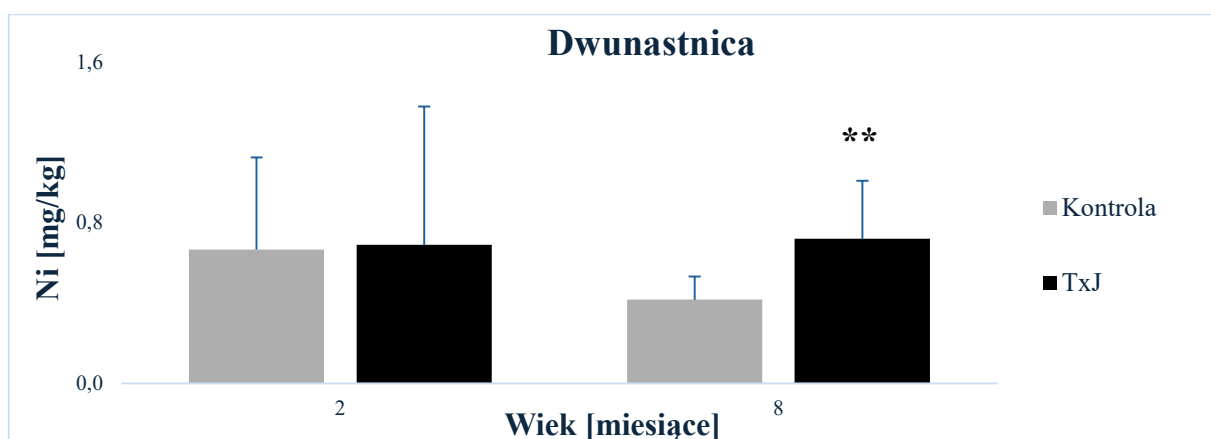
Stężenia żelaza w dwunastnicy osiągnęło w obu grupach porównywalne wartości zarówno u myszy 2- jak i 8-miesięcznych (wykres 22), przy czym wartości wyższe zaobserwowano u osobników starszych (tabela 23). Analogicznie przedstawiała się sytuacja w obrębie każdej z płci analizowanej z osobna (tabele 24 i 25). W populacji txJ różnice między płciami nie były zauważalne (tabela 26).



Wykres 22. Stężenie żelaza w dwunastnicy (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

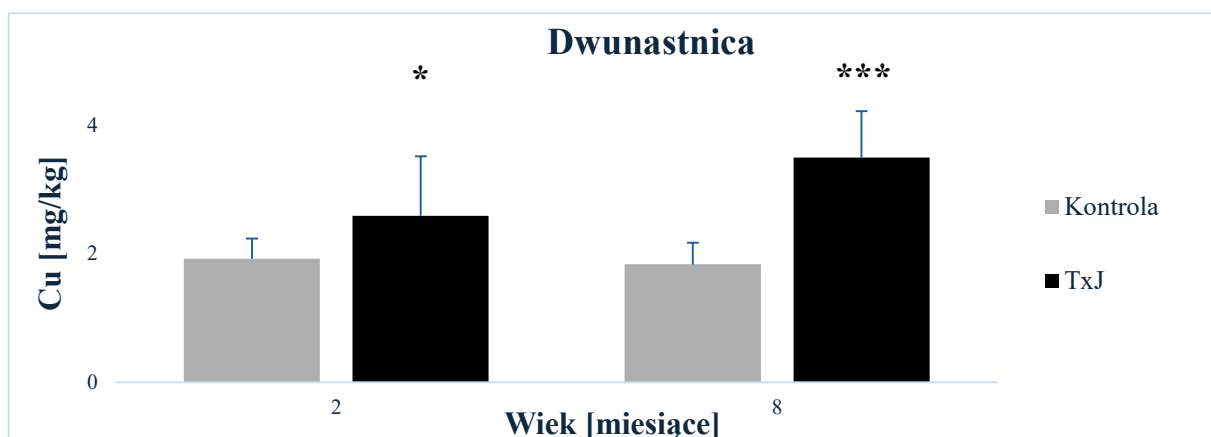
Stężenie niklu w dwunastnicy txJ było na porównywalnym poziomie w obu grupach wiekowych (wykres 23). W grupie 8-miesięcznych kontroli stężenie niklu osiągnęło istotnie niższą wartość w stosunku do txJ (tabela 23). Nie odnotowano różnic w stężeniu niklu w dwunastnicy względem płci w obrębie grupy txJ (tabela 26).



Wykres 23. Stężenie niklu w dwunastnicy (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

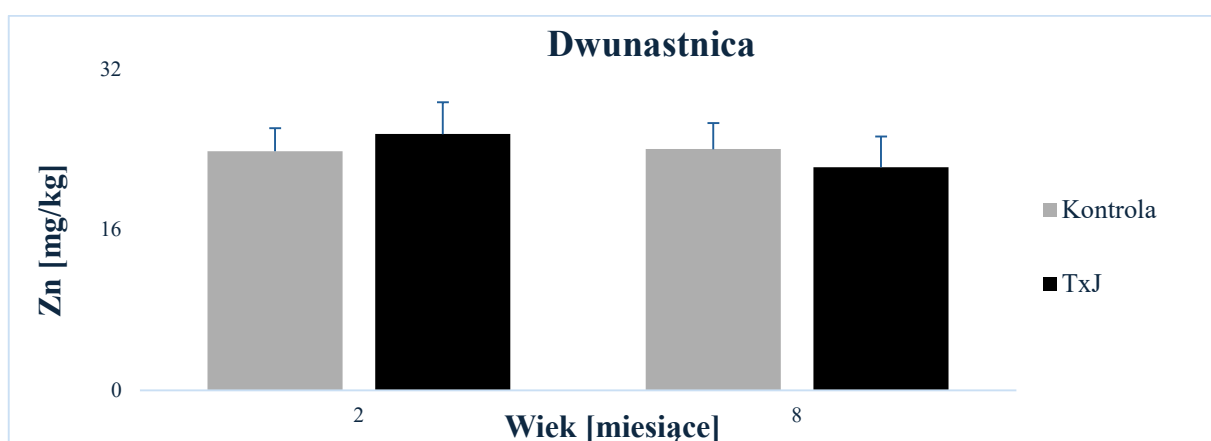
Stężenie miedzi było istotnie wyższe w populacji txJ w obu grupach wiekowych (wykres 24) i – inaczej niż w grupie kontrolnej – osiągnęło wyższą wartość w pomiarze u myszy 8-miesięcznych (tabela 23). Nie zaobserwowano różnic w stężeniu miedzi u samców ani u samic (tabele 24 i 25). Stężenie miedzi w dwunastnicy u samców i samic txJ było podobne (tabela 26).



Wykres 24. Stężenie miedzi w dwunastnicy (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie cynku w dwunastnicy 2-miesięcznych txJ było wyższe niż u kontroli. W pomiarze u myszy 8-miesięcznych zaobserwowano odwrotną sytuację (wykres 25). Różnice te nie były istotne statystycznie. W przypadku populacji kontrolnej w obu grupach wiekowych stężenie miało porównywalne wartości (tabela 23). Trendy te odpowiadają zmianom zaobserwowanym w analizie dla każdej z płci z osobna (tabele 24 i 25.). Stężenie cynku w dwunastnicy 2-miesięcznych samic txJ było istotnie wyższe niż u samców txJ. Nie występowały różnice wewnątrz grupy 8-miesięcznych txJ (tabela 26).



Wykres 25. Stężenie cynku w dwunastnicy (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Tabela 23. Stężenie pierwiastków w dwunastnicy w mg/kg

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	189,36	150,71	373,89	114,40	0,00	201,51	162,29	266,71	159,93	0,12
Cr	0,55	0,12	0,25	0,14	0,00	0,34	0,19	0,38	0,27	0,56
Mn	1,23	1,44	2,44	0,75	0,01	1,36	0,63	1,25	1,13	0,33
Fe	69,02	32,17	67,84	29,86	0,55	82,95	19,93	83,43	15,99	0,81
Ni	0,67	0,46	0,69	0,34	0,79	0,42	0,12	0,72	0,29	0,01
Cu	1,93	0,31	2,59	0,93	0,02	1,84	0,34	3,50	0,73	0,00
Zn	23,85	2,31	25,56	3,17	0,14	24,06	2,59	22,24	3,08	0,11
Ga*	173,35	47,70	207,00	72,80	0,08	134,50	26,80	170,35	83,75	0,00

Tabela 24. Stężenie pierwiastków w dwunastnicy u samic w mg/kg (kontrola F – samice grupy kontrolnej, txJ F – samice txJ)

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	256,69	80,76	389,03	110,70	0,07	246,70	197,69	283,23	348,93	0,43
Cr	0,57	1,16	0,24	0,05	0,01	0,42	0,17	0,41	0,31	0,79
Mn	2,37	0,49	2,48	0,72	0,60	1,77	0,84	1,31	1,45	0,37
Fe	60,99	42,21	71,59	14,46	1,00	79,22	20,37	90,56	30,22	0,19
Ni	0,70	0,44	0,71	0,56	0,92	0,39	0,18	0,62	0,42	0,08
Cu	1,90	0,27	2,62	1,15	0,11	1,92	0,36	3,54	0,26	0,00
Zn	24,31	2,50	26,47	1,88	0,07	25,10	2,26	22,55	2,66	0,07
Ga*	180,00	35,80	191,00	56,10	0,29	121,65	28,70	180,50	83,75	0,01

Tabela 25. Stężenie pierwiastków w dwunastnicy u samców w mg/kg (kontrola M – samce grupy kontrolnej, txJ M – samce txJ)

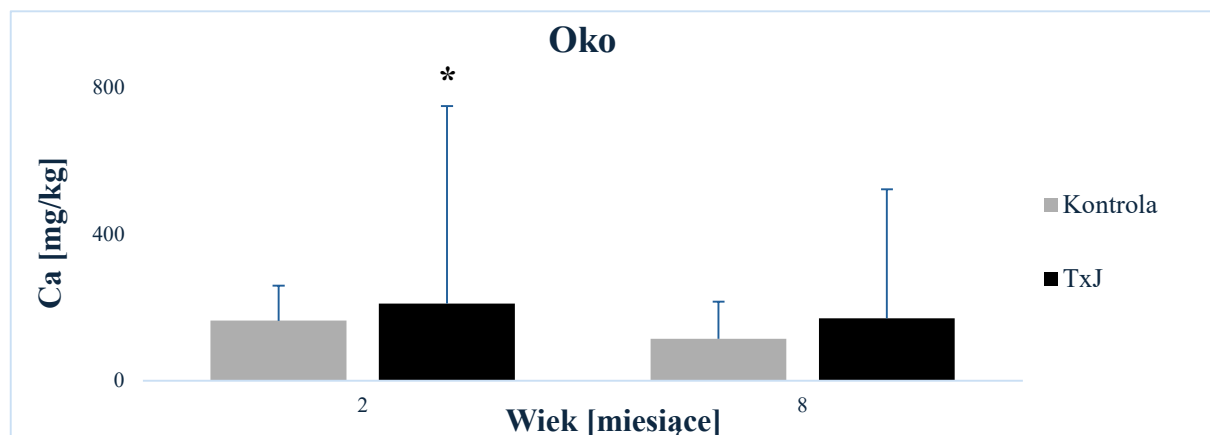
Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	105,98	83,98	346,39	118,10	0,00	172,73	61,42	266,41	161,35	0,23
Cr	0,53	0,12	0,29	0,19	0,00	0,28	0,09	0,36	0,28	0,81
Mn	0,99	0,42	2,25	0,77	0,00	1,30	0,56	1,25	0,52	0,74
Fe	71,69	36,17	56,46	42,80	0,61	83,72	23,80	82,64	11,32	0,36
Ni	0,55	0,36	0,67	0,17	0,44	0,42	0,09	0,73	0,18	0,05
Cu	2,00	0,81	2,59	0,65	0,10	1,73	0,26	3,41	1,69	0,01
Zn	23,61	4,93	24,54	4,69	1,00	23,33	4,58	22,12	3,48	0,74
Ga*	166,70	79,60	226,50	79,20	0,25	136,00	13,60	158,95	64,10	0,11

Tabela 26. Stężenie pierwiastków w dwunastnicy txJ w zależności od płci w mg/kg (txJ F – samice txJ, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	389,03	110,70	346,39	118,10	0,75	283,23	348,93	266,41	161,35	0,27
Cr	0,24	0,05	0,29	0,19	0,83	0,41	0,31	0,36	0,28	0,56
Mn	2,48	0,72	2,25	0,77	1,00	1,31	1,45	1,25	0,52	0,96
Fe	71,59	14,46	56,46	42,80	0,46	90,56	30,22	82,64	11,32	0,23
Ni	0,71	0,56	0,67	0,17	1,00	0,62	0,42	0,73	0,18	0,56
Cu	2,62	1,15	2,59	0,65	0,67	3,54	0,26	3,41	1,69	0,64
Zn	26,47	1,88	24,54	4,69	0,01	22,55	2,66	22,12	3,48	0,79
Ga*	191,00	56,10	226,50	79,20	0,83	180,50	83,75	158,95	64,10	0,79

Oko – skład pierwiastkowy

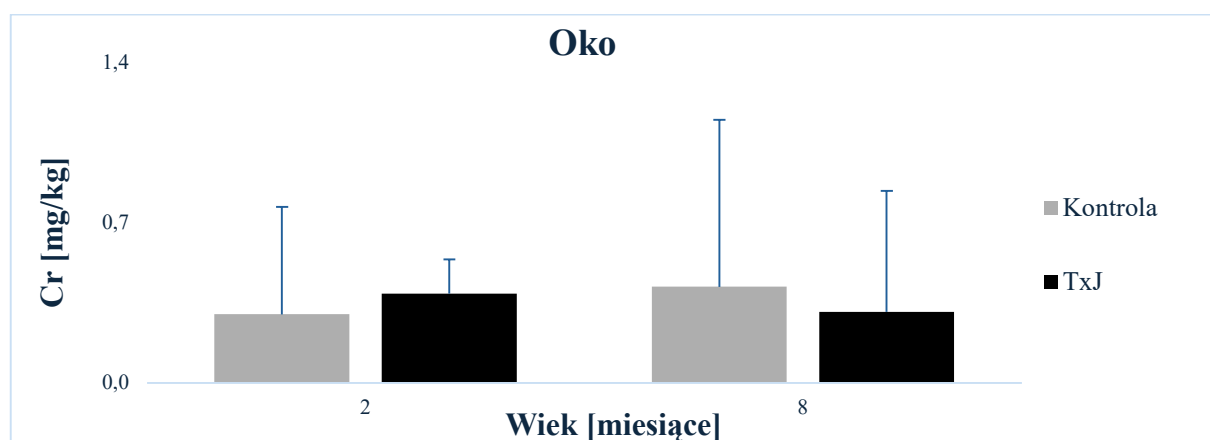
W obu grupach wiekowych stężenie wapnia w gałce ocznej było wyższe w populacji txJ względem kontroli, przy czym różnica odnotowana u myszy 2-miesięcznych była istotna statystycznie (wykres 26). W obu grupach myszy 8-miesięcznych stężenie wapnia było niższe od tego zmierzonego u myszy 2-miesięcznych (tabela 27). W populacji txJ nie zaobserwowano różnic pomiędzy samcami a samicami (tabela 30).



Wykres 26. Stężenie wapnia w oku (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

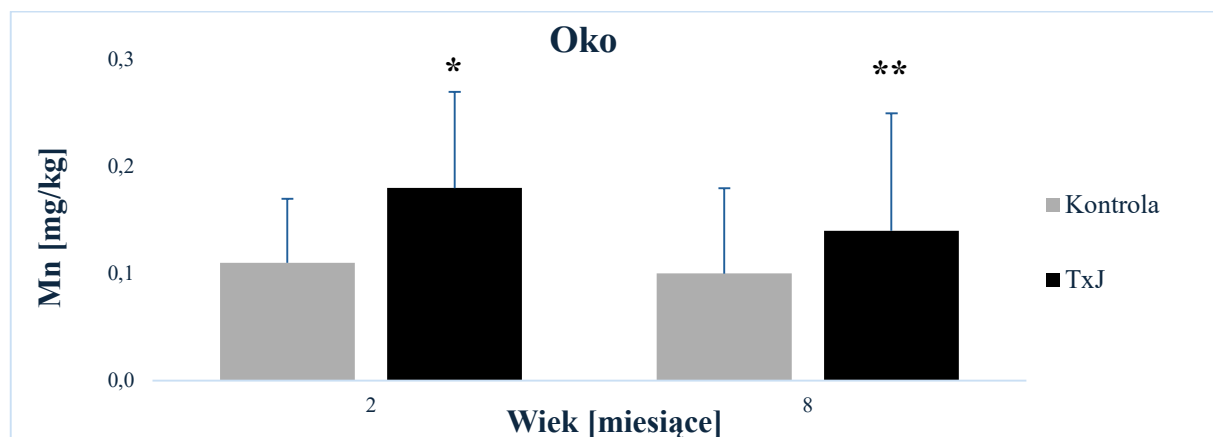
Stężenie chromu w gałce ocznej było porównywalne w obu grupach niezależnie od płci (tabele 28 i 29). Uwagę zwraca odmienny trend (wykres 27) – w grupie 8-miesięcznych txJ odnotowano niższe stężenie niż w grupie młodszej, natomiast w grupie kontrolnej stężenie chromu w oku myszy 8-miesięcznych było wyższe niż u 2-miesięcznych kontroli (tabela 27). Nie odnotowano różnic w stężeniu chromu w oku wewnątrz populacji txJ (tabela 30).



Wykres 27. Stężenie chromu w oku (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

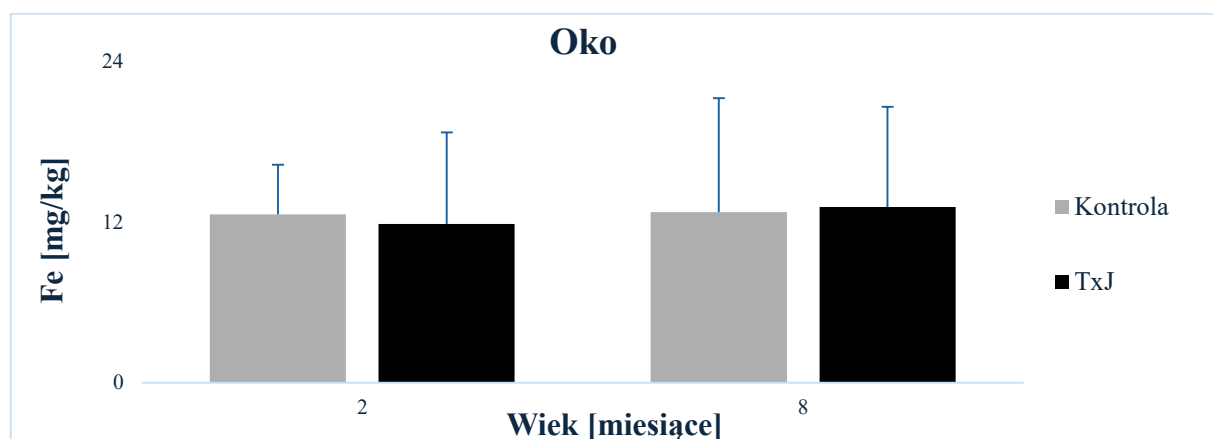
Stężenie manganu w oku w obu grupach wiekowych było istotnie wyższe w populacji txJ (tabela 27). Przy czym wartość zmierzona w oku 8-miesięcznych txJ w była niższa niż u najmłodszych mutantów. W populacji kontrolnej stężenie utrzymało się na porównywalnym poziomie (wykres 28). Trend opisanych powyżej zmian wyraźniej zaznaczył się w populacji samic (tabela 28). Nie odnotowano istotnych różnic w stężeniu manganu w gałce ocznej w obrębie populacji txJ (tabela 30).



Wykres 28. Stężenie manganu w oku (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

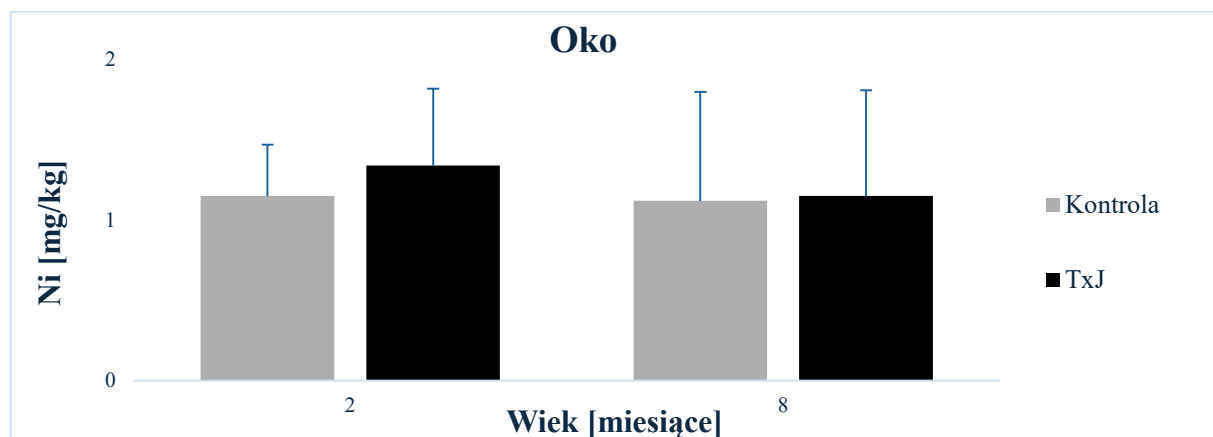
Stężenie żelaza w oku w obu grupach było na porównywalnym poziomie (wykres 29) i pozostało stabilne w zakresie wartości w pomiarach u myszy 2- i 8-miesięcznych (tabela 27). Nie stwierdzono jednoznacznych trendów ani wyraźnych różnic pomiędzy płciami w obrębie populacji txJ (tabela 30).



Wykres 29. Stężenie żelaza w oku (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

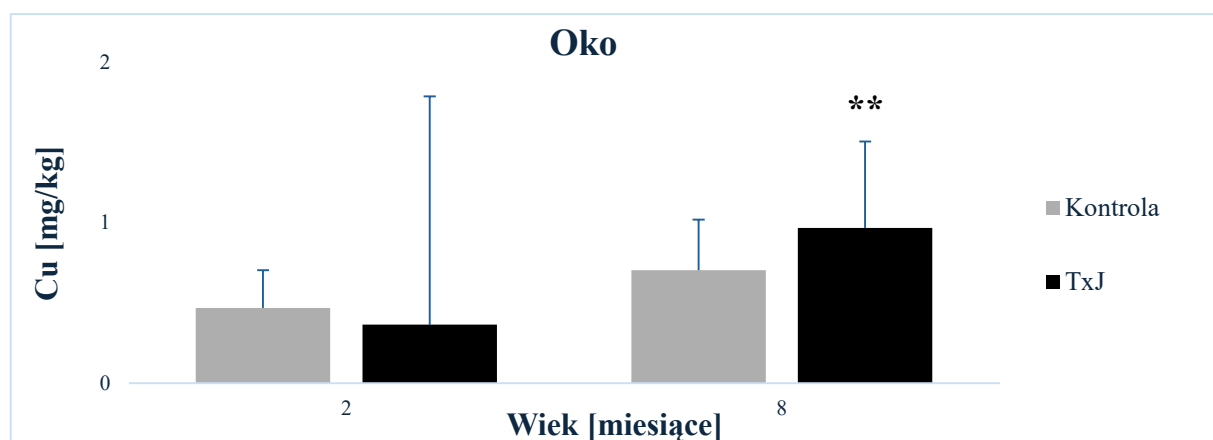
Stężenie niklu w gałce ocznej 2-miesięcznych txJ było wyższe niż w populacji kontrolnej (tabela 27). U 8-miesięcznych txJ było niższe od tego zaobserwowanego u młodszych myszy z grupy badanej. W obrębie populacji kontrolnej stężenie było porównywalne w obu grupach wiekowych (wykres 30). Wyraźniejsze różnice zaobserwowano w przypadku populacji samic txJ (tabela 28). Stwierdzono wyższe stężenie niklu w gałce ocznej 8-miesięcznych samic txJ w stosunku do samców txJ (tabela 30).



Wykres 30. Stężenie niklu w oku (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

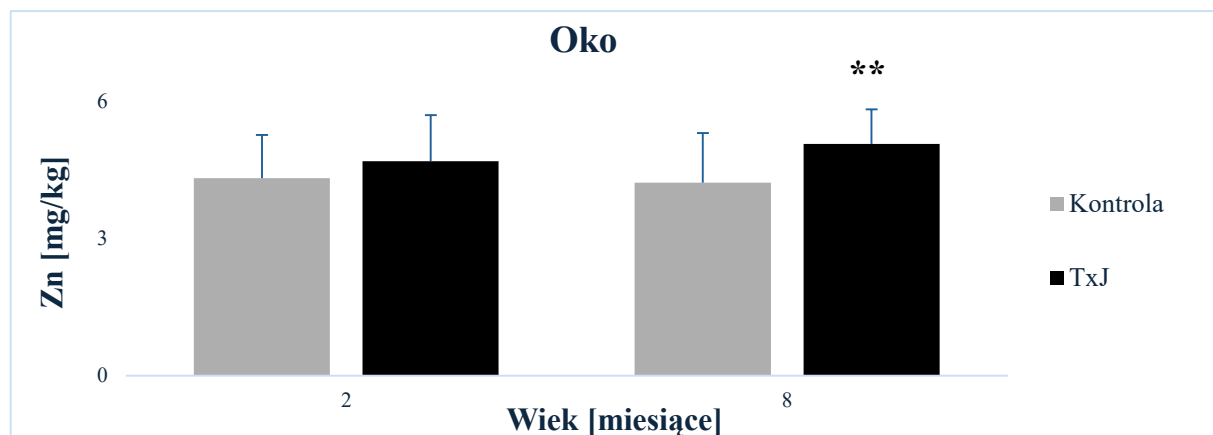
Zaobserwowano cechy odkładania się zwiększonych ilości miedzi w gałce ocznej, przy czym stężenie miedzi było istotnie wyższe w populacji 8-miesięcznych txJ względem populacji kontrolnej (tabela 27). W obu grupach stężenie miedzi u myszy 8-miesięcznych było wyższe niż u myszy młodszych (wykres 31). Akumulacja miedzi w gałce ocznej była wyraźniej zaznaczona w populacji samic txJ w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 28), i samcami txJ (tabela 30).



Wykres 31. Stężenie miedzi w oku (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Stężenie cynku w gałce ocznej w obu grupach wiekowych było wyższe w populacji txJ (wykres 32), osiągając różnicę istotną statystycznie w pomiarze u myszy 8-miesięcznych (tabela 27). Nie stwierdzono występowania różnic po wyodrębnieniu płci (tabele 28 i 29) ani w obrębie populacji txJ (tabela 30).



Wykres 32. Stężenie cynku w oku (mediana, IQR);

(*) $p < 0,05$ | (**) $p < 0,01$ | (***) $p < 0,001$

Tabela 27. Stężenie pierwiastków w oku w mg/kg

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	163,13	96,16	209,73	539,81	0,04	113,83	101,55	169,78	351,99	0,07
Cr	0,30	0,47	0,39	0,15	0,45	0,42	0,73	0,31	0,53	0,60
Mn	0,11	0,06	0,18	0,09	0,03	0,10	0,08	0,14	0,11	0,01
Fe	12,58	3,72	11,87	6,86	0,81	12,75	8,53	13,13	7,51	0,76
Ni	1,15	0,32	1,34	0,48	0,16	1,12	0,68	1,15	0,66	0,51
Cu	0,47	0,24	0,36	1,43	0,39	0,70	0,32	0,97	0,54	0,01
Zn	4,33	0,95	4,70	1,01	0,20	4,23	1,09	5,08	0,76	0,01
Ga*	435,75	54,50	438,35	24,30	0,61	357,00	49,07	354,60	19,50	0,62

Tabela 28. Stężenie pierwiastków w oku u samic w mg/kg (kontrola F – samice grupy kontrolnej, txJ F – samice txJ)

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	149,38	83,38	219,15	255,86	0,07	112,11	122,29	275,79	1386,91	0,09
Cr	0,24	0,17	0,38	0,12	0,10	0,36	0,45	0,32	1,91	0,36
Mn	0,12	0,06	0,21	0,06	0,01	0,10	0,08	0,16	0,08	0,02
Fe	12,16	3,25	10,66	5,52	0,95	11,70	9,90	18,25	8,98	0,41
Ni	1,20	0,23	1,33	0,18	0,13	1,09	0,72	1,41	0,86	0,05
Cu	0,47	0,21	0,37	0,82	0,49	0,79	0,27	1,28	0,53	0,01
Zn	4,33	0,78	5,00	1,26	0,18	4,20	0,99	5,14	3,80	0,02
Ga*	439,70	65,35	435,00	23,70	0,95	352,10	50,10	354,60	17,10	0,23

Tabela 29. Stężenie pierwiastków w oku u samców w mg/kg (kontrola M – samce grupy kontrolnej, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	176,61	340,08	200,31	823,75	0,27	115,55	76,14	134,55	263,81	0,52
Cr	0,57	1,08	0,41	0,41	0,60	0,45	0,72	0,26	0,22	0,07
Mn	0,11	0,49	0,14	0,09	0,31	0,10	0,08	0,11	0,22	0,22
Fe	13,34	4,04	16,35	7,80	0,74	13,44	6,58	12,77	2,16	0,45
Ni	1,14	0,40	1,36	0,76	0,47	1,30	0,65	0,92	0,25	0,22
Cu	0,43	0,31	0,35	2,04	0,60	0,63	0,36	0,85	0,14	0,33
Zn	4,60	0,95	4,38	0,67	0,67	4,31	1,22	5,03	0,46	0,33
Ga*	435,75	41,20	442,20	24,90	0,60	366,30	51,93	350,65	29,75	0,60

Tabela 30. Stężenie pierwiastków w oku txJ w zależności od płci w mg/kg (txJ F – samice txJ, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)		2				8				
Pierwiastek	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ca	219,15	255,86	200,31	823,75	0,92	275,79	1386,91	134,55	263,81	0,32
Cr	0,38	0,12	0,41	0,41	0,75	0,32	1,91	0,26	0,22	0,20
Mn	0,21	0,06	0,14	0,09	0,40	0,16	0,08	0,11	0,22	0,28
Fe	10,66	5,52	16,35	7,80	0,24	18,25	8,98	12,77	2,16	0,54
Ni	1,33	0,18	1,36	0,76	1,00	1,41	0,86	0,92	0,25	0,01
Cu	0,37	0,82	0,35	2,04	1,00	1,28	0,53	0,85	0,14	0,03
Zn	5,00	1,26	4,38	0,67	0,46	5,14	3,80	5,03	0,46	0,32
Ga*	435,00	23,70	442,20	24,90	0,92	354,60	17,10	350,65	29,75	0,54

Tabela 31. Wyniki pomiarów biochemicznych w surowicy

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p	kontrola		txJ		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ceruloplazmina [g/l]	0,32	0,05	0,09	0,05	0,00	0,36	0,07	0,14	0,04	0,00	0,33	0,05	0,19	0,08	0,00	0,43	0,35	0,15	0,09	0,00
Nf-L [ng/ml]	0,24	0,13	0,27	0,15	0,27	0,18	0,12	0,23	0,06	0,01	0,24	0,13	0,29	0,13	0,27	0,18	0,15	0,28	0,16	0,04
AST [U/l]	595,00	464,00	718,00	413,50	0,77	960,00	430,00	757,50	971,50	0,40	738,00	537,50	1070,00	520,00	0,02	485,50	240,00	698,00	369,00	0,14
ALT [U/l]	70,00	38,00	77,50	59,50	0,59	104,00	67,00	186,50	107,50	0,01	100,00	62,00	420,00	330,00	0,00	74,00	69,00	119,00	62,00	0,05
Bilirubina [mg/dl]	0,10	0,10	0,15	1,90	0,48	0,10	0,30	2,20	2,55	0,06	0,10	0,00	0,20	0,60	0,01	2,00	1,10	1,55	2,00	0,24
Albumina [g/dl]	2,95	1,80	3,01	1,04	0,90	3,00	1,51	2,57	1,46	0,21	3,00	1,15	2,20	1,00	0,07	3,33	0,34	3,03	0,77	0,03
ALP [U/l]	179,50	40,00	218,50	63,50	0,01	100,00	20,00	187,00	42,50	0,00	104,50	36,50	253,00	42,00	0,00	120,00	139,00	186,50	85,50	0,41

Tabela 32. Wyniki pomiarów biochemicznych w surowicy samic (kontrola F – samice grupy kontrolnej, txJ F – samice txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p	kontrola F		txJ F		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ceruloplazmina [g/l]	0,31	0,05	0,11	0,04	0,00	0,34	0,05	0,15	0,06	0,00	0,32	0,02	0,20	0,06	0,00	0,32	0,09	0,12	0,04	0,00
Nf-L [ng/ml]	0,27	0,06	0,30	0,13	0,60	0,19	0,17	0,23	0,31	0,16	0,28	0,07	0,30	0,27	0,68	0,22	0,10	0,32	0,23	0,21
AST [U/l]	565,00	165,00	718,00	486,50	0,27	970,00	620,00	820,00	985,00	0,61	830,00	396,50	1176,00	680,00	0,13	552,00	337,50	590,50	389,00	0,93
ALT [U/l]	70,00	26,00	79,50	34,00	0,34	120,00	241,00	164,00	83,00	0,52	103,00	22,50	347,00	198,00	0,00	97,00	87,00	113,00	65,50	0,61
Bilirubina [mg/dl]	0,10	100,90	2,00	2,15	1,00	0,10	2,70	2,60	0,90	0,11	0,10	0,00	0,10	0,26	0,70	2,05	0,95	1,65	0,45	0,50
Albumina [g/dl]	4,00	0,10	3,54	0,70	0,02	3,51	0,74	2,51	1,10	0,00	3,50	0,65	2,95	0,95	0,05	3,24	0,24	2,98	0,61	0,02
ALP [U/l]	211,00	40,00	221,50	42,00	0,34	110,00	16,00	190,00	57,00	0,00	119,00	40,00	275,50	42,50	0,00	157,50	142,00	170,00	165,00	0,93

Tabela 33. Wyniki pomiarów biochemicznych w surowicy samców (kontrola M – samce grupy kontrolnej, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p	kontrola M		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ceruloplazmina [g/l]	0,32	0,05	0,08	0,05	0,00	0,37	0,05	0,13	0,02	0,00	0,34	0,07	0,18	0,08	0,00	0,62	0,37	0,21	0,15	0,00
Nf-L [ng/ml]	0,17	0,14	0,27	0,13	0,27	0,17	0,08	0,25	0,06	0,01	0,17	0,14	0,27	0,11	0,16	0,14	0,15	0,28	0,11	0,17
AST [U/L]	800,00	760,00	722,50	454,00	0,85	895,00	366,50	730,00	958,00	0,47	615,00	567,00	1053,00	292,00	0,09	450,00	182,00	733,00	374,50	0,06
ALT [U/L]	70,00	84,00	65,00	78,50	0,85	100,00	35,50	250,00	65,00	0,00	60,00	46,50	630,00	310,00	0,00	69,50	22,00	119,50	281,00	0,02
Bilirubina [mg/dl]	0,10	0,10	0,10	0,10	0,86	0,10	0,20	0,10	2,30	0,59	0,10	0,00	0,63	1,90	0,00	1,70	2,40	0,20	2,20	0,55
Albumina [g/dl]	2,40	0,90	2,65	0,81	0,44	2,10	1,15	2,80	2,01	0,92	2,40	1,40	2,15	0,40	0,35	3,41	0,35	3,05	0,83	0,04
ALP [U/l]	160,00	20,00	195,00	64,00	0,01	96,00	10,00	172,00	30,00	0,01	82,50	21,00	238,00	45,00	0,00	103,50	40,00	186,50	79,50	0,07

Tabela 34. Wyniki pomiarów biochemicznych w surowicy txJ w zależności od płci (txJ F – samice txJ, txJ M – samce txJ)

Wiek (miesiące)	2					4					8					14				
Parametr	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p	txJ F		txJ M		p
	mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR		mediana	IQR	mediana	IQR	
Ceruloplazmina [g/l]	0,11	0,04	0,08	0,05	0,38	0,15	0,06	0,13	0,02	0,18	0,20	0,06	0,18	0,08	0,66	0,12	0,04	0,21	0,15	0,02
Nf-L [ng/ml]	0,30	0,13	0,27	0,13	0,45	0,23	0,31	0,25	0,06	0,96	0,30	0,27	0,27	0,11	0,56	0,32	0,23	0,28	0,11	0,66
AST [U/l]	718,00	486,50	722,50	454,00	0,96	820,00	985,00	730,00	958,00	0,92	1176,00	680,00	1053,00	292,00	0,86	590,50	389,00	733,00	374,50	0,27
ALT [U/l]	79,50	34,00	65,00	78,50	0,79	164,00	83,00	250,00	65,00	0,11	347,00	198,00	630,00	310,00	0,03	113,00	65,50	119,50	281,00	0,67
Bilirubina [mg/dl]	2,00	2,15	0,10	0,10	0,22	2,60	0,90	0,10	2,30	0,03	0,10	0,26	0,63	1,90	0,03	1,65	0,45	0,20	2,20	0,44
Albumina [g/dl]	3,54	0,70	2,65	0,81	0,05	2,51	1,10	2,80	2,01	1,00	2,95	0,95	2,15	0,40	0,06	2,98	0,61	3,41	0,83	0,71
ALP [U/l]	221,50	42,00	195,00	64,00	0,34	190,00	57,00	172,00	30,00	1,00	275,50	42,50	238,00	45,00	0,04	170,00	165,00	186,50	79,50	0,93

Dyskusja

Przedstawione wyniki wskazują u txJ na postępujące, wraz ze starzeniem się zwierząt, uszkodzenie narządów na skutek gromadzenia miedzi. Wyniki pomiarów stężenia miedzi w wątrobach txJ są podobne z wcześniejszymi publikacjami na ten temat [65, 77, 82, 85]. W badaniach Roberts i wsp., stężenie miedzi w wątrobie zmierzone u 1-miesięcznych txJ osiągnęło poziom 30-krotnie przewyższający wartości prawidłowe obserwowane u myszy kontrolnych [78]. U trzymiesięcznych txJ wykazano stężenie miedzi 60-krotnie przewyższające wartości prawidłowe [78]. Wyniki przeprowadzonych przez autora oznaczeń plasują się pomiędzy tymi wartościami. W niniejszym projekcie u zwierząt 2-miesięcznych stężenie miedzi w wątrobie txJ było 40-krotnie wyższe niż w wątrobach myszy kontrolnych. Są to wyniki podobne z powyżej cytowanymi pomimo wykorzystania w badaniach innej metodologii pomiarowej (spektrometria absorpcyjna i TXRF). Nieco inne wartości obserwowano u txR. Rauch i wsp. opisali u myszy 7-tygodniowych stężenie miedzi w wątrobie 10-krotnie przewyższające stężenie zaobserwowane u myszy kontrolnych [65]. Wydaje się, że opisywana różnica w nasileniu gromadzenia miedzi w wątrobie ma bezpośredni związek z odmienną mutacją u txJ i txR i w efekcie z innym wpływem na aktywność *Atp7b* i metabolizm miedzi. Wykazano doświadczalnie, że różne mutacje *ATP7B* mają odmienny wpływ na transport i magazynowanie miedzi, co może prowadzić do odmienności w nasileniu kumulacji miedzi w wątrobie u chorujących na tę samą chorobę [108]. U ludzi pomiar stężenia miedzi w wątrobie wykonywany jest z biopsji gruboigłowej. Wartości powyżej 250 mg/kg, czyli pięciokrotnie wyższe niż referencyjne, przy charakterystycznym przebiegu klinicznym pozwalają na niemal pewne potwierdzenie choroby. Relatywne (txJ/myszy kontrolne) stężenia miedzi w wątrobie, jakie stwierdzono u dwu i czteromiesięcznych txJ były znacznie wyższe niż wartości obserwowane u pacjentów chorych na WD.

Zaobserwowano niższe stężenia miedzi w wątrobie starszych zwierząt txJ w porównaniu do młodszych. W badaniach Roberts i wsp. stężenia miedzi w wątrobie u starszych txJ w wieku około 12 miesięcy także były mniejsze niż w pomiarach wykonanych u zwierząt młodszych [78]. Również w badaniach przeprowadzonych na innym modelu, czyli myszy *Atp7b*^{-/-}, zaobserwowano niższe wartości stężenia miedzi w wątrobie w pomiarach wykonywanych w drugim półroczu życia [20, 84]. Trend niższych wartości stężenia miedzi w wątrobie starszych txJ może wynikać z kilku czynników. Postęp choroby może powodować stopniową utratę zdolności wątroby do gromadzenia miedzi wskutek narastających uszkodzeń

oraz wyczerpania mechanizmów kompensacyjnych [79]. Dodatkowo naturalny proces starzenia u myszy może prowadzić do istotnych zmian w wydalaniu miedzi. U chorych na WD można zaobserwować pewne analogie do wyników otrzymanych u txJ. Dostępne są prace opisujące niższe niż wyjściowo stężenie miedzi w wątrobie u pacjentów z kliniczną progresją choroby [109]. Przedstawiano również wyniki badań, w których w biopsji wątroby uzyskano prawidłowe wartości stężenia miedzi pomimo udowodnionego później ciężkiego przeładowania tego narządu miedzią [110]. Jest to problem na tyle istotny, że w niektórych populacjach, np. u dzieci, wykonywane pomiary okazywały się klinicznie bezużyteczne [111]. Wy tłumaczeniem niższego stężenia miedzi u myszy starych może być zatem nierównomierne rozmieszczenie miedzi w wątrobie w zaawansowanych stadiach choroby. W takiej sytuacji wyniki pomiarów są zwykle zaniżone. Roberts i wsp. wykazali, że w skrajnych przypadkach mogą występować nawet 500-krotne różnice w stężeniu miedzi w różnych regionach wątroby [41]. W badaniach Hachmöllera i wsp. nie zaobserwowano powtarzalnego schematu rozmieszczenia miedzi w obrębie zrazika wątrobowego co dodatkowo faworyzuje teorię losowego rozmieszczenia miedzi w wątrobie [112].

W niniejszej pracy po raz pierwszy przedstawiono profil wątrobowego stężenia wapnia u txJ. Wyniki pomiarów dokonanych u myszy 4-miesięcznych i starszych były wyższe niż w przypadku myszy kontrolnych. Wy tłumaczeniem tych wyników może być pogłębiające się stłuszczenie miększu wątroby u txJ. W przebiegu stłuszczenia wątroby udokumentowano zaburzenia przez błonowego transportu wapnia w obrębie błony komórkowej, jak i retikulum endoplazmatycznego hepatocytów [113]. Skutkuje to występowaniem zaburzeń sygnalizacji wewnątrz- i międzykomórkowej, co doprowadza do akumulacji wapnia i nasila tempo stłuszczenia komórek wątroby. Autorzy badań analizowali również wpływ różnych typów uszkodzeń wątroby na metabolizm wapnia [114]. Wspólną cechą łączącą różne etiologie uszkodzenia wątroby było zaburzenie stężenia wapnia w mitochondriach hepatocytów, co wiązało się z następstwami dysfunkcji przepływu energii i zarządzania jej dystrybucją. Od wysokości stężenia wapnia zależały także dalsze losy komórek, po przekroczeniu wartości progowych wewnętrzne szlaki sygnałowe promowały apoptozę lub martwicę [114].

W wątrobach txJ zaobserwowano także trend do gromadzenia chromu. W grupie 14-miesięcznych txJ zaobserwowano istotne różnice pomiędzy stężeniem chromu w wątrobie u samic i samców, przy czym stężenie chromu u samic było ponad dwukrotnie wyższe (tabela 14). Mało wiadomo o narządowo specyficznym metabolizmie chromu w przebiegu WD. Autor rozprawy odnalazł tylko jedną pracę na temat roli chromu w eksperymentalnym uszkodzeniu wątroby po ekspozycji na metale ciężkie [115].

Profil stężenia żelaza w wątrobach txJ jest podobny z opisem opublikowanym wcześniej przez Allen i wsp. W cytowanym badaniu, istotne różnice zauważalne były jedynie w przypadku myszy najmłodszych. Wartości stężenia żelaza w wątrobach myszy 4-, 7- i >12-miesięcznych nie różniły się istotnie od populacji kontrolnej [116]. W przypadku szczurów LEC udowodniono wyższe stężenie żelaza w wątrobie u chorych gryzoni [50]. Opisano korzystny wpływ flebotomii zmniejszającej przeładowanie wątroby żelazem u LEC [117]. W przypadku ludzi wydaje się, że WD sprzyja zaburzeniom metabolizmu żelaza pod postacią akumulacji Fe w wątrobie [118]. Opisano również korelację zaostrzenia przebiegu klinicznego choroby u chorych na WD ze współistniejącymi zaburzeniami gospodarki żelaza [119]. Stosowane leczenie przeciwmiedziowe poprawia parametry gospodarki żelazowej, ale nie normalizuje metabolizmu żelaza w WD [120]. W badaniach autora w populacji samic txJ wątrobowe stężenie żelaza było wyższe niż w populacji samców. U samców różnice w porównaniu z populacją kontrolną zaczynały być zauważalne u myszy 4-miesięcznych. Warto odnotować, że stężenie żelaza w wątrobie samic txJ niezależnie od wieku utrzymywało się w wyższych zakresach – 170–300 mg/kg. Wartości stężenia żelaza u samców txJ były w niższym zakresie, około 130–170 mg/kg. Różnice mogą być pochodną szczytu aktywności rozrodczej samic, kiedy obserwowane są istotne zmiany stężenia żelaza również w innych narządach [121].

Niewiele obecnie wiadomo na temat wątrobowego stężenia manganu w WD. Pojedyncze opisy sugerują niezaburzoną gospodarkę tym pierwiastkiem w wątrobie [122]. Mając na uwadze opisywane w literaturze zaburzenia metabolizmu manganu skutkujące rozwojem marskości wątroby wraz ze współwystępowaniem zaburzeń jego stężenia w oun, podczas projektowania tego badania zaplanowano ocenę stężenia tego pierwiastka w wątrobie [123]. Z powodu awarii detektora nie było możliwości technicznych wykonania pomiarów. Ten aspekt badań pozostaje jako wart uwzględnienia w przyszłych projektach.

Wyniki stężenia cynku w wątrobie txJ są odmienne od tych zaprezentowanych przez Allen i wsp. [116]. Cytowani autorzy opisali porównywalne stężenia cynku u txJ i grupy kontrolnej. Zaobserwowali oni nieznacznie wyższe stężenie u starszych myszy. W wynikach autora wyraźne różnice, z dwukrotnie wyższym stężeniem cynku w wątrobie txJ, zauważalne były już u myszy 2-miesięcznych, a u zwierząt starszych stężenie cynku u txJ, zwłaszcza u zwierząt 8-miesięcznych było niższe niż u młodszych. Podobnie do wyników Allen natomiast odnotowano istotnie wyższe stężenie cynku w wątrobie 14-miesięcznych txJ. Również w badaniach myszy *Atp7b*^{-/-} opisywano zaburzenia metabolizmu cynku. Oceniano jednak stosunek Cu/Zn a nie stężenie pojedynczych pierwiastków [124]. Meacham i wsp. wskazali na

konieczność interpretacji wyników w połączeniu z analizą stężenia metalotionein, które jak sugerują ich wyniki, są ściśle związane ze zmianami stosunku Cu/Zn w wątrobie. U ludzi stężenie cynku badane w wątrobie i mózgu nie różniło się w tkankach pozyskanych post mortem od chorych na WD w porównaniu z osobami zdrowymi [122].

Próba rzetelnej analizy stężenia niklu w tkankach jest trudna i obarczona dużym błędem z uwagi na wykorzystanie przy preparatyce skalpeli i pęset ze stali chirurgicznej, zanieczyszczających niklem próbki. Problem ten jest znany i był opisywany w kontekście badania biopsatów wątroby uzyskiwanych metodą biopsji gruboigłowej przy zastosowaniu igieł ze stali chirurgicznej [125]. W przypadku potrzeby szczegółowej analizy stężenia niklu w tkankach pochodzenia biologicznego wykorzystywane były narzędzia z innego materiału, na przykład ceramiczne [126]. Wydaje się, że zaobserwowane wahania stężenia niklu wynikają bardziej z zafałszowania wyniku aniżeli z wpływu miedzi na stężenie niklu u txJ.

W niniejszej pracy przedstawiono pierwszy opis wyników badań na temat wpływu choroby Wilsona na zmianę struktury drugorzędowej białek w wątrobie. Największe odchylenia pozycji widma amidu I od fizjologicznej liczby falowej (1655 cm^{-1}) odnotowano w pomiarach u 4- i 8-miesięcznych txJ. Ta różnica, wraz z obserwowanymi zmianami w proporcjach struktury drugorzędowej białek (β -harmonijka/ α -helisa), wydaje się potwierdzać wcześniejsze ustalenia dotyczące uszkodzenia wątroby w chorobie Wilsona. W badaniu z wykorzystaniem linii komórek wątroby *ATP7B* Knock-Out HepG2/C3a zaobserwowano wpływ dysfunkcji *ATP7B* na nieprawidłowy proces fałdowania białek hepatocytów [127]. U txJ okres między 4. a 8. miesiącem życia wydaje się wiązać z dynamiczną progresją zwłóknienia wątroby. Hipoteza dotycząca zależności pomiędzy zaburzeniami metabolizmu miedzi, a nieprawidłowością fałdowania białek została potwierdzona w innych chorobach wątroby [128].

Jednym z początkowych etapów zajęcia wątroby w przebiegu choroby Wilsona jest akumulacja lipidów wewnątrz hepatocytów lub w macierzy zewnątrzkomórkowej wątroby [129]. Wzrost stężenia tłuszczów nasyconych w hepatocytach był obserwowany również w innych chorobach wątroby. [130] Zaprezentowane wyniki wskazujące na istotnie wyższy poziom widm nasyconych lipidów w wątrobie 2-, 4-, 8- i 14-miesięcznych txJ są podobne do wyników badania nad stłuszczeniem wątroby przeprowadzonego na populacji myszy *Atp7b*^{-/-} [131]. Autorzy podkreślili w konkluzji, że istnieje zauważalne histologiczne podobieństwo w przebiegu stłuszczenia wątroby u *Atp7b*^{-/-} do niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby, pomimo przeciwnego kierunku zmian stężenia miedzi. Obraz przedstawionych przez autora zmian jak i tych opisanych u myszy *Atp7b*^{-/-} jest podobny do opisu zaburzeń lipidowych

obserwowanych w WD. Mazi i wsp. zasugerowali, że u podłoża stłuszczenia wątroby w WD leżą przede wszystkim zaburzenia funkcji mitochondriów oraz nieprawidłowe zarządzanie energią w hepatocytach [132]. U txJ profil nasyconych lipidów odzwierciedla postęp stłuszczenia miększu wątroby w przebiegu choroby. Zaobserwowany na każdym etapie choroby istotnie wyższy poziom utlenienia lipidów pojawia się najpewniej jako efekt stresu oksydacyjnego. W badaniach nad nasileniem oksydacyjnej degradacji lipidów u txJ i *Atp7b*^{-/-} stwierdzony został podobny do opisanego powyżej trend nieprawidłowości w metabolizmie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [133]. Obserwacje te są podobne do zaproponowanej przez Sokola hipotezy, w myśl której nadmiar miedzi wywołuje uszkodzenia peroksydacyjne poprzez produkcję wolnych rodników tlenowych i w konsekwencji doprowadza do oksydacyjnego uszkodzenia wątroby [134]. Zwiększoną peroksydację lipidów oraz akumulację miedzi opisał on w mitochondriach i w mniejszym stopniu w mikrosomach wątroby wyciętych od pacjentów chorych na WD leczonych przeszczepieniem wątroby. Produkty peroksydacji lipidów mogą również odgrywać rolę w chemotaksji komórek stanu zapalnego i w zaburzeniach syntezy kolagenu, co nasila progresję włóknienia [135].

Zaobserwowane u txJ niższe stężenie ceruloplazminy jest podobne do wyników innych badaczy [129]. Niskie stężenie ceruloplazminy opisano w dostępnych modelach zwierzęcych WD (LEC, txR, *Atp7b*^{-/-}) [65, 85, 136]. Opisano ponadto zależne od płci różnice w stężeniu ceruloplazminy u ludzi. Stężenie ceruloplazminy jest często wyższe u zdrowych kobiet w porównaniu ze zdrowymi mężczyznami, zwłaszcza u kobiet stosujących doustną antykoncepcję hormonalną [137]. Różnica ta zazwyczaj nie jest znacząca, ale może być bardziej wyraźna w WD. Obserwowano niższe stężenia ceruloplazminy w surowicy u kobiet chorych na WD, szczególnie w postaci bezobjawowej, co jest podobne do przedstawionych wyników u txJ [138]. Wyniki pomiarów AST były porównywalne pomiędzy grupami pomimo jawnej choroby wątroby u txJ. Prawdopodobnie jest to efekt zastosowanej metody pośmiertnego pobrania krwi i wynikającego z hemolizy fałszywego podwyższenia aktywności AST. Bardziej miarodajny wydaje się pomiar aktywności ALT, jako enzymu skąpo reprezentowanego w obrębie erytrocytów i mniej podatnego na wahania wynikające z hemolizy. Obraz uszkodzenia wątroby w początkowych pomiarach jest tylko częściowo podobny do badania przeprowadzonego na myszach *Atp7b*^{-/-}. Aktywność ALT u 6- i 20-tygodniowych myszy 10-krotnie przewyższała normę. Tego zjawiska nie zaobserwowano w prezentowanych wynikach. U 14-miesięcznych txJ zaobserwowano niższą aktywność ALT w porównaniu z pomiarem u myszy 8-miesięcznych. Ta obserwacja jest podobna do opisu *Atp7b*^{-/-}, w którym regeneracyjnej przebudowie guzkowej miększu wątroby towarzyszyły

normalizacja surowiczej aktywności ALT i obniżenie stężenia miedzi w wątrobie [85]. W miarę postępu włóknienia wątroby i rozwijającej się marskości pula prawidłowo funkcjonujących hepatocytów zmniejsza się, co odpowiada za niższe poziomy aktywności ALT obserwowane w zaawansowanych stadiach WD [139].

W niniejszej pracy po raz pierwszy przedstawiono wyniki surowiczego stężenia albuminy u txJ. Z zajęciu wątroby w przebiegu WD zazwyczaj towarzyszą zaburzenia syntezy białek wątrobowych. U pacjentów obserwuje się obniżone osoczowe stężenie albuminy i czynników odpowiedzialnych za proces prawidłowego krzepnięcia krwi. Również u myszy *Atp7b*^{-/-} stężenie albuminy było niższe w porównaniu do zwierząt kontrolnych [140].

Zawartość miedzi w prążkowiach dwumiesięcznych txJ była niższa niż w grupie kontrolnej. Wskutek braku prawidłowego *Atp7b* u txJ zaburzeniu ulega dopłodowy transport miedzi przez łożysko [65]. Najprawdopodobniej stężenie Cu w oun osesków txJ w momencie urodzenia jest skrajnie niskie. Wydaje się, że wyrównanie tych niedoborów wymaga czasu, a pomiar dokonany u 2-miesięcznych txJ odzwierciedla chwilowe osiągnięcie stanu zbliżonego do fizjologicznego. Wyniki pracy Washington-Hughes nad modelem myszy *Atp7b*^{-/-} dokumentują przejściowy spadek stężenia miedzi w mózgach młodych myszy. Autorzy tłumaczą to sekwestracją Cu w nabłonku spłotu naczyńiówkowego lub w ścianach naczyń włosowatych [141]. Zaobserwowane u 14-miesięcznych txJ niższe stężenie miedzi w prążkowie w porównaniu z wartościami u myszy 8-miesięcznych może być wynikiem kilku procesów związanych z patofizjologią WD i ogólnymi mechanizmami akumulacji metali w organizmie. W zaawansowanych etapach WD może dochodzić do upośledzenia mechanizmów kompensacyjnych i postępujących uszkodzeń neuronalnych w prążkowie. Mogą one prowadzić do dysfunkcji lub nawet martwicy neuronów i komórek gleju odpowiedzialnych za magazynowanie i sekwestrację miedzi [142]. W efekcie prowadzi to do zauważalnego zmniejszenia stężenia miedzi, ponieważ uszkodzone komórki nie są w stanie jej już skutecznie zatrzymywać [143]. Wpływ zwiększonej aktywności mechanizmów antyoksydacyjnych takich jak: SOD, peroksydaza glutationowa czy katalaza na ograniczenie stresu oksydacyjnego może poprawiać czasowo metabolizm komórkowy i ograniczać akumulację toksycznych metali, takich jak miedź [144]. Mechanizm ten dodatkowo wspierany poprzez nadekspresję *Atp7a* i proces indukowanej autofagii pozwalał w warunkach eksperymentalnych realnie zmniejszyć stężenie miedzi w oun [145, 146]. Stężenie miedzi w prążkowie różniło się nieznacznie pomiędzy populacjami samców i samic txJ. Niższe wartości obserwowane u samic 4-, 8- i 14-miesięcznych mogą mieć związek z wpływem ochronnym estrogenów [147]. U kobiet w wieku reprodukcyjnym chorych na chorobę Wilsona obrazy MRI prążkowie różnią się od wyników

uzyskanych u chorych mężczyzn, a różnice te zanikają wraz ze wzrostem wieku i są skorelowane z wygaśnięciem aktywności hormonalnej żeńskich gonad [148]. Przyczyna gromadzenia się żelaza w ośrodkowym układzie nerwowym w chorobie Wilsona jest w dużej mierze niejasna. Wiadomo, że enzymy zależne od miedzi odgrywają istotną rolę w metabolizmie żelaza. Ceruloplazmina, która ulega ekspresji również w mózgu jest ferroksoydazą, a utrata jej funkcji prowadzi do akumulacji żelaza w mózgu chorych na WD [149]. Ceruloplazmina może utleniać żelazo dwuwartościowe (Fe^{2+}) do żelaza trójwartościowego (Fe^{3+}), co predysponuje do dalszego wiązania żelaza z transferyną. W badaniach przeprowadzonych u szczurów LEC w wieku 30. i 55. tygodni (czyli około 7. i 12. miesięcy) wykazano w prążkowie podwyższone stężenie zarówno Fe^{2+} (wykorzystano pomiar absorbancji kompleksu Fe^{2+} z ferrozyną), jak i Fe^{3+} [61]. Przeprowadzone dotychczas badania na myszach nie dały tak jednoznacznych rezultatów jak w przypadku szczurów. Zhou i wsp. wykorzystując MRI oraz spektroskopię absorpcji atomowej wykazali wyższe stężenia żelaza w homogenatach jądra soczewkowatego, wzgórza i mózdzku u txR. Nie zaobserwowano jednak różnic w próbkach pochodzących z kory mózgowej ani pnia mózgu [150]. Allen nie zaobserwowała istotnych różnic w stężeniu żelaza w mózgu txJ i myszy kontrolnych [116]. Z uwagi na niejednorodność struktury prążkowiego, składającego się z jądra ogoniastego i skorupy, możliwe jest nierównomierne rozmieszczenie w nich metali. Prawdopodobne wydaje się, że uzyskane przez autora wyniki reprezentują niejako wartość średnią, a unikalne różnice mogą istnieć w wewnętrznych strukturach jąder podkorowych. Różnice zaobserwowano jedynie w przypadku 4-miesięcznych samic txJ, u których stężenie żelaza w prążkowie było niższe niż w grupie kontrolnej. Udowodniono większą skłonność do gromadzenia radioaktywnych atomów żelaza w obrębie jąder podkorowych mózgu (skorupa, gałka błada, jądro ogoniaste, wzgórze) u pacjentów chorych na WD w badaniu PET [151]. Jest to kolejna przesłanka o wpływie mutacji *ATP7B* na zmianę homeostazy żelaza w jądrach podkorowych mózgu. Trwają badania skupiające się na ocenie charakterystyki i roli manganu w chorobach neurodegeneracyjnych. Wydaje się, że głównymi białkami odpowiedzialnymi za transport manganu są współdzielone z jonami żelaza receptor transferyny i transporter jonów dwuwartościowych 1 (DMT1). Pogląd ten bywa też kwestionowany i nie wszyscy badacze zgadzają się z tą hipotezą [152, 153]. Porównując stężenie manganu i żelaza w prążkowiach txJ, można zauważyć trend, w którym u zwierząt 14-miesięcznych wzrostowi stężenia żelaza, towarzyszy obniżenie stężenia manganu wraz z wiekiem. Te wyniki wydają się potwierdzać hipotezę dotyczącą wzajemnego związku pomiędzy stężeniami żelaza i manganu.

Wyraźne zaburzenia zaobserwowano w strukturze biochemicznej prążkowiec txJ. Stężenie białek w prążkowiec 2-miesięcznych txJ było niższe niż w grupie myszy kontrolnych. Największe aberracje strukturalne i zaburzenia fałdowania białek zaobserwowano w prążkowiec 14-miesięcznych txJ. W niniejszej pracy przedstawiono pierwszy opis degradacji białek oun w populacji txJ. Po raz pierwszy zaprezentowano również wyniki hybrydowego mapowania składu pierwiastkowego i organicznego oun txJ. Stosunkowo jednorodnej dystrybucji miedzi i cynku w przekroju oun myszy towarzyszyły wspomniane powyżej zaburzenia struktury białek mózgu, najsilniej wyrażone przestrzennie wokół prążkowiec i wzgórza (Mapa 3).

Odzwierciedleniem uszkodzenia oun u myszy txJ są nie tylko wyniki badań biochemicznych dyskutowanych powyżej, ale również stężenie neurofilamentów. Stężenie Nf-L w surowicy 4-miesięcznych txJ było znamienne wyższe niż w grupie kontrolnej. Istotnie wyższe niż u kontroli stężenie miedzi w prążkowiec txJ zaobserwowano dopiero u zwierząt 8-miesięcznych. Wzrost surowiczego stężenia neurofilamentów wyprzedzał w czasie uchwytne w badaniach podwyższone stężenie miedzi i zmiany biochemiczne zaobserwowane w prążkowiec txJ. Wydaje się, że zmiany stężenia neurofilamentów współwystępowały w czasie razem z pojawieniem się pierwszych uchwytnych zmian biochemicznych w wątrobie. Neurofilamenty to białka strukturalne wchodzące w skład cytoszkieletu neuronów. Stężenie Nf-L jest znacząco podwyższone w różnych chorobach neurologicznych, przebiegających z neurodegeneracją [154]. Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy dotyczące surowiczego stężenia neurofilamentów w populacji txJ są podobne do wyników zaprezentowanych w badaniu Zhou i wsp., którzy wykazali u txJ obniżoną zawartość białka neurofilamentów (68 kDa) w istocie białej i szarej mózgu myszy 6- i 14-miesięcznych [150]. Podobieństwo zauważyć można również do wyników badań Shribmana opisujących pomiary stężenia Nf-L w przebiegu WD [155].

U chorych na WD wykazano gromadzenie miedzi w sercu co jest obserwacją podobną do zaprezentowanych wyżej wyników [156]. Udokumentowano występujące wtórnie cechy niewydolności serca: koncentryczny przerost mięśnia sercowego i upośledzenie relaksacji lewej komory [27]. Opisywano także dyskretne zmiany w zapisie elektrokardiograficznym u chorych na WD, zwłaszcza większą częstość występowania migotania przedsionków [29]. Te obserwacje potwierdzają niekorzystny wpływ zaburzeń metabolizmu miedzi na serce [157]. W porównaniu ze zdrowymi osobami pacjenci z WD mieli zmniejszone globalne odkształcenie okrężne mięśnia lewej komory (LV-GCS). Wykazano również nieprawidłowości pod postacią miejscowego, a niekiedy rozlanego włóknienia mięśnia sercowego [28]. Pacjenci z postacią neurologiczną prezentowali bardziej zaawansowane cechy przebudowy strukturalnej i większe

upośledzenie funkcji hemodynamicznej w porównaniu z pacjentami bez objawów neurologicznych [158]. W niniejszej pracy po raz pierwszy opisano wpływ mutacji *Atp7b* na stężenie wapnia w mięśniu sercowym txJ. Nie opublikowano prac opisujących stężenie wapnia w sercu pacjentów z WD. Istnieją jednak opisy kardiomiopatii w przebiegu WD, a zaburzenia stężenia wapnia są istotną składową patomechanizmu rozwoju kardiomiopatii [159].

Dwunastnica i proksymalna część jelita czczego to główne miejsca wchłaniania miedzi. Transporter miedzi 1 (CTR1), zlokalizowany głównie na błonie szczytowej enterocytów, odpowiada za import Cu^+ ze światła jelita [160]. Ponieważ CTR1 nie jest zdolny do transportu miedzi w formie dwuwartościowej, zaproponowano kilka alternatywnych szlaków wchłaniania miedzi, w tym wspomniany wcześniej transporter DMT1, endocytozę, wymianę anionową oraz transport aminokwasów zależny od sodu [161, 162]. Najlepiej zbadanym białkiem zaangażowanym w eksport miedzi z enterocytów do krążenia wrotnego jest ATP7A, które znajduje się głównie na błonie podstawno-bocznej, komórek nabłonkowych jelita [163]. Rola ATP7B w jelicie pozostaje niejasna, ale wydaje się, że białko to odpowiada za sekwestrację miedzi wewnątrzkomórkowej w pęcherzykach endocytarnych oraz jej ponowne uwalnianie z enterocytu do światła jelita [164, 165]. Wysokie stężenie miedzi w ścianie dwunastnicy txJ może być skutkiem dysfunkcji ATP7B w zakresie apikalnego eksportu miedzi. Alternatywnym wytłumaczeniem jest udział metalotionein, wiążących nadmiar miedzi [2, 166].

Zaobserwowane wyższe stężenie miedzi w oczach txJ, zmierzone za pomocą TXRF, jest nowoodkrytym podobieństwem modelu txJ do objawów choroby Wilsona u ludzi. U jednomiesięcznych myszy *Atp7b*^{-/-} nie wykazano akumulacji miedzi w gałkach ocznych mutantów. [84] Warto wspomnieć o zaobserwowanej różnicy pomiędzy stężeniem miedzi w gałce ocznej samic i samców txJ. Wyższe stężenie zaobserwowano u samic 8-miesięcznych. Wyniki te są podobne do opisu zmian zaobserwowanych w MRI u pacjentek chorych na WD [112]. Zmiany stężenia manganu w gałce ocznej są podobne z trendem opisanym dla prądkowia i dwunastnicy. Opublikowano badania sugerujące związek występowania retinopatii z chorobą Wilsona wtórnie do zaburzeń metabolizmu żelaza i manganu [167].

Podczas gdy ilość miedzi w wątrobie i dwunastnicy była większa już u dwumiesięcznych txJ, w porównaniu do kontroli, zawartość miedzi w mózgu, sercu czy oku u txJ była istotnie wyższa dopiero u zwierząt ośmiomiesięcznych. Wydaje się, że taki obraz może być związany z naturalnym przebiegiem choroby. Dwunastnica jest narządem odpowiedzialnym za dostarczanie miedzi do organizmu poprzez jej wchłanianie z pokarmu. Następnie miedź drogą krążenia wrotnego jest transportowana do wątroby, gdzie skutek dysfunkcji *Atp7b* nie może zostać właściwie wykorzystana ani wydalona i gromadzi się

w nadmiarze. Badania obrazowe przeprowadzone u ludzi z wykorzystaniem podanego doustnie, izotopu miedzi Cu-64 wykazały jego akumulację w wątrobie, ale nie w osoczu czy w mózgu, co również może wyjaśniać zaistniałe opóźnienie w akumulacji miedzi w prądkowiu txJ [141]. Osoczowe stężenie neurofilamentów było podwyższone u myszy 4-miesięcznych co koreluje czasowo z zaobserwowanymi zmianami biochemicznymi w wątrobie. Możliwe jest, że czas pomiędzy 4 a 8 miesiącem życia txJ jest krytycznym momentem, w którym wyczerpują się wątrobowe mechanizmy spichrzeniowe i zaczyna ujawniać się toksyczny wpływ nagromadzonej miedzi. Pierwotnie zakładano, że po przekroczeniu zdolności kompensacyjnych miedź zaczyna „przelewać” do krążenia systemowego i gromadzi się w innych niż wątroba narządach [168]. Może to tłumaczyć zaobserwowane w tym projekcie i wspomniane powyżej opóźnienia. Prace Lutsenko i wsp. zwracają również uwagę na zmienione w WD mechanizmy transportu miedzi i wynikającą z tego zróżnicowaną ekspozycję narządów na jej uszkadzający wpływ [169]. Przyczynia się to do występowania nieliniowych zależności pomiędzy stężeniami miedzi a wiekiem i utrudnia szczegółowe wnioskowanie uniemożliwiając na obecnym etapie wiedzy pełne zrozumienie mechanizmów regulujących metabolizm miedzi.

Wnioski

1. U myszy txJ na skutek mutacji w genie *Atp7b* dochodzi do zmiany składu pierwiastków, białek i tłuszczów w wątrobie i mózgu. Zaburzeniu ulega wątrobowy proces fałdowania białek. Następuje wzrost stężenia nasyconych kwasów tłuszczowych i nasilenie degradacji lipidów w wątrobie. W mózgu dochodzi do stopniowego, jednorodnego gromadzenia się miedzi i postępującego zaburzenia fałdowania białek i zmian składu - form α i β , które najsilniej obserwowalne są w prążkowie i wzgórzu. W sercu, dwunastnicy i oku w miarę postępu choroby dochodzi do zmiany profilu pierwiastkowego.
2. W modelu txJ przebieg choroby był inny u samic i u samców. Stężenie metali (Ca, Cr, Fe, Cu, Zn) w wątrobie samców 2-, 4- i 14-miesięcznych txJ było istotnie niższe niż u samic txJ. U samców 8-miesięcznych aktywność ALT i fosfatazy alkalicznej oraz stężenie bilirubiny wskazywały na cięższy przebieg choroby. Zaburzenie struktury drugorzędowej białek w prążkowie 4-miesięcznych samców txJ było bardziej nasilone niż u samic, podobnie zawartość tłuszczów nasyconych w prążkowie samców była większa.
3. Oznaczenie osoczowego stężenia neurofilamentów może być obiecującym markerem neurodegeneracji u myszy.
4. Zmiany zaobserwowane u txJ są podobne do objawów i wyników badań ludzi chorych na WD.

Piśmiennictwo

1. Henckens, M.L.C.M. and E. Worrell, *Reviewing the availability of copper and nickel for future generations. The balance between production growth, sustainability and recycling rates*. Journal of Cleaner Production, 2020. **264**: p. 121460.
2. Doguer, C., J.H. Ha, and J.F. Collins, *Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver*. Compr Physiol, 2018. **8**(4): p. 1433-1461.
3. EFSA Panel on Dietetic Products, N. and Allergies, *Scientific Opinion on Dietary Reference Values for copper*. EFSA Journal, 2015. **13**(10): p. 4253.
4. Wilson, S.K., *Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver*. Brain, 1912. **34**(4): p. 295-507.
5. Hall, H.C., *La dégénérescence hépato-lenticulaire: maladie de Wilson, pseudo-sclérose*. 1921: Masson.
6. Yamaguchi, Y., M.E. Heiny, and J.D. Gitlin, *Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **197**(1): p. 271-7.
7. Tanzi, R.E., et al., *The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene*. Nat Genet, 1993. **5**(4): p. 344-50.
8. Bull, P.C., et al., *The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene*. Nat Genet, 1993. **5**(4): p. 327-37.
9. Kalach, N., et al., *Acute Liver Failure from Wilson's Disease in a Five-Year-Old Child*. Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology, 1993. **7**(8): p. 508674.
10. Ala, A., et al., *Wilson disease in septuagenarian siblings: Raising the bar for diagnosis*. Hepatology, 2005. **41**(3): p. 668-70.
11. Ferenci, P., et al., *Age and Sex but Not ATP7B Genotype Effectively Influence the Clinical Phenotype of Wilson Disease*. Hepatology, 2019. **69**(4): p. 1464-1476.
12. Marcellini, M., et al., *Treatment of Wilson's disease with zinc from the time of diagnosis in pediatric patients: a single-hospital, 10-year follow-up study*. J Lab Clin Med, 2005. **145**(3): p. 139-43.
13. Burghart, L., et al., *Portal hypertension and its prognostic implications in patients with Wilson's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2024. **60**(2): p. 257-266.
14. Ferenci, P., et al., *Encephalopathy in Wilson disease: copper toxicity or liver failure?* J Clin Exp Hepatol, 2015. **5**(Suppl 1): p. S88-95.
15. Louissaint, J., S. Deutsch-Link, and E.B. Tapper, *Changing Epidemiology of Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2022. **20**(8s): p. S1-s8.
16. Hartleb, M., *Encefalopatia wątrobowa u chorych z marskością wątroby*. Gastroenterologia Kliniczna. Postępy i Standardy, 2013. **5**(2-3): p. 106-122.
17. Liver, E.A.f.t.S.o.T., *EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure*. Journal of hepatology, 2017. **66**(5): p. 1047-1081.
18. Gow, P.J., et al., *Etiology and outcome of fulminant hepatic failure managed at an Australian liver transplant unit*. J Gastroenterol Hepatol, 2004. **19**(2): p. 154-9.
19. Bostroem, A., *Über eine enterotoxische gleichartige Affektion der Leber und des Gehirns*. Fortschr. Med, 1914. **32**(8): p. 9.
20. Lucena-Valera, A., P. Ruz-Zafra, and J. Ampuero, *Wilson's disease: overview*. Med Clin (Barc), 2023. **160**(6): p. 261-267.
21. Litwin, T., et al., *Tackling the neurological manifestations in Wilson's disease - currently available treatment options*. Expert Rev Neurother, 2023. **23**(12): p. 1249-1259.

22. Litwin, T., et al., *Psychiatric manifestations in Wilson's disease: possibilities and difficulties for treatment*. Ther Adv Psychopharmacol, 2018. **8**(7): p. 199-211.
23. Dang, J., et al., *Kidney involvement in Wilson's disease: a review of the literature*. Clin Kidney J, 2024. **17**(4): p. sfae058.
24. Schilsky, M.L. and P.K. Mistry, *Chapter 42 - Wilson Disease and the Kidney*, in *Genetic Diseases of the Kidney*, R.P. Lifton, et al., Editors. 2009, Academic Press: San Diego. p. 709-713.
25. Rey, R.M., et al., *Prevalence and short-term outcome of hepatorenal syndrome: A 9-year experience in a high-complexity hospital in Colombia*. PLoS One, 2020. **15**(10): p. e0239834.
26. Ishak, R. and O. Abbas, *Penicillamine revisited: historic overview and review of the clinical uses and cutaneous adverse effects*. Am J Clin Dermatol, 2013. **14**(3): p. 223-33.
27. Kuan, P., *Cardiac Wilson's disease*. Chest, 1987. **91**(4): p. 579-83.
28. Chevalier, K., et al., *Cardiac involvement in Wilson disease: Review of the literature and description of three cases of sudden death*. J Inherit Metab Dis, 2021. **44**(5): p. 1099-1112.
29. Buksińska-Lisik, M., et al., *Cardiac assessment in Wilson's disease patients based on electrocardiography and echocardiography examination*. Arch Med Sci, 2019. **15**(4): p. 857-864.
30. Grandis, D.J., et al., *Wilson's Disease and Cardiac Myopathy*. American Journal of Cardiology, 2017. **120**(11): p. 2056-2060.
31. Kayser, B., *Über einen Fall von angeborener grünlicher Verfärbung der Cornea*. Klin Monatsbl Augenheilkd, 1902. **40**: p. 22-25.
32. Dzieżyc-Jaworska, K., T. Litwin, and A. Członkowska, *Clinical manifestations of Wilson disease in organs other than the liver and brain*. Ann Transl Med, 2019. **7**(Suppl 2): p. S62.
33. Pandey, N., K. Blair, and S. John, *Kayser-Fleischer Ring*, in *StatPearls*. 2025, StatPearls Publishing

Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

34. Ceresara, G., et al., *Study of Corneal Copper Deposits in Wilson's Disease by in vivo Confocal Microscopy*. Ophthalmologica, 2013. **231**(3): p. 147-152.
35. Broniek-Kowalik, K., et al., *Anterior segment optical coherence tomography (AS-OCT) as a new method of detecting copper deposits forming the Kayser-Fleischer ring in patients with Wilson disease*. Acta Ophthalmol, 2019. **97**(5): p. e757-e760.
36. Rath, A., et al., *Optical coherence tomography of the Kayser-Fleischer ring: an ancillary diagnostic tool for Wilson's disease in children*. BMJ Case Reports, 2017. **2017**: p. bcr-2017-220007.
37. Grudeva-Popova, J., et al., *Acute hemolytic anemia as an initial clinical manifestation of Wilson's disease*. Folia Medica, 2000. **42**(2): p. 42-46.
38. Xu, Z. and B.R. Berry, *Oxidative hemolysis due to Wilson disease*. Blood, 2019. **134**(7): p. 657.
39. Ferenci, P., et al., *Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease*. Liver International, 2003. **23**(3): p. 139-142.
40. Quemeneur, A.-S., et al., *Musculoskeletal conditions associated with Wilson's disease*. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2011. **25**(5): p. 627-636.
41. Roberts, E.A. and M.L. Schilsky, *Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update*. Hepatology, 2008. **47**(6): p. 2089-111.

42. Woimant, F., N. Djebrani-Oussedik, and A. Poujois, *New tools for Wilson's disease diagnosis: Exchangeable copper fraction*. Annals of translational medicine, 2019. **7**(Suppl 2): p. S70.
43. El Balkhi, S., et al., *Relative exchangeable copper: A new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis*. Clinica Chimica Acta, 2011. **412**(23): p. 2254-2260.
44. Członkowska, A., et al., *Accuracy of the radioactive copper incorporation test in the diagnosis of Wilson disease*. Liver Int, 2018. **38**(10): p. 1860-1866.
45. Alkhatabi, A., et al., *Novel Variants Associated with Wilson Disease in Saudi Families*. 2022. **8**.
46. Walshe, J.M., *Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease*. Am J Med, 1956. **21**(4): p. 487-95.
47. Leng, Y., et al., *Long-Term Correction of Copper Metabolism in Wilson's Disease Mice with AAV8 Vector Delivering Truncated ATP7B*. Hum Gene Ther, 2019. **30**(12): p. 1494-1504.
48. Jong-Hon, K., et al., *Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in Long-Evans cinnamon rats with hereditary hepatitis by the administration of D-penicillamine*. Hepatology, 1993. **18**(3): p. 614-20.
49. Medici, V., et al., *Efficacy of zinc supplementation in preventing acute hepatitis in Long-Evans Cinnamon rats*. Liver Int, 2005. **25**(4): p. 888-95.
50. Kato, J., et al., *Abnormal hepatic iron accumulation in LEC rats*. Jpn J Cancer Res, 1993. **84**(3): p. 219-22.
51. Klein, D., et al., *Gene expression in the liver of Long-Evans cinnamon rats during the development of hepatitis*. Arch Toxicol, 2003. **77**(10): p. 568-75.
52. Schilsky, M.L., et al., *Spontaneous cholangiofibrosis in Long-Evans Cinnamon rats: a rodent model for Wilson's disease*. Lab Anim Sci, 1998. **48**(2): p. 156-61.
53. Samuele, A., et al., *Oxidative stress and pro-apoptotic conditions in a rodent model of Wilson's disease*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1741**(3): p. 325-30.
54. Sternlieb, I., et al., *An array of mitochondrial alterations in the hepatocytes of Long-Evans Cinnamon rats*. Hepatology, 1995. **22**(6): p. 1782-7.
55. Lee, B.H., et al., *Proteomic analysis of the hepatic tissue of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats according to the natural course of Wilson disease*. Proteomics, 2011. **11**(18): p. 3698-705.
56. Zischka, H. and J. Lichtmannegger, *Pathological mitochondrial copper overload in livers of Wilson's disease patients and related animal models*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1315**: p. 6-15.
57. Levy, E., et al., *Abnormal hepatobiliary and circulating lipid metabolism in the Long-Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease*. Life Sci, 2007. **80**(16): p. 1472-83.
58. Jia, G., C. Tohyama, and H. Sone, *DNA damage triggers imbalance of proliferation and apoptosis during development of preneoplastic foci in the liver of Long-Evans Cinnamon rats*. Int J Oncol, 2002. **21**(4): p. 755-761.
59. Hayashi, M., et al., *Accumulation of copper induces DNA strand breaks in brain cells of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, an animal model for human Wilson Disease*. Exp Anim, 2006. **55**(5): p. 419-26.
60. Lee, B.H., et al., *The early molecular processes underlying the neurological manifestations of an animal model of Wilson's disease*. Metallomics, 2013. **5**(5): p. 532-40.
61. Kim, J.M., et al., *Ferrous and ferric iron accumulates in the brain of aged Long-Evans Cinnamon rats, an animal model of Wilson's disease*. Neurosci Lett, 2005. **382**(1-2): p. 143-7.

62. Fujiwara, N., et al., *Effects of copper metabolism on neurological functions in Wistar and Wilson's disease model rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**(3): p. 1079-86.
63. Ahmed, S., J. Deng, and J. Borjigin, *A new strain of rat for functional analysis of PINA*. Molecular Brain Research, 2005. **137**(1): p. 63-69.
64. Lichtmannegger, J., et al., *Methanobactin reverses acute liver failure in a rat model of Wilson disease*. J Clin Invest, 2016. **126**(7): p. 2721-35.
65. Rauch, H., *Toxic milk, a new mutation affecting copper metabolism in the mouse*. J Hered, 1983. **74**(3): p. 141-4.
66. Michalczyk, A.A., et al., *Defective localization of the Wilson disease protein (ATP7B) in the mammary gland of the toxic milk mouse and the effects of copper supplementation*. Biochem J, 2000. **352 Pt 2**(Pt 2): p. 565-71.
67. Dorea, J.G., *Iron and copper in human milk*. Nutrition, 2000. **16**(3): p. 209-20.
68. Rauch, H. and A.J. Wells, *The toxic milk mutation, tx, which results in a condition resembling Wilson disease in humans, is linked to mouse chromosome 8*. Genomics, 1995. **29**(2): p. 551-2.
69. Theophilos, M.B., D.W. Cox, and J.F. Mercer, *The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(10): p. 1619-24.
70. La Fontaine, S., et al., *Effect of the toxic milk mutation (tx) on the function and intracellular localization of Wnd, the murine homologue of the Wilson copper ATPase*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(4): p. 361-70.
71. Huster, D., et al., *Defective cellular localization of mutant ATP7B in Wilson's disease patients and hepatoma cell lines*. Gastroenterology, 2003. **124**(2): p. 335-45.
72. Huster, D., et al., *Diverse functional properties of Wilson disease ATP7B variants*. Gastroenterology, 2012. **142**(4): p. 947-956.e5.
73. Gitlin, J.D., *Wilson disease*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1868-77.
74. Howell, J.M. and J.F. Mercer, *The pathology and trace element status of the toxic milk mutant mouse*. J Comp Pathol, 1994. **110**(1): p. 37-47.
75. Ono, S., D.J. Koropatnick, and M.G. Cherian, *Regional brain distribution of metallothionein, zinc and copper in toxic milk mutant and transgenic mice*. Toxicology, 1997. **124**(1): p. 1-10.
76. Czachor, J.D., M.G. Cherian, and J. Koropatnick, *Reduction of copper and metallothionein in toxic milk mice by tetrathiomolybdate, but not deferiprone*. J Inorg Biochem, 2002. **88**(2): p. 213-22.
77. Coronado, V., M. Nanji, and D.W. Cox, *The Jackson toxic milk mouse as a model for copper loading*. Mamm Genome, 2001. **12**(10): p. 793-5.
78. Roberts, E.A., B.H. Robinson, and S. Yang, *Mitochondrial structure and function in the untreated Jackson toxic milk (tx-j) mouse, a model for Wilson disease*. Mol Genet Metab, 2008. **93**(1): p. 54-65.
79. Le, A., et al., *Characterization of timed changes in hepatic copper concentrations, methionine metabolism, gene expression, and global DNA methylation in the Jackson toxic milk mouse model of Wilson disease*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(5): p. 8004-23.
80. Terwel, D., et al., *Neuroinflammatory and behavioural changes in the Atp7B mutant mouse model of Wilson's disease*. J Neurochem, 2011. **118**(1): p. 105-12.
81. Medici, V., et al., *Wilson's disease: changes in methionine metabolism and inflammation affect global DNA methylation in early liver disease*. Hepatology, 2013. **57**(2): p. 555-65.
82. Przybyłkowski, A., et al., *Neurochemical and behavioral characteristics of toxic milk mice: an animal model of Wilson's disease*. Neurochem Res, 2013. **38**(10): p. 2037-45.

83. Chen, D.B., et al., *Penicillamine increases free copper and enhances oxidative stress in the brain of toxic milk mice*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37709.
84. Buiakova, O.I., et al., *Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(9): p. 1665-71.
85. Huster, D., et al., *Consequences of copper accumulation in the livers of the Atp7b^{-/-} (Wilson disease gene) knockout mice*. Am J Pathol, 2006. **168**(2): p. 423-34.
86. Gray, L.W., et al., *Urinary copper elevation in a mouse model of Wilson's disease is a regulated process to specifically decrease the hepatic copper load*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38327.
87. Huster, D., et al., *High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): p. 8343-55.
88. Burkhead, J.L., et al., *Elevated copper remodels hepatic RNA processing machinery in the mouse model of Wilson's disease*. J Mol Biol, 2011. **406**(1): p. 44-58.
89. Wilmarth, P.A., et al., *A systems approach implicates nuclear receptor targeting in the Atp7b^{-/-} mouse model of Wilson's disease*. Metallomics, 2012. **4**(7): p. 660-8.
90. Hamilton, J.P., et al., *Activation of liver X receptor/retinoid X receptor pathway ameliorates liver disease in Atp7B^{-/-} (Wilson disease) mice*. Hepatology, 2016. **63**(6): p. 1828-41.
91. Ralle, M., et al., *Wilson disease at a single cell level: intracellular copper trafficking activates compartment-specific responses in hepatocytes*. J Biol Chem, 2010. **285**(40): p. 30875-83.
92. Sauer, S.W., et al., *Severe dysfunction of respiratory chain and cholesterol metabolism in Atp7b^{-/-} mice as a model for Wilson disease*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(12): p. 1607-15.
93. Yurkova, I.L., et al., *Fragmentation of mitochondrial cardiolipin by copper ions in the Atp7b^{-/-} mouse model of Wilson's disease*. Chem Phys Lipids, 2011. **164**(5): p. 393-400.
94. Boaru, S.G., et al., *Simultaneous monitoring of cerebral metal accumulation in an experimental model of Wilson's disease by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*. BMC Neurosci, 2014. **15**: p. 98.
95. Washington-Hughes, C.L., et al., *Atp7b-dependent choroid plexus dysfunction causes transient copper deficit and metabolic changes in the developing mouse brain*. PLoS Genet, 2023. **19**(1): p. e1010558.
96. Fieten, H., et al., *Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism*. Mammalian Genome, 2012. **23**: p. 62-75.
97. van De Sluis, B., et al., *Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population*. Human molecular genetics, 2002. **11**(2): p. 165-173.
98. Fieten, H., et al., *New canine models of copper toxicosis: diagnosis, treatment, and genetics*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1314**: p. 42-8.
99. Fieten, H., et al., *The Menkes and Wilson disease genes counteract in copper toxicosis in Labrador retrievers: a new canine model for copper-metabolism disorders*. Disease models & mechanisms, 2016. **9**(1): p. 25-38.
100. Hoffmann, G., et al., *Copper-associated chronic hepatitis in Labrador Retrievers*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2006. **20**(4): p. 856-861.
101. Reed, E., S. Lutsenko, and O. Bandmann, *Animal models of Wilson disease*. J Neurochem, 2018. **146**(4): p. 356-373.

102. Chang, N., et al., *Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos*. Cell Res, 2013. **23**(4): p. 465-72.
103. Mi, X., et al., *Activation of HIF-1 signaling ameliorates liver steatosis in zebrafish *atp7b* deficiency (Wilson's disease) models*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020. **1866**(10): p. 165842.
104. Wu, Y., et al., *Atp7b deficiency induces zebrafish eye developmental defects*. Metallomics, 2023. **15**(5).
105. Yoneda, Y. and T. Horiuchi, *Optical Flats for Use in X-Ray Spectrochemical Microanalysis*. Review of Scientific Instruments, 1971. **42**(7): p. 1069-1070.
106. Schosinsky, K.H., H.P. Lehmann, and M.F. Beeler, *Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride*. Clin Chem, 1974. **20**(12): p. 1556-63.
107. Schumann, G., et al., *IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 C. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Scientific Division, Committee on Reference Systems of Enzymes (C-RSE) I*. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2011. **49**(9): p. 1439-1446.
108. Dong, Y., et al., *Spectrum and Classification of ATP7B Variants in a Large Cohort of Chinese Patients with Wilson's Disease Guides Genetic Diagnosis*. Theranostics, 2016. **6**(5): p. 638-49.
109. Ferenci, P., et al., *Diagnostic value of quantitative hepatic copper determination in patients with Wilson's Disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005. **3**(8): p. 811-8.
110. Song, Y.-M. and M.-D. Chen, *A single determination of liver copper concentration may misdiagnose Wilson's disease*. Clinical Biochemistry, 2000. **33**(7): p. 589-590.
111. Nooijen, J.L., et al., *Possible errors in sampling percutaneous liver biopsies for determination of trace element status: application to patients with primary biliary cirrhosis*. Clin Chim Acta, 1981. **113**(3): p. 335-8.
112. Hachmöller, O., et al., *Elemental bioimaging and speciation analysis for the investigation of Wilson's disease using μ XRF and XANES*. Metallomics, 2016. **8**(7): p. 648-53.
113. Wilson, C.H., et al., *Steatosis inhibits liver cell store-operated Ca^{2+} entry and reduces ER Ca^{2+} through a protein kinase C-dependent mechanism*. Biochem J, 2015. **466**(2): p. 379-90.
114. Oliva-Vilarnau, N., et al., *Calcium Signaling in Liver Injury and Regeneration*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 192.
115. Teschke, R., *Aluminum, Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium, Cobalt, Copper, Iron, Lead, Mercury, Molybdenum, Nickel, Platinum, Thallium, Titanium, Vanadium, and Zinc: Molecular Aspects in Experimental Liver Injury*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(20).
116. Allen, K.J., et al., *Chronological changes in tissue copper, zinc and iron in the toxic milk mouse and effects of copper loading*. Biometals, 2006. **19**(5): p. 555-64.
117. Hayashi, H., S. Wakusawa, and M. Yano, *Iron removal by phlebotomy for the prophylaxis of fulminant hepatitis in a Wilson disease model of Long-Evans Cinnamon Rats*. Hepatology Research, 2006. **35**(4): p. 276-280.
118. Chandarana, H., et al., *Hepatic iron deposition in patients with liver disease: preliminary experience with breath-hold multiecho T2*-weighted sequence*. AJR Am J Roentgenol, 2009. **193**(5): p. 1261-7.
119. Pfeifferberger, J., et al., *Iron metabolism and the role of HFE gene polymorphisms in Wilson disease*. Liver Int, 2012. **32**(1): p. 165-70.

120. Gromadzka, G., et al., *Iron metabolism is disturbed and anti-copper treatment improves but does not normalize iron metabolism in Wilson's disease*. *Biometals*, 2021. **34**(2): p. 407-414.
121. Hahn, P., et al., *Age-dependent and gender-specific changes in mouse tissue iron by strain*. *Exp Gerontol*, 2009. **44**(9): p. 594-600.
122. Leu, M.L., G.T. Strickland, and S.J. Yeh, *Tissue copper, zinc, and manganese levels in Wilson's disease: Studies with the use of neutron activation analysis*. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1971. **77**(3): p. 438-444.
123. Stamelou, M. and K.P. Bhatia, *A new treatable genetic disorder of manganese metabolism causing dystonia-parkinsonism and cirrhosis: The "New" Wilson's disease?* *Movement Disorders*, 2012. **27**(8): p. 962-962.
124. Meacham, K.A., et al., *Altered zinc balance in the Atp7b(-/-) mouse reveals a mechanism of copper toxicity in Wilson disease*. *Metallomics*, 2018. **10**(11): p. 1595-1606.
125. Varga, I., *Assessment of the contamination problems resulting from the use of stainless steel needles in liver biopsies by total reflection X-ray fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2006. **61**(10): p. 1201-1204.
126. Boyd, A. and S. Hylwa, *Nickel release from surgical instruments and operating room equipment*. *Dermatology online journal*, 2018. **24**.
127. Charbonnier, P., et al., *ATP7B-Deficient Hepatocytes Reveal the Importance of Protein Misfolding Induced at Low Copper Concentration*. *Cells*, 2022. **11**: p. 3400.
128. Lukas, J., et al., *Role of endoplasmic reticulum stress and protein misfolding in disorders of the liver and pancreas*. *Advances in Medical Sciences*, 2019. **64**: p. 315-323.
129. Mazi, T.A., et al., *Dysregulated Choline, Methionine, and Aromatic Amino Acid Metabolism in Patients with Wilson Disease: Exploratory Metabolomic Profiling and Implications for Hepatic and Neurologic Phenotypes*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(23).
130. Zámbo, V., et al., *Lipotoxicity in the liver*. *World J Hepatol*, 2013. **5**(10): p. 550-7.
131. Wooton-Kee, C.R., et al., *Metabolic dysregulation in the Atp7b(-/-) Wilson's disease mouse model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(4): p. 2076-2083.
132. Mazi, T.A., N.M. Shibata, and V. Medici, *Lipid and energy metabolism in Wilson disease*. *Liver Res*, 2020. **4**(1): p. 5-14.
133. Mazi, T.A., et al., *Hepatic oxylipin profiles in mouse models of Wilson disease: New insights into early hepatic manifestations*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2024. **1869**(2): p. 159446.
134. Sokol, R.J., et al., *Oxidant injury to hepatic mitochondria in patients with Wilson's disease and Bedlington terriers with copper toxicosis*. *Gastroenterology*, 1994. **107**(6): p. 1788-1798.
135. Allameh, A., et al., *Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease*. *Antioxidants (Basel)*, 2023. **12**(9).
136. Kodama, H., et al., *Copper and ceruloplasmin metabolism in the LEC rat, an animal model for Wilson disease*. *J Inherit Metab Dis*, 1998. **21**(3): p. 203-6.
137. Pelucchi, S., et al., *Reference Values of Ceruloplasmin across the Adult Age Range in a Large Italian Healthy Population*. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 2024. **9**(6): p. 1053-1063.
138. Lu, X., et al., *Assessment of the diagnostic value of serum ceruloplasmin for Wilson's disease in children*. *BMC Gastroenterology*, 2022. **22**(1): p. 124.
139. Kim, W.R., et al., *Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease*. *Hepatology*, 2008. **47**(4): p. 1363-70.

140. !!! INVALID CITATION !!! 131.
141. Peng, F., et al., *Positron emission tomography of copper metabolism in the Atp7b^{-/-} knock-out mouse model of Wilson's disease*. Mol Imaging Biol, 2012. **14**(1): p. 70-8.
142. Gromadzka, G., et al., *The Role of Glia in Wilson's Disease: Clinical, Neuroimaging, Neuropathological and Molecular Perspectives*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(14).
143. Bronson, R., H. Sweet, and M. Davisson, *Acute cerebral neuronal necrosis in copper deficient offspring of female mice with the toxic milk mutation*. Mouse Genome, 1995. **93**(1): p. 152-154.
144. Kalita, J., et al., *A study of oxidative stress, cytokines and glutamate in Wilson disease and their asymptomatic siblings*. Journal of Neuroimmunology, 2014. **274**(1): p. 141-148.
145. Polishchuk, R. and S. Lutsenko, *Golgi in copper homeostasis: a view from the membrane trafficking field*. Histochem Cell Biol, 2013. **140**(3): p. 285-95.
146. Zhang, Y., et al., *FoxO1 silencing in Atp7b^{-/-} neural stem cells attenuates high copper-induced apoptosis via regulation of autophagy*. J Neurochem, 2024. **168**(9): p. 2762-2774.
147. Nilsson, M.E., et al., *Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Endocrinology, 2015. **156**(7): p. 2492-2502.
148. Litwin, T., et al., *The effect of gender on brain MRI pathology in Wilson's disease*. Metab Brain Dis, 2013. **28**(1): p. 69-75.
149. Dusek, P., et al., *Brain iron accumulation in Wilson disease: a post mortem 7 Tesla MRI - histopathological study*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2017. **43**(6): p. 514-532.
150. Zhou, X.-x., et al., *Injury factors and pathological features of toxic milk mice during different disease stages*. Brain and Behavior, 2019. **9**(12): p. e01459.
151. Bruehlmeier, M., et al., *Increased cerebral iron uptake in Wilson's disease: a ⁵²Fe-citrate PET study*. Journal of Nuclear Medicine, 2000. **41**(5): p. 781-787.
152. Crossgrove, J.S. and R.A. Yokel, *Manganese Distribution Across the Blood-Brain Barrier III: The Divalent Metal Transporter-1 is not the Major Mechanism Mediating Brain Manganese Uptake*. NeuroToxicology, 2004. **25**(3): p. 451-460.
153. Yokel, R.A., *Manganese flux across the blood-brain barrier*. Neuromolecular medicine, 2009. **11**: p. 297-310.
154. Barro, C., T. Chitnis, and H.L. Weiner, *Blood neurofilament light: a critical review of its application to neurologic disease*. Ann Clin Transl Neurol, 2020. **7**(12): p. 2508-2523.
155. Shribman, S., et al., *Plasma Neurofilament Light as a Biomarker of Neurological Involvement in Wilson's Disease*. Mov Disord, 2021. **36**(2): p. 503-508.
156. Scheinberg, I.H. and I. Sternlieb, *WILSON'S DISEASE*. Annu Rev Med, 1965. **16**: p. 119-34.
157. Grandis, D.J., et al., *Wilson's Disease and Cardiac Myopathy*. Am J Cardiol, 2017. **120**(11): p. 2056-2060.
158. Deng, W., et al., *Myocardial involvement characteristics by cardiac MR imaging in neurological and non-neurological Wilson disease patients*. Insights into Imaging, 2024. **15**(1): p. 24.
159. Kranias, E.G. and D.M. Bers, *Calcium and cardiomyopathies*. Subcell Biochem, 2007. **45**: p. 523-37.
160. Nose, Y., et al., *Ctr1 is an apical copper transporter in mammalian intestinal epithelial cells in vivo that is controlled at the level of protein stability*. J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32385-92.

161. Gromadzka, G., et al., *Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative Diseases—Therapeutic Implications*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(23): p. 9259.
162. Zimnicka, A.M., K. Ivy, and J.H. Kaplan, *Acquisition of dietary copper: a role for anion transporters in intestinal apical copper uptake*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2011. **300**(3): p. C588-C599.
163. Nyasae, L., et al., *Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper-dependent redistribution between two intracellular sites*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(4): p. G1181-94.
164. Lutsenko, S., *Dynamic and cell-specific transport networks for intracellular copper ions*. J Cell Sci, 2021. **134**(21).
165. Pierson, H., et al., *The Function of ATPase Copper Transporter ATP7B in Intestine*. Gastroenterology, 2018. **154**(1): p. 168-180.e5.
166. Kelly, E.J. and R.D. Palmiter, *A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein*. Nat Genet, 1996. **13**(2): p. 219-22.
167. Krajacic, P., et al., *Retinal Localization and Copper-Dependent Relocalization of the Wilson and Menkes Disease Proteins*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006. **47**(7): p. 3129-3134.
168. Purchase, R., *The link between copper and Wilson's disease*. Sci Prog, 2013. **96**(Pt 3): p. 213-23.
169. Roy, S. and S. Lutsenko, *Mechanism of Cu entry into the brain: many unanswered questions*. Neural Regen Res, 2024. **19**(11): p. 2421-2429.

Opinia Komisji Bioetycznej



UNIWERSYTET WARSZAWSKI – WYDZIAŁ BIOLOGII

I LOKALNA KOMISJA ETYCZNA DO SPRAW DOŚWIADCZEŃ NA ZWIERZĘTACH w WARSZAWIE

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (+48) 22 55 41 242; e-mail: lke1waw@uw.edu.pl
<https://www.biol.uw.edu.pl/1-lokalna-komisja-etyczna/>

Warszawa, 13.06.2025

Pan

Prof. dr hab. n. med i n. o zdr.

Adam Przybyłkowski

Kierownik Kliniki Gastroenterologii

i Chorób Wewnętrznych

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Szanowny Panie,

W odpowiedzi na pismo z dnia 11.06.2025 r. dotyczące prośby o wydanie zaświadczenia Komisji Etycznej w sprawie wniosku nr 475/2017 obejmującego badania mysiego modelu choroby Wilsona, I Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach (ILKE) w Warszawie informuje, że zgodnie z art. 2 ust. 6 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (zwanej dalej „Ustawą”) nie jest procedurą uśmiercenie zwierzęcia wyłącznie po to, aby wykorzystać jego narządy lub tkanki do celów określonych w art. 3 Ustawy.

Mając powyższe na względzie, w ocenie I LKE w Warszawie badanie, które zostało przez Pana opisane, nie wymaga zgody LKE w rozumieniu Ustawy.

Z poważaniem

PRZEWODNICZĄCA
I Lokalnej Komisji Etycznej
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
w Warszawie

.....
dr Anna Cabaj

podpis i pieczęć Przewodniczącej Komisji