

**Univerzita Karlova**  
**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Neurovědy



**MUDr. Marko Petržalka**

Prognostické markery vývoje onemocnění u pacientů v časně fázi roztroušené sklerózy

Prognostic markers of disease course in early stages of multiple sclerosis

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Petr Marusič, Ph.D.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.12.2022

Marko PETRŽALKA

### **Poděkování:**

Na prvním místě patří velké poděkování MUDr. Evě Meluzínové, která stála u zrodu této práce, během mého postgraduálního studia nešetřila jak odbornou, tak lidskou podporou, ale výsledek naší společné práce již nespátří.

Dále bych chtěl poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Petru Marusičovi, Ph.D. za důsledné vedení během celého studia, celému týmu Centra pro diagnostiku a léčbu demyelinizačních onemocnění při Neurologické klinice 2. LF UK a FN Motol za spolupráci při realizaci studie, RNDr. Jitce Hanzalové za expertízu v oblasti likvoru, Ing. Janu Šandovi za zpracování dat z MR, Ing. Stanislavovi Kormundovi za statistické zpracování a mojí manželce MUDr. Kataríně Petržalkové za neskonalou trpělivost a podporu.

## **Prognostické markery vývoje onemocnění u pacientů v časně fázi roztroušené sklerózy**

### **ABSTRAKT**

Práce se zabývá možnostmi stanovení prognózy na počátku onemocnění roztroušenou sklerózou. Oblasti využití jednotlivých biomarkerů se často prolínají, proto teoretická část poskytuje přehled biomarkerů užívaných nejenom při stanovování prognózy, ale i při diagnostice a monitoraci terapie. Empirická část pojednává o vlastním výzkumu prognostického významu intrathekální syntézy imunoglobulinů třídy M, sérových a likvorových hodnot interleukinu 2, interleukinu 6, interleukinu 10, chitinase 3-like 2 proteinu a těžkých řetězců neurofilament stanovených ze vzorků získaných při diagnostice onemocnění. Do studie bylo zahrnuto 58 pacientů diagnostikovaných časně po prvním relapsu. Všichni pacienti zahájili terapii glatiramer acetátem, teriflunomidem nebo interferonem beta. Pacienti byli prospektivně sledováni po dobu dvou let klinicky a pomocí magnetické rezonance. Poměr interleukinu 2 k interleukinu 6 v likvoru  $<0,48$  ( $p=0,0028$ ), koncentrace interleukinu 2 v likvoru  $\geq 1,23$  ( $p=0,0260$ ), koncentrace chitinase 3-like 2 proteinu v likvoru  $\geq 7900$  ( $p=0,0330$ ), věk v době prvního relapsu  $<22$  let ( $p=0,0312$ ) a stupeň funkčního postižení (Expanded Disability Status Scale) v době zahájení terapie  $\geq 1,5$  ( $p=0,0481$ ), byly shledány nezávislými prognostickými markery asociovanými s kratší dobou do druhého relapsu. Vyšetřování uvedených biomarkerů v době diagnostické lumbální punkce by v klinické praxi mohlo být užitečné pro stanovení nepříznivé prognózy.

**Klíčová slova:** biomarkery, chitinase 3-like 2 protein, interleukin 2, interleukin 6, interleukin 10, intrathekální syntéza imunoglobulinů třídy M, prognóza, roztroušená skleróza, těžké řetězce neurofilament

## **Prognostic markers of disease course in early stages of multiple sclerosis**

### **ABSTRACT**

This thesis analyzes the biomarkers of unfavorable prognosis assessed at early stages of multiple sclerosis. Because specific biomarkers often provide rather complex information, the theoretical part provides a summary of biomarkers used not only in prognosis assessment, but also in diagnostics and therapy monitoring. In the empirical part, we have investigated the prognostic value of intrathecal synthesis of class M immunoglobulins, serum and cerebrospinal fluid concentrations of interleukin 2, interleukin 6, interleukin 10, chitinase 3-like 2 protein and neurofilament heavy chains, assessed from samples acquired during diagnostic procedures. 58 patients early after the first manifestation of multiple sclerosis were included. All patients initiated therapy with glatiramer acetate, teriflunomide, or interferon beta. To assess the evolution of the disease, we followed the patients clinically and with MRI for two years. Interleukin 2 to interleukin 6 ratio of cerebrospinal fluid values  $<0.48$  ( $p=0.0028$ ), interleukin 2 in cerebrospinal fluid  $\geq 1.23$  ( $p=0.0260$ ), chitinase 3-like 2 in cerebrospinal fluid  $\geq 7900$  ( $p=0.0330$ ), age at clinical onset  $<22$  years ( $p=0.0312$ ) and baseline Expanded Disability Status Scale  $\geq 1.5$  ( $p=0.0481$ ), proved to be independent markers associated with shorter time to second relapse. Assessment of the abovementioned biomarkers at the time of diagnostic lumbar puncture might be useful in clinical setting to detect patients with unfavorable prognosis.

**Keywords:** biomarkers, chitinase 3-like 2 protein, interleukin 2, interleukin 6, interleukin 10, intrathecal synthesis of class M immunoglobulins, multiple sclerosis, neurofilament heavy chains, prognosis

## SEZNAM ZKRATEK

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
anti-AQP4	protilátky proti aquaporinu 4
anti-MOG	protilátky proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu
Alb	albumin
ARR	annualized relapse rate
CD25	cluster of differentiation 25
CD-MS	klinicky jistá roztroušená skleróza
CIS	klinicky izolovaný syndrom
CNS	centrální nervový systém
CSF	likvor
CXCL13	C-X-C motif chemokine ligand 13
DIS	dissemination in space
DIT	dissemination in time
DMD	disease modifying drugs
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FLAIR	fluid-attenuated inversion recovery
HR	hazard ratio
HS-ELISA	high sensitivity enzyme-linked immuno sorbent assay
CHI3L1	chitinase 3-like 1
CHI3L2	chitinase 3-like 2
i.m.	intramuskulární
i.v.	intravenózní
IEF	izoelektrická fokusace
IgG	imunoglobulin G
IgG calc	intrathekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu
IgM	imunoglobulin M
IgM calc	intrathekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu
IL-2	interleukin 2
IL-2:IL-6 <sub>CSF</sub>	poměr likvorových hodnot interleukinu 2 a interleukinu 6
IL-6	interleukin 6
IL-10	interleukin 10

Index <sub>IL-2</sub>	indexovaná hodnota interleukinu 2, vysvětlení a výpočet viz v textu
Index <sub>IL-6</sub>	indexovaná hodnota interleukinu 6, vysvětlení a výpočet viz v textu
Index <sub>IL-10</sub>	indexovaná hodnota interleukinu 10, vysvětlení a výpočet viz v textu
JCV	virus Johna Cunninghama
MOG	myelinový oligodendrocytární glykoprotein
MOG-AD	myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody disease
MR (ang. MRI)	magnetická rezonance
MxA	Myxovirus resistance protein A
NAbs	neutralizační protilátky
NEDA 4	no evidence of disease activity 4
NMO-SD	neuromyelitis optica spectrum disorders
Nf	neurofilamenta
NfH	těžké řetězce neurofilament
NfL	lehké řetězce neurofilament
OCGB	oligoklonální pásy ve třídě IgG
OCMB	oligoklonální pásy ve třídě IgM
pNfH	fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament
PP-RS	primárně progresivní roztroušená skleróza
ROC	receiver operating characteristic
RR-RS	relaps remitentní roztroušená skleróza
$r_s$	Spearmanův koeficient pořadové korelace
RS (ang. MS)	roztroušená skleróza
s.c.	subkutánní
Simoa	single-molecule array
SP-RS	sekundárně progresivní roztroušená skleróza
T	čas
TGF	transforming growth factor
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
Th17	T helper 17
VEP	zrakové evokované potenciály

# OBSAH

1	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
1.1	Roztroušená skleróza.....	11
1.2	Biomarkery užívané v diagnostice roztroušené sklerózy.....	12
1.2.1	Intrathekální syntéza imunoglobulinů.....	12
1.2.2	Nálezy na magnetické rezonanci.....	14
1.2.3	C-X-C motiv chemokinový ligand 13.....	15
1.2.4	Protilátky proti aquaporinu 4.....	16
1.2.5	Protilátky proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu.....	17
1.2.6	Zrakové evokované potenciály.....	18
1.3	Biomarkery užívané v monitoraci terapie roztroušené sklerózy.....	19
1.3.1	Virus Johna Cunninghama.....	20
1.3.2	No evidence of disease activity 4.....	21
1.3.3	Neutralizační protilátky.....	22
1.3.4	Myxovirus resistance protein A.....	22
1.4	Biomarkery užívané pro stanovení prognózy roztroušené sklerózy.....	23
1.4.1	Ovlivnitelné rizikové faktory.....	23
1.4.1.1	Zahájení terapie a doba do zahájení terapie.....	23
1.4.1.2	Kouření.....	24
1.4.1.3	Vitamin D.....	25
1.4.2	Neovlivnitelné rizikové faktory (vlastní prognostické biomarkery).....	25
1.4.2.1	Klinické charakteristiky a demografické údaje.....	25
1.4.2.1.1	Pohlaví.....	25
1.4.2.1.2	Rasa/Etnikum.....	26
1.4.2.1.3	Věk v době prvního relapsu.....	26
1.4.2.1.4	Charakter prvního relapsu.....	27
1.4.2.1.5	Komorbidity.....	27
1.4.2.2	Nálezy na magnetické rezonanci.....	28
1.4.2.2.1	Počet T2 lézí na první magnetické rezonanci mozku.....	28
1.4.2.2.2	T1 léze enhancující po podání gadolinia na první magnetické rezonanci mozku.....	28
1.4.2.2.3	Infratentoriální léze na první magnetické rezonanci mozku.....	29
1.4.2.2.4	Spinální léze v době diagnózy.....	29



1.4.2.2.5	Atrofie mozku a míchy.....	29
1.4.2.3	Biomarkery v séru a likvoru .....	30
1.4.2.3.1	Intrathekální syntéza imunoglobulinů.....	30
1.4.2.3.1.1	Imunoglobuliny G.....	30
1.4.2.3.1.2	Imunoglobuliny M .....	30
1.4.2.3.2	Interleukiny .....	31
1.4.2.3.2.1	Interleukin 2.....	31
1.4.2.3.2.2	Interleukin 6.....	31
1.4.2.3.2.3	Interleukin 10.....	32
1.4.2.3.3	Chitinázám podobné bílkoviny .....	32
1.4.2.3.3.1	Chitinase 3-like 1 .....	33
1.4.2.3.3.2	Chitinase 3-like 2.....	33
1.4.2.3.4	Neurofilamenta.....	33
1.4.2.3.4.1	Lehké řetězce neurofilament.....	34
1.4.2.3.4.2	Těžké řetězce neurofilament.....	34
2	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY .....	36
2.1	Cíle práce.....	36
2.2	Hypotézy .....	36
2.3	Ad hoc hypotézy.....	37
3	METODIKA.....	38
3.1	Analýza likvoru a séra.....	38
3.1.1	Intrathekální syntéza imunoglobulinů M .....	38
3.1.2	Interleukin 2, interleukin 6, interleukin 10.....	39
3.1.3	Těžké řetězce neurofilament .....	40
3.1.4	Chitinase 3-like 2 .....	40
3.1.5	Další zpracování výsledků .....	40
3.2	Sledovací období.....	40
3.2.1	Klinické sledování.....	40
3.2.2	Magnetická rezonance.....	41
3.2.3	Komplexní hodnocení .....	41
3.3	Kontrolní soubor .....	41
3.4	Statistické zpracování.....	42
4	VÝSLEDKY .....	43
4.1	Výchozí data souboru pacientů a kontrolního souboru.....	43

4.1.1	Soubor pacientů.....	43
4.1.2	Srovnání souboru pacientů a kontrolního souboru.....	43
4.2	Relapsy.....	45
4.2.1	Doba do druhého relapsu.....	45
4.2.1.1	Univariační analýzy.....	45
4.2.1.2	Multivariační analýza.....	45
4.2.2	Roční počet relapsů.....	47
4.2.3	Doba do druhého relapsu: hodnoty v likvoru – ad hoc analýza.....	48
4.2.3.1	Univariační analýzy.....	49
4.2.3.2	Multivariační analýza.....	49
4.3	Expanded Disability Status Scale.....	51
4.3.1	Změna v Expanded Disability Status Scale.....	51
4.3.2	Šestiměsíční potvrzené zhoršení v Expanded Disability Status Scale.....	52
4.4	Magnetická rezonance.....	53
4.4.1	Nové T2 léze, nárůst lesion load.....	54
4.4.2	Mozková atrofie.....	55
4.5	No evidence of disease activity 4.....	56
5	DISKUZE.....	57
5.1	Asociace s roztroušenou sklerózou.....	57
5.2	Interleukin 2, interleukin 6, interleukin 10.....	57
5.3	Těžké řetězce neurofilament.....	59
5.4	Chitinase 3-like 2.....	60
5.5	Intrathekální syntéza imunoglobulinů M.....	60
5.6	Limitace práce.....	60
6	ZÁVĚR.....	62
7	SHRNUTÍ.....	63
8	SUMMARY.....	64
9	LITERATURA.....	65
10	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA.....	90
11	PŘÍLOHY.....	92

# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je chronické autoimunitní neurodegenerativní onemocnění centrálního nervového systému (CNS). Prevalence onemocnění v České republice je cca 165/100 000, postihuje hlavně mladé jedince, častěji ženy v poměru 2:1 až 3:1 (Český statistický úřad, 2022; Nadační fond IMPULS, 2021). Diagnóza onemocnění je stanovena na základě McDonaldových kritérií z roku 2017, s nutností prokázání diseminace v prostoru (dissemination in space, DIS) a čase (dissemination in time, DIT) (Thompson A.J. et al., 2018). Klinicky izolovaný syndrom (CIS) označuje klinické projevy, které při nálezů charakteristických lézí CNS na magnetické rezonanci (MR), případně i typického nálezů v likvoru, svědčí pro první příznak RS. Od revize diagnostických kritérií v roce 2017, kdy byla zavedena možnost prokázat DIT za pomoci vyšetření likvoru, byl termín CIS označen za historický a jeho používání nebylo dále doporučeno (Thompson A.J. et al., 2018). V této práci ho ale používáme v souvislosti se staršími studii, kde byla tato jednotka používána. V částech zahrnujících nové poznatky vyplývající z této práce používáme termín časná fáze RS. Pro přehlednost na tomto místě také uvedme, že v celé práci užíváme termín „první relaps“, který považujeme za synonymum pro „první ataka“ a „první příznak“.

Obecný pojem biomarker zahrnuje širokou škálu objektivních ukazatelů zdravotního stavu, které mohou být přesně a opakovaně měřeny (Strimbu K., Tavel J.A., 2010). Tyto ukazatele se uplatňují jak v diagnostice patologického procesu, tak při sledování vývoje nemoci, a také při monitoraci efektu zvolené léčby. Biomarkery mohou být různé povahy – od klinických a fyzikálních charakteristik pacienta, až po výsledky laboratorních či radiologických vyšetření. V podmínkách výzkumu RS se již tradičně jedná o markery likvorologické, sérologické, klinické a magneticko-rezonanční.

Průběh RS je interindividuálně značně variabilní. Již v časných fázích onemocnění dochází na podkladě chronického zánětu k poškození myelinu, a také ke ztrátě neuronů a axonů (Trapp B.D. et al., 1998). Proto u některých pacientů na sebe od začátku onemocnění rychle navazují těžké relapsy s neúplnou úpravou stavu, a choroba vede během několika let k závažné invaliditě. Jiní nemocní vyvinou druhý relaps až po mnoha letech od prvního příznaku, a i neléčené onemocnění může mít relativně příznivou prognózu. Informace, zda

pacient rozvine vysoce aktivní formu RS, nebo zda bude onemocnění probíhat benigně s dlouhodobou stabilizací, se jeví jako zcela zásadní při volbě léčebné strategie. Navzdory intenzivnímu výzkumu v této oblasti stále schází spolehlivé biomarkery, které by byly schopny predikovat další průběh onemocnění již na jeho počátku. Řada potenciálních biomarkerů byla u pacientů s RS studována za účelem stanovení diagnózy, prognózy i monitorace terapie. Jeden parametr tak může být považován jak za biomarker snížení aktivity léčiva, tak např. za negativní prognostický marker. Rozdělení biomarkerů v následujícím výčtu je proto jenom arbitrární, zvoleno na základě jejich dominantního využití. Výčet všech potenciálních biomarkerů studovaných u pacientů s RS přesahuje rozsah této práce, omezujeme se proto na přehled těch nejvýznamnějších.

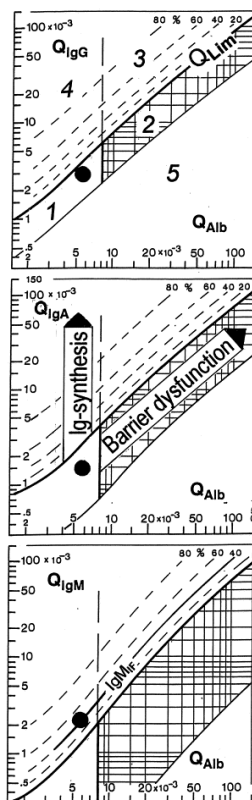
## **1.2 Biomarkery užívané v diagnostice roztroušené sklerózy**

### **1.2.1 Intrathekální syntéza imunoglobulinů**

Za fyziologických podmínek se B lymfocyty, které byly specificky stimulovány antigenním podnětem, diferencují za účasti Th2 lymfocytů v sekundárních lymfatických orgánech. Zde dochází ke klonální expanzi stimulovaných B lymfocytů, tvorbě zárodečných center a terminální diferenciaci v plazmatické buňky produkující imunoglobuliny. Plazmatická buňka secernuje molekuly protilátek, které svou specificitou odpovídají receptoru na zralém B lymfocyту, z kterého pochází (Krejsek J. et al., 2013). Nález imunoglobulinů společně s aktivovanými fragmenty komplementu v zónách aktivního zánětu demyelinizačních plak u RS svědčí pro jejich bezprostřední roli v patogenezi tohoto onemocnění (Gay F.W. et al., 1997; Lucchinetti C. et al., 2000; Storch M.K. et al., 1998). Tomuto nasvědčují i histopatologické nálezy ektopických lymfoidních folikulů na meningách pacientů se sekundárně progresivní RS (SP-RS) a rozsáhlé množství prací, jenž se v posledních desetiletích zabývaly rolí B lymfocytů v patogenezi RS (Serafini B. et al., 2004; Cross A.H. et al., 2001). Obecně přijímaný koncept rozvoje RS, ve kterém hrála hlavní roli expanze autoreaktivních T lymfocytů reagujících na antigeny CNS, jejich následný přestup přes hematoencefalickou bariéru a spuštění prozánětlivé kaskády dějů v mozku, byl tak rozšířen o důležitou část zahrnující B lymfocyty (Krejsek J. et al., 2013).

Vznik imunoglobulinů třídy IgG za hematoencefalickou bariérou, neboli intrathekální syntéza ve třídě IgG, je typickým, i když nespecifickým nálezem pro RS (Andersson M. et

al., 1994). Intrathekální syntéza IgG se stanovuje buď odečtením z Reiberova diagramu (IgG calc; Obr. 1) nebo odečtením oligoklonálních pásů (OCGB) po provedení izoelektrické fokusace (IEF) a imunoblotingu (Reiber H., Peter J.B., 2001). Izoelektroforegramy mohou být pěti typů: typ 1 – normální nález, typ 2 – izolované OCGB v likvoru, typ 3 – OCGB v likvoru a další identické OCGB v likvoru a séru („more than pattern“), typ 4 – identické OCGB v likvoru a séru („mirror pattern“), typ 5 – monoklonální pásy v likvoru a séru (Andersson M. et al., 1994). U RS je typickým nálezem pozitivita ve třídě IgG, jenž je vyjádřena jako hodnota v oblasti tři nebo čtyři dle Reiberova diagramu (Obr. 1) a/nebo izoelektroforegram typu dva nebo tři (Freedman M.S. et al., 2005). Stanovení OCGB bylo dlouho před jejich inkorporací do diagnostických kritérií doporučováno provádět rutinně v rámci diagnostiky RS jako spolehlivější vyšetření, zatímco stanovení IgG calc bylo doporučováno jenom jako podpůrné vyšetření (Andersson M. et al., 1994). OCGB jsou součástí revidovaných diagnostických kritérií RS dle McDonalda z roku 2017 (Thompson A.J. et al., 2018). V meta-analýze byla intrathekální syntéza prokázána pomocí OCGB u 87,7 % pacientů s RS (Dobson R. et al., 2013).



**Obr. 1** Reiberovy diagramy. Shora: graf pro IgG, graf pro IgA, graf pro IgM. Oblast 1 – normální nález, oblast 2 – izolovaná porucha hematolikvorové bariéry, oblast 3 – porucha hematolikvorové bariéry společně s intrathekální syntézou imunoglobulinů, oblast 4 – izolovaná intrathekální syntéza imunoglobulinů Ig, oblast 5 – oblast analytických chyb. Převzato z původního článku (Reiber H., Peter J.B., 2001).

### 1.2.2 Nálezky na magnetické rezonanci

Dalšími biomarkery používanými v diagnostice RS jsou MR mozku a míchy, které také tvoří součást revidovaných diagnostických kritérií dle McDonalda z roku 2017 (Thompson A.J. et al., 2018). MR mozku by měla být provedena u všech pacientů, u kterých je zvažována diagnóza RS. MR míchy nemusí být provedena ve všech případech, je ale doporučena tehdy, pokud je klinické podezření na míšní lokalizaci léze, primárně progresivní formu RS (PP-RS), nebo pokud se jedná o atypický klinický obraz (např. věk pacienta). Patofyziologickému obrazu plaky při RS odpovídá na MR hyperintenzní léze v T2 vážených sekvencích, která v dlouhé ose měří alespoň 3mm (Thompson A.J. et al., 2018). Syčení léze po podání gadolinia, neboli enhancement, svědčí pro „aktivní“ lézi s porušenou hematoencefalickou bariérou. Tato se postupně uzavírá a enhancement většinou mizí do dvou až 12 týdnů, v 90 % do šesti měsíců (Vaněčková M., Seidl Z., 2018). Jak bylo uvedeno výše, ke stanovení diagnózy RS (zejména relaps remitentní formy) je nutné prokázat diseminaci v prostoru a čase. Průkazu DIS je nejčastěji dosaženo přítomností alespoň jedné typické léze v alespoň dvou ze čtyř typických lokalizací: periventrikulární, kortikální/juxtakortikální, infratentoriální nebo míšní. Prokázat DIT pomocí MR je možné na základě současného výskytu enhancujících i neenhancujících lézí při jednom vyšetření nebo při objevení se nové T2 nebo gadolinium enhancující T1 léze při vyšetření kontrolním. Možné kombinace nálezů svědčících pro diagnózu RS uvádí Tab. 1. Podobně se stanovuje i diagnóza PP-RS, kde musí být kromě klinické podmínky, tj. minimálně jeden rok trvající zhoršení míry funkčního postižení (prokázáno dle Expanded Disability Status Scale (EDSS)), splněny alespoň dvě z následujících podmínek: 1) alespoň jedna typická léze v alespoň jedné ze čtyř typických lokalizací (lokalizace stejné jako při RR-RS), 2) alespoň dvě T2 hyperintenzní míšní léze, 3) přítomnost OCGB v likvoru (Thompson A.J. et al., 2018). Česká diagnostická kritéria upřesňují kritérium o OCGB a stanovují nutnost přítomnosti alespoň dvou OCGB v likvoru bez korelátu v séru nebo přítomnost volných řetězců kappa nebo lambda v likvoru (Kubala Havrdová E., Piňha J., 2020).

**Tab. 1** Revidovaná diagnostická kritéria RS dle McDonalda z roku 2017

DIS = diseminace v prostoru; MR = magnetická rezonance; DIT = diseminace v čase; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG. Převzato a upraveno dle (Kubala Havrdová E., Piřha J., 2020)

Klinická kritéria (ataky)	Objektivní klinický průkaz (léze)	Další údaje potřebné ke stanovení diagnózy
≥2	≥2	Žádné
≥2	1 (stejně jako anamnestický důkaz předchozí ataky s lézí v odlišném anatomickém místě)	Žádné
≥2	Objektivní klinický průkaz 1 léze	DIS s průkazem další ataky lokalizované jinde klinicky nebo MR
1	Objektivní klinický průkaz ≥2 lézí	DIT dokumentovaná další atakou nebo MR nebo nálezem OCGB v likvoru
1	Objektivní klinický průkaz 1 léze	DIS dokumentovaná další atakou z jiného místa CNS nebo na MR a DIT dokumentovaná další atakou nebo MR nebo pozitivním nálezem OCGB v likvoru

### 1.2.3 C-X-C motiv chemokinový ligand 13

C-X-C motiv chemokinový ligand 13 (CXCL13) patří do rodiny chemokinů, malých molekul působících přes receptory spřažené s G-proteinem a schopných atrahovat a udržovat leukocyty v různých tkáních (Le Y. et al., 2004). CXCL13 navíc patří do skupiny chemokinů obsahujících C-X-C motiv, tedy sekvenci cystein-X-cystein, kde jsou cysteiny na rozdíl od CC chemokinů odděleny proteinovým zbytkem (Groves D.T., Jiang Y., 1995). Jediným receptorem, prostřednictvím kterého CXCL13 zprostředkovává veškeré své funkce, je CXCR5 (Le Y. et al., 2004). CXCL13 je silným atraktantem B lymfocytů, je důležitý pro vznik sekundárních lymfoidních tkání a je produkován zejména stimulovanými buňkami monocyto-makrofágového systému (Legler D.F. et al., 1998) (Carlsen H.S. et al., 2004). Hladiny CXCL13 v likvoru jsou zvýšené u pacientů s infekčním, autoimunitním či nádorovým onemocněním CNS. Z infekčních onemocnění se jedná zejména o neuroboreliózu, ale i o neurosyfilis či onemocnění způsobená herpetickými viry, HIV, hemophilus influenzae, listeria monocytogenes, mycobacterium tuberculosis nebo cryptococcus neoformans. Z autoimunit se kromě CIS a RS jedná i o neuromyelitis optica a poruchy jejího širšího spektra, autoimunitní cerebelitidu či vaskulitidu CNS. Vyšší hladina CXCL13 v likvoru byla popsána i u neurosarkoidózy a při nádorovém rozsevu na meningách (Kowarik M.C. et al., 2012; Mothapo Khutso M. et al., 2015; Wagner J.N. et al., 2018). Klinický význam CXCL13 spočívá hlavně v diferenciální diagnostice proti neuroborelióze, při které je hladina CXCL13 v likvoru zvýšena velmi výrazně, nad cca 100 pg/ml (Wagner J.N. et al., 2018). Důležitou informaci může přinést

zejména v případech, kdy se jedná o akutní formu neuroboreliózy, v likvoru je přítomna pleocytóza, ale antigenní indexy vycházejí ještě negativní. Podobně vysokou hladinu jako u neuroboreliózy můžeme najít i u lymfomů CNS (Masouris I. et al., 2021). Zvýšená hladina CXCL13 v likvoru byla opakovaně referována u pacientů s RS ve srovnání s kontrolami, hladiny jsou však výrazně nižší než u infekční etiologie; dle jedné menší studie v rozmezí 8,2–29,5 pg/ml (Ghafouri-Fard S. et al., 2021; Khademi M. et al., 2010; Alvarez E. et al., 2013). V souvislosti s RS byl studován i možný prognostický význam CXCL13 a ukázalo se, že hladiny CXCL13 v likvoru jsou významně vyšší u pacientů, kteří mají následně aktivní nemoc (hodnoceno jako klinická a/nebo MR aktivita během sledovacího období, kterého průměrná délka byla ve studii 2,6 let) (DiSano K.D. et al., 2020).

#### **1.2.4 Protilátky proti aquaporinu 4**

V diferenciální diagnostice RS je nutno pomýšlet na neuromyelitis optica a poruchy jejího širšího spektra (neuromyelitis optica spectrum disorders, NMO-SD), a to zejména tam, kde se onemocnění projevuje míšními příznaky/lézemi a/nebo optickou neuritidou. K odlišení těchto dvou jednotek, které často mohou probíhat pod velmi podobným klinickým obrazem, lze použít stanovení protilátek proti aquaporinu 4 (anti-AQP4) v séru. Po objevení protilátek anti-AQP4 zaměřených proti vodnímu kanálu na astrocytech, mohla být ze skupiny pacientů s RS postupně vyčleněna skupina anti-AQP4 pozitivních pacientů a tak vytvořena nová klinická jednotka „neuromyelitis optica“, neboli Devicova nemoc (Lennon V.A. et al., 2005). S postupem času bylo však zjištěno, že pacienti s anti-AQP4 pozitivitou v séru mohou vykazovat i zcela jiný klinický fenotyp. Bylo proto nutno zavést nový termín, NMO-SD, a stanovit nová diagnostická kritéria, jejichž poslední aktualizace je z roku 2015 (Tab. 2)(Wingerchuk D.M. et al., 2015). Největší senzitivita vyšetření anti-AQP4 je v době klinického relapsu, kdy se jejich titry v séru významně zvyšují (Jarius S. et al., 2008). Metodou volby pro stanovení anti-AQP4 je cell-based assay (Wingerchuk D.M. et al., 2015).



**Tab. 2** Diagnostická kritéria NMO-SD dle Wingerchuka z roku 2015

Symbol <sup>α</sup> odkazuje na jiné místa v tabulce označené stejným symbolem; obdobně symboly <sup>γ</sup> a <sup>δ</sup>

<sup>β</sup> V případě symptomatického cerebrálního syndromu nebo narkolepsie či diencefalického syndromu je třeba naplnění MR kritérií. ON = ptická neuritida; NMO-SD = neuromyelitis optica spectrum disorders; APS = syndrom area postrema; anti-AQP4 = protilátky proti aquaporinu 4; DIS = diseminace v prostoru; MR = magnetická rezonance. Převzato a upraveno dle (Kubala Havrdová E., Piňha J., 2020).

Jádrové klinické charakteristiky <sup>α</sup>	
Akutní myelitida	Akutní kmenový syndrom
ON	Symptomatická narkolepsie a akutní diencefalické syndromy (s NMO-SD typickými mozkovými lézemi) <sup>β</sup>
APS	Symptomatický cerebrální syndrom (s NMO-SD typickými mozkovými lézemi) <sup>γ</sup>
<b>anti-AQP4 pozitivní NMO-SD</b>	<b>anti-AQP4 negativní NMO-SD</b>
1. Minimálně jedna jádrová klinická charakteristika <sup>α</sup>	1. Minimálně 2 různé jádrové klinické charakteristiky, z toho alespoň jedna je ON, myelitida nebo APS (podmínka DIS)
2. Pozitivní anti-AQP4 v séru	2. Splnění požadavků při zobrazení MR pro daný případ <sup>δ</sup>
3. Vyloučení jiné alternativní diagnózy	3. Negativní test na anti-AQP4 v séru nebo nedostupnost stanovení
	4. Vyloučení jiné alternativní diagnózy
<b>Požadavky při zobrazení MR v případě narkolepsie, diencefalického syndromu<sup>β</sup> nebo cerebrálního syndromu<sup>γ</sup></b>	<b><sup>δ</sup>Požadavky při zobrazení MR u anti-AQP4 negativního NMO-SD</b>
<sup>β</sup> léze postihující hypothalamus, thalamus nebo periependymální oblast III. komory mozkové	1. akutní ON s nálezem na MR mozku: a) normálním nebo jsou přítomny pouze nespecifické změny bílé hmoty nebo b) MR s hyperintenzitami optického nervu v T2 sekvencích nebo s enhancementem optického nervu přesahujícím polovinu jeho délky nebo zasahujícím chiasma opticum na T1 sekvencích
<sup>γ</sup> rozsáhlé, splývavé uni- nebo bilaterální léze v bílé hmotě nebo subkortikálně	2. akutní myelitida s MR nálezem léze délky ≥ 3 obratlové segmenty (longitudinálně extenzivní transverzální myelitida) nebo kontinuální fokální atrofie míchy ≥ 3 obratlové segmenty u pacienta s anamnézou kompatibilní s myelitidou
<sup>γ</sup> léze corpus callosum dosahující minimálně polovinu jeho délky	3. APS vyžaduje MR nález z oblasti dorzální medulla oblongata
<sup>γ</sup> dlouhá ložiska v kortikospinálních drahách uni- nebo bilaterálně zasahující do capsula interna nebo pedunkulů	4. akutní kmenový syndrom vyžaduje odpovídající kmenovou lézi na MR mozku s periependymálním uložením
<sup>γ</sup> rozsáhlé periependymální léze často s enhancementem po podání gadolinia	

### 1.2.5 Protilátky proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu

Podobně jako tomu bylo při vymezení skupiny anti-AQP4 pozitivních pacientů z množiny pacientů s RS, došlo následně i k vymezení skupiny pacientů s protilátkami proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu (MOG, resp. anti-MOG) v séru. I u těchto pacientů se předpokládá odlišná patogeneze onemocnění; v tomto případě jsou protilátky namířeny selektivně proti MOG lokalizovanému výhradně na myelinovém povrchu buněk v CNS. MOG je adhezivní molekula s funkcí stabilizátoru mikrotubulárního systému oligodendrocytů a regulátoru komplementové kaskády. Klinické projevy anti-MOG pozitivních pacientů mohou být velmi podobné těm u pacientů s NMO-SD či u pacientů s RS, ale mohou být i značně odlišné. Proto dnes již rozeznáváme samostatnou jednotku s názvem „myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody disease“

(MOG-AD). Největší senzitivita vyšetření anti-MOG je stejně jako u anti-AQP4 v době klinického relapsu (Wynford-Thomas R. et al., 2019). Metodou volby pro stanovení anti-MOG je cell-based assay s celým lidským MOG jako cílovým antigenem (Jarius S. et al., 2018). Stanovení anti-MOG i anti-AQP4 je doporučeno provést u všech pacientů s podezřením na NMO-SD (bilaterální optická neuritida, těžké postižení mozkového kmene, longitudinálně extenzivní transverzální myelitida, velké cerebrální léze, normální nález na mozku nebo obraz nespĺňující kritéria DIS) a zvážit u všech pacientů s vyšším rizikem NMO-SD (Afroameričani, Asiati, populace latinskoamerického původu, pediatričtí pacienti) (Thompson A.J. et al., 2018). Diagnostická kritéria MOG-AD zatím nebyla oficiálně stanovena, i když v literatuře lze nalézt jejich návrh, ve kterém autoři ještě užívají termín MOG encefalomyelitida (Tab. 3)(Jarius S. et al., 2018).

**Tab. 3** Navrhovaná diagnostická kritéria MOG encefalomyelitidy

Ke stanovení diagnózy je nutné splnit všechna kritéria. ON = optická neuritida; MR = magnetická rezonance; CNS = centrální nervový systém; VEP = zrakové evokované potenciály; anti-MOG = protilátky proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu. Převzato a upraveno dle (Jarius S. et al., 2018)

1. Monofázická nebo relabující ON, myelitida, kmenová encefalitida, encefalitida, nebo jakákoliv kombinace těchto syndromů
2. MR nebo elektrofyziologické nálezy kompatibilní s demyelinizací CNS (VEP u pacientů s izolovanou ON)
3. Séropozitivita anti-MOG

### 1.2.6 Zrakové evokované potenciály

V rámci diagnostiky RS mohou být nápomocny i metody elektrofyziologické, ze kterých jsou nejpoužívanější zrakové evokované potenciály (visual evoked potentials, VEP). V klinické praxi se odpovědi snímají z okcipitální krajiny, nejčastěji po stimulaci strukturovaným alternujícím podnětem (černo-bílá šachovnice). Hodnotí se zejména vlna P100 – její latence a stranové rozdíly (Štětkářová I., 2013). Patologické VEP potvrzují klinickou suspekci na ON, mají ale také velký význam v detekci asymptomatického postižení zrakového nervu. Ve většině studií se udává pozitivita VEP u více než 90 % všech pacientů s RS (Poser C.M., 1980). Abnormity VEP nejsou specifické pro RS, ale mohou být projevem různých onemocnění zrakového nervu od kompresivních lézí, přes ischemické, degenerativní a karenční postižení, až po infekční a parainfekční etiologii (Poser C.M., 1980; Štětkářová I., 2013). Historicky byly VEP i součástí diagnostických kritérií RS z let 2001 a 2005, než došlo v roce 2010 k jejich revizi za účelem zvýšení

specifity a senzitivity, kdy byly VEP vypuštěny (McDonald W.I. et al., 2001; Polman C.H. et al., 2011; Polman C.H. et al., 2005). Kromě role v diagnostice byly VEP zkoumány i jako možné prognostické biomarkery. Patologické (multifokální) VEP mohou být užitečné v predikci rozvoje RS po ON (Zafeiropoulos P. et al., 2021). Prodloužení latence vlny P100, stejně jako prodloužení interokulární latence, byly také asociovány se zhoršováním kognitivních funkcí, zejména s poklesem rychlosti informačního procesingu (Covey T.J. et al., 2022). O VEP se mluví i jako o možném biomarkeru remyelinizace ve studiích s novými léčivými, protože se očekává, že nové přípravky budou cílit např. i na remyelinizaci (Heidari M. et al., 2019).

### **1.3 Biomarkery užívané v monitoraci terapie roztroušené sklerózy**

Monitorace terapie RS spočívá ve sledování nežádoucích účinků a efektivity léčby. Biomarkery pomáhají při odhalování a předcházení jak nežádoucích účinků, tak snižování efektivity a selhání zavedené terapie. Do určité míry mají tedy i roli prognostickou, jelikož včasná změna terapie u pacienta, který by jinak rozvinul závažné nežádoucí účinky nebo významnou aktivitu onemocnění, má zásadní vliv na kvalitu jeho života. Při monitoraci nežádoucích účinků se prakticky u všech léčiv z kategorie „disease modifying drugs“ (DMD) uplatňují pravidelné krevní odběry, zejména monitorace krevního obrazu, iontogramu, jaterních a ledvinných parametrů, hormonů štítné žlázy, selektivně např. i screening na přítomnost zánětlivého či nádorového onemocnění, stanovení hladiny léků, stavu buněčné imunity. Sledují se lokální reakce po aplikaci s.c. či i.m. injekcí, celkové reakce jako je výskyt flu-like syndromu (chřipkové příznaky), flush syndromu (zčervenání při zvýšeném prokrvení kůže), zažívacích obtíží, poinfuzních reakcí, arytmií a mnoho dalších. Při terapii některými léky je zásadní informace o přítomnosti viru Johna Cunninghama (JCV) v organizmu, proto bude o JCV pojednáno zvlášť. Efektivita terapie se hodnotí na základě klinické aktivity vyjádřené přítomností relapsů onemocnění, případně jejich počtem za určité časové období (většinou jeden rok, tj. annualized relapse rate, ARR). Funkční postižení na základě klinického neurologického vyšetření se hodnotí pomocí škály EDSS. Mezi základní ukazatele aktivity patří také vývoj obrazu na MR, kde pro aktivitu svědčí přítomnost nových či zvětšujících se lézí (v sekvencích T2, FLAIR, event. T1 po podání gadolinia). V poslední době se také přidává hodnocení míry mozkové atrofizace, která u pacientů s RS na rozdíl od zdravých jedinců přesahuje 0,4 % ročně (De Stefano N. et al., 2014). Všechny uvedené parametry jsou součástí konceptu „no evidence of disease activity 4“ (NEDA 4), viz níže (De Stefano N. et al., 2015). Mnoho

potenciálních biomarkerů, jako jsou např. neurofilamenta či interleukiny (viz dále), bylo a stále je zkoumáno v rámci možností monitorace terapie RS. V této části se zaměříme na ty biomarkery, které jsou využívány k monitoraci terapie v běžné klinické praxi.

### **1.3.1 Virus Johna Cunninghama**

Natalizumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka proti alfa4-integrinu, která patří do portfolia DMD pro léčbu RS, s efektem jak na stabilizaci rozvoje funkčního postižení, tak na ARR i aktivitu na MR (Polman C.H. et al., 2006; Rice G.P.A. et al., 2005; Yousry T.A. et al., 2006). Jeho vysoká účinnost je doplněna obecně příznivým bezpečnostním profilem (van Pesch V. et al., 2016). Terapie natalizumabem však může u cca jednoho pacienta z 1000 indukovat velmi závažnou komplikaci – progresivní multifokální leukoencefalopatii (PML). Jedná se o lytický proces mozkové tkáně s letalitou překračující 20 %, který je způsoben nekontrolovaným šířením JCV v mozkové tkáni. Infekce JCV je u zdravého jedince inaparentní a je poměrně častá (prevalence 50–90 %); virus může přetrvávat v latentní formě v kostní dřeni a v ledvinách a nepředstavuje zvýšené riziko. Současné teorie vzniku PML předpokládají působení několika mechanismů, které indukuje právě terapie natalizumabem. Inhibice interakce integrinů a adhezivních molekul způsobuje v kostní dřeni sníženou afinitu lymfoidních buněk k této tkáni, čímž dochází ke zvýšenému vyplavování potenciálně JCV infikovaných buněk do periferní krve. Dále dochází ke změnám na genetické úrovni, které mají za následek upregulaci JCV v buňkách, a nakonec také ke snížení imunitního dohledu (Bellizzi A. et al., 2013; Frohman E.M. et al., 2014; Major E.O. et al., 2018). Z literatury je známo, že tyto děje představují zvýšené riziko vzniku PML u pacientů, jež setrvávají na terapii natalizumabem déle než dva roky, JCV séropozitivních a s anamnézou předchozí imunosupresivní léčby (Bloomgren G. et al., 2012). V rámci monitorace jsou proto nezbytné pravidelné sérologické kontroly na přítomnost protilátek proti JCV v séru; při zahajování či změně terapie se v poslední době u JCV pozitivních pacientů volí natalizumab spíše výjimečně. Každý relaps u pacienta léčeného natalizumabem by měl vzbudit podezření na možný rozvoj PML (European Medicines Agency, 2022b). Jedním z opatření, které je možné zavést v rámci prevence rozvoje PML, je prodloužení dávkovacího intervalu ze standardních čtyř na šest týdnů. Tento koncept se jeví účinný jak stran bezpečnosti, tak stran zachování efektivity léčby (Petržalka M. et al., 2020; Butzkueven H. et al., 2021; Ryerson L.Z. et al., 2021). Sporadický výskyt PML byl popsán u pacientů léčených dalšími DMD jako je fingolimod, dimethylfumarát, alemtuzumab či

skupina anti-CD20 monoklonálních protilátek, ale také u pacientů s jinými, zejména hematologickými onemocněními, AIDS, a při jejich léčbě (Berger J.R. et al., 2013; Diamantopoulos P.T. et al., 2022; European Medicines Agency, 2022a; Sriwastava S. et al., 2022).

### 1.3.2 No evidence of disease activity 4

NEDA 4 je komplexní parametr navržený k monitoraci aktivity onemocnění u pacientů s RS (Obr. 2). Cílem terapie RS by měla být plná stabilizace nemoci, tzv. „disease free concept“, tedy pacient bez klinických relapsů, bez progresu funkčního postižení, bez nových lézí na MR a s úbytkem mozkové tkáně maximálně na úrovni zdravých kontrol (Havrdova E. et al., 2010; Horáková D., Libertínová J., 2013). NEDA 4 vychází z konceptu NEDA 3, jenž rozšiřuje o sledování roční míry mozkové atrofizace. Tato by neměla přesáhnout 0,4 %. Na MR by neměly přibývat ani se zvětšovat T2 léze, to samé platí pro T1 léze enhancující po podání gadolinia. Míra funkčního postižení se hodnotí na škále EDSS. Progrese funkčního postižení je stanovena v případě, kdy po zhoršení stavu (tj. navýšení bodového hodnocení na stupnici EDSS), nedojde ke zlepšení ani při opakovaném vyšetření s odstupem 6 měsíců - tzv. šestiměsíční potvrzené zhoršení v EDSS („six months confirmed EDSS progression“). Při počátečním EDSS 0 je za zhoršení považován nárůst o 1,5 a více bodů. Při počátečním EDSS 1 a více je za zhoršení považován nárůst o 1 a více bodů. Při počátečním EDSS nad 5 je za zhoršení považován nárůst o 0,5 a více bodů (Kappos L. et al., 2016). Koncept NEDA zatím našel uplatnění zejména v oblasti klinických studií, i když ho intuitivně využívají všichni lékaři pečující o pacienty s RS.

**Obr. 2** Schéma NEDA 4. Nahoře markery aktivity klinické, dole markery aktivity na MR. Gd = gadolinium; MR = magnetická rezonance. Převzato z původní publikace (Horáková D., Libertínová J., 2013).

### 1.3.3 Neutralizační protilátky

Dosud žádné DMD neprokázalo v terapii RS 100% efektivitu. U jednotlivých pacientů dochází ke stabilizaci na určitém preparátu, jenž u jiných pacientů nemusí stačit k potlačení aktivity nemoci, a vice versa. Neodpovídavost na léčbu může být dvou typů: 1) patogeneticky zapříčiněná neodpovídavost, kdy mechanismus účinku konkrétního preparátu není pro daného pacienta vhodný/dostatečný, 2) imunofarmakologická neodpovídavost, kdy dochází ke vzniku neutralizačních protilátek (NAbs) proti léčivu, jenž posléze zamezí interakci léčiva s jeho receptorem (Bertolotto A. et al., 2015). V rámci monitorace terapie RS se provádí screening na přítomnost NAbs v séru u pacientů, kteří jsou léčeni natalizumabem nebo některým z preparátů ze skupiny interferonů beta. U interferonů beta je vhodné opakovaně provádět testování na přítomnost NAbs mezi šestým a 24. měsícem terapie, tedy v době nejvyššího rizika jejich vzniku, u natalizumabu by se měly NAbs stanovit při výskytu hypersenzitivních reakcí a při každém relapsu onemocnění (Bertolotto A. et al., 2015; European Medicines Agency, 2022b; Kubala Havrdová E., Piřha J., 2020).

### 1.3.4 Myxovirus resistance protein A

Myxovirus resistance protein A (MxA) je produktem jednoho z mnoha genů aktivovaných či inhibovaných interferony a za fyziologických okolností se uplatňuje např. při vzniku rezistence proti chřipkovým virům. Je specificky indukován interferony alfa a beta, ale ne interferony gamma. Zatímco podání interferonu beta vyvolá výrazný nárůst exprese MxA mRNA, nízká exprese MxA mRNA u pacientů léčených interferony beta svědčí pro ztrátu biologické aktivity léčiva. Není-li indukován gen pro MxA, nejsou indukovány ani žádné jiné geny indukovatelné interferony beta (Bertolotto A. et al., 2015). Cut-off pro MxA mRNA bylo stanoveno pro českou populaci na hodnotu 160. Pokles MxA mRNA pod tuto hodnotu svědčí pro snížení biologické aktivity interferonů beta a může předcházet vzniku NAbs až o 12 měsíců (Libertinova J. et al., 2017). Screening MxA mRNA u pacientů léčených interferony beta je proto zahrnut i v doporučeném postupu pro diagnostiku a léčbu RS a NMO-SD. Pokles MxA mRNA je nutno potvrdit ve dvou odběrech s odstupem tří měsíců, nebo ideálně indukčním testem, tj. srovnáním hodnoty před aplikací interferonu beta a čtyři hodiny po ní (výsledek tak nelze připsat non-compliance) (Kubala Havrdová E., Piřha J., 2020). Nedojde-li po indukčním testu k alespoň trojnásobnému zvýšení MxA mRNA, je indikována změna terapie (Van Der Voort L.F. et al., 2009).

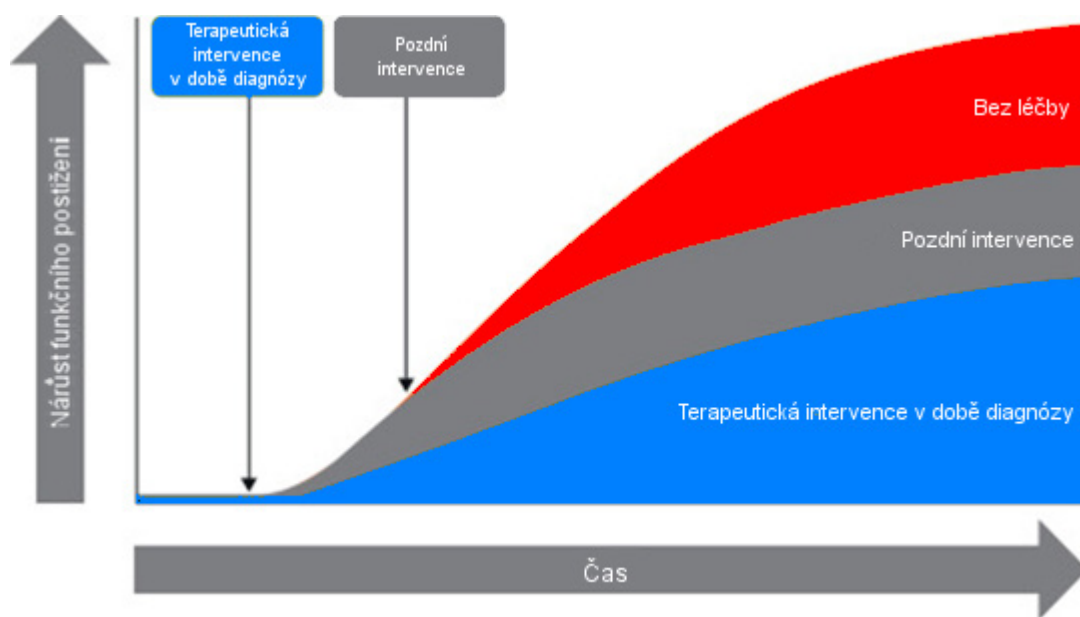
## **1.4 Biomarkery užívané pro stanovení prognózy roztroušené sklerózy**

V literatuře byla popsána řada potenciálních prognostických biomarkerů, z nichž některé jsou využívány v klinické praxi, několik je slibných a vyžaduje další validaci, výrazná většina však neprokázala prognostický význam. Pro lepší přehlednost zde dělíme rizikové faktory na ovlivnitelné a neovlivnitelné (vlastní prognostické biomarkery). Zejména u některých neovlivnitelných rizikových faktorů je zajímavá možnost jejich stanovení již v době diagnózy, a tudíž možnost predikovat průběh onemocnění již od jeho počátku. Vzhledem k tomu, že je znalost dalšího vývoje onemocnění, kromě jiného, důležitá i pro možnost případného agresivnějšího terapeutického zásahu, se rozdíl mezi ovlivnitelnými a neovlivnitelnými rizikovými faktory poněkud stírá.

### **1.4.1 Ovlivnitelné rizikové faktory**

#### **1.4.1.1 Zahájení terapie a doba do zahájení terapie**

Jedním z nejdůležitějších prognostických markerů je časné zahájení terapie DMD (Obr. 3). Časné zahájení terapie prodlužuje dobu do druhého relapsu, je asociováno s lepšími výstupy na MR včetně zpomalení atrofizace mozkové tkáně, a je také asociováno s lepší prognózou v dlouhodobém horizontu (Giovannoni G. et al., 2016). To se promítá do oddálení přechodu do SP-RS, oddálení nástupu kognitivního deficitu, zpomalení akumulace funkčního postižení, zlepšené kvality života a udržení práce schopnosti (Kubala Havrdova E., 2021).



**Obr. 3** Efekt zahájení léčby. Graf ukazuje nárůst funkčního postižení v čase v závislosti na době zahájení terapie. První „časové okno“ pro zahájení terapie s nejlepší prognózou je v době diagnózy; druhé „časové okno“ s horší prognózou je v průběhu nemoci přibližně do rozvoje SP-RS; nezahájení terapie má nejhorší prognózu. Převzato a adaptováno z původní publikace (Giovannoni G. et al., 2016).

#### 1.4.1.2 Kouření

Kouření jako rizikový faktor pro vznik RS není novým poznatkem. Relativní riziko vzniku RS u kuřáků oproti nekuřákům je cca 1,5 (Handel A.E. et al., 2011). Toto riziko je větší také u pasivních kuřáků, mimo jiné i u dětí rodičů kuřáků (Hedström A.K. et al., 2011; Mikaeloff Y. et al., 2007). Kouření však představuje i rizikový faktor pro horší průběh nemoci, např. přechodem z CIS do klinicky jisté RS (CD-MS), asociací s progresivními formami, a také horším průměrným EDSS (cca o 0,15) u kuřáků oproti nekuřákům (Di Pauli F. et al., 2008; Healy B.C. et al., 2009; Heydarpour P. et al., 2018). V poslední zmíněné studii nicméně nebyla prokázána asociace kouření s rychlejším dosažením EDSS 4 nebo 6, případně vyšším „lesion load“ (tj. celkový objem lézí) na MR, což autoři přisuzují poměrně malému počtu studií zahrnutých do meta-analýzy (15 z 268 článků na toto téma). Kouření také zvyšuje pravděpodobnost tvorby protilátek proti DMD u pacientů na terapii interferony nebo natalizumabem (Hedström A.K. et al., 2013a; Hedström A.K. et al., 2013b). Kouření je u pacientů s RS nežádoucí, protože zvyšuje aktivitu choroby, zrychluje míru atrofizace mozkové tkáně a je spojeno s větším funkčním postižením (Rosso M., Chitnis T., 2020).



### **1.4.1.3 Vitamin D**

Podobně jako kouření, je i nízká hladina vitamínu D v séru spojována spíše s rizikem vzniku RS (Fatima M. et al., 2022). Existují ale observační studie, které popisují asociaci vyšších hladin vitamínu D s nižším rizikem relapsu a s nižším počtem nových lézí na MR, zatímco jiné studie popisují asociaci nízké hladiny vitamínu D s vyšším rizikem relapsu i vyšším EDSS (Broła W. et al., 2016; Fitzgerald K.C. et al., 2015; Simpson Jr S. et al., 2010). Meta-analýza zkoumající počet relapsů, aktivitu na MR i EDSS však neprokázala lepší výsledky u pacientů s vyšší hladinou vitamínu D (McLaughlin L. et al., 2018). Vliv vitamínu D na průběh onemocnění se tak zdá být přeceňován; nelze vyloučit ani obrácenou kauzalitu. Jiným vysvětlením může být nedostatečná statistická síla observačních studií, na kterých byla tato meta-analýza založena, aby prokázaly méně markantní efekt hladiny vitamínu D na průběh onemocnění (Fatima M. et al., 2022). Vliv vitamínu D je podpořen i demografickou studií na velkém počtu pacientů, která prokázala jak vyšší riziko vzniku RS, tak méně příznivý průběh onemocnění u pacientů v závislosti na zeměpisné šířce (v rámci mírného pásma, severnější lokality rizikovější) a intenzitě UVB záření (nižší je rizikovější) v místě bydliště pacienta (Vitkova M. et al., 2022). V každém případě je všem pacientům s RS léčeným v České republice nadále doporučována suplementace vitamínu D, jak uvedeno i v doporučeném postupu pro diagnostiku a léčbu RS a NMO-SD (Kubala Havrdová E., Piňha J., 2020).

## **1.4.2 Neovlivitelné rizikové faktory (vlastní prognostické biomarkery)**

### **1.4.2.1 Klinické charakteristiky a demografické údaje**

Klinické charakteristiky a demografické údaje se řadí mezi nejstarší diagnostické a prognostické biomarkery.

#### **1.4.2.1.1 Pohlaví**

Jeden z nejčastěji studovaných rizikových faktorů vůbec je faktor pohlaví. Obecně se má za to, že ženské pohlaví má u pacientů s RS protektivní význam (Bergamaschi R., 2006). To by bylo v souladu s většinou jiných autoimunitně podmíněných onemocnění, která bývají častější u žen, ale prognóza je horší, pokud se nemoc objeví u méně často postiženého muže. Některé studie však lepší prognózu u žen neprokázaly (Amato M.P. et al., 1999; Bergamaschi R. et al., 2005; Broman T. et al., 1981; Phadke J.G., 1990; Riise T. et al., 1992; Visscher B.R. et al., 1984). Rozdíly mezi pohlavími neshledala ani recentní

studie, která připisuje dosud tradovanou horší prognózu mužů skutečnosti, že je u nich typ PP-RS dvakrát častější než u žen (Luetic G.G. et al., 2022). Podobně jiný přehledový článek na toto téma neudává horší prognózu jednoho či druhého pohlaví, ale popisuje možné rozdíly mezi nimi (Nytrová P., Doležal O., 2022). Zatímco u žen jsou častější relapsy se zrakovými a senzitivními příznaky, jsou relapsy s motorickými, kmenovými a mozečkovými příznaky častější u mužů (Kalincik T. et al., 2014). Podle jedné práce bylo také u žen pozorováno vyšší riziko vzniku relapsu, naproti tomu muži vykazovali horší (neúplné) zotavení se po relapsech (Kalincik T. et al., 2013).

#### **1.4.2.1.2 Rasa/Etnikum**

Z dostupné literatury vyplývá, že lidé europoidní rasy mají vyšší riziko onemocnění RS, ale onemocnění u nich probíhá příznivěji než u jiných populací (Espiritu A., Oh J., 2022; Langer-Gould A.M. et al., 2022). Nejhorší situace je u lidí negroidní rasy, kteří mají podobné riziko vzniku RS jako lidé europoidní rasy, a zároveň mívají těžší průběh onemocnění (Langer-Gould A.M. et al., 2022; Vasconcelos C.C.F. et al., 2016). V populaci amerických pacientů byl pozorován rychlejší rozvoj funkčního postižení u pacientů latinskoamerického etnika, populace pacientů původem ze Středního východu a Afroameričanů, než u pacientů europoidní rasy (Seyman E. et al., 2020; Ventura R.E. et al., 2016). Pacienti europoidní rasy mají podle jedné studie také nižší riziko druhého relapsu v prvním roce od diagnózy (Mowry E.M. et al., 2009).

#### **1.4.2.1.3 Věk v době prvního relapsu**

První příznaky onemocnění RS se nejčastěji objevují mezi 20. a 40. rokem života; lze proto předpokládat, že horší průběh onemocnění budou vykazovat pacienti, kterým bylo v době prvního relapsu méně než 20 nebo více než 40 let (Vachová M., 2013). U starších pacientů se většinou vyvíjí forma PP-RS s rychlejší progresí invalidity, nebo jejich RR-RS rychle přechází do SP-RS (Kovářová I. et al., 2013). Vyšší věk v době prvního relapsu (zde míněno 1. příznaku) koreluje s kratší dobou do dosažení EDSS 3, 4, 6 a 7 (Confavreux C., Vukusic S., 2006; Lefort M. et al., 2022). Nižší věk v době prvního příznaku sice koreluje s pomalejším dosažením určité míry funkčního postižení, tohoto postižení však pacienti přesto dosahují v časnějších fázích života (Confavreux C., Vukusic S., 2006). Ve věku 50 let mají proto pacienti s RS na každých 5 let trvání nemoci EDSS horší o 0,22, lesion load (měřeno dle T2 lézí) větší o 1,86 ml, „brain parenchymal fraction“ (poměr objemu mozkové tkáně k celkovému objemu mozku vč. likvorových prostor) menší o 0,97 %,

1,3násobně vyšší riziko přechodu do SP-RS a 1,24násobně vyšší riziko nezaměstnanosti (Bose G. et al., 2022). Nižší věk v době diagnózy byl také asociován s časnějším přechodem z tzv. radiologicky izolovaného syndromu i CIS do CD-MS (Lebrun-Frenay C. et al., 2020; Okuda D.T. et al., 2014; Tintore M. et al., 2015).

#### **1.4.2.1.4 Charakter prvního relapsu**

Za negativní prognostické markery se považují některé charakteristiky prvního relapsu, resp. následujícího období. Zejména se jedná o první relaps s projevy pyramidovými, mozečkovými, sfinkterovými, kognitivními, a také s multifokální symptomatikou. U pacientů s těmito projevy v úvodu onemocnění lze očekávat dřívější dosažení míry funkčního postižení vyjádřené hodnotami EDSS 4 a 6 (Amato M.P. et al., 1999; Bergamaschi R., 2006; Pitteri M. et al., 2016; Vasconcelos C.C.F. et al., 2016). Podobně predikuje dosažení EDSS 3, 6, konverzi do SP-RS ale i vyšší frekvenci relapsů neúplné zotavení se z prvního relapsu (Leray E. et al., 2010; Vasconcelos C.C.F. et al., 2016). Velmi důležitým prognostickým markerem je ARR během prvních let od diagnózy a s tím spjatá doba do druhého relapsu. Krátká doba do druhého relapsu predikuje dřívější dosažení EDSS 3 a 6; vyšší počáteční ARR navíc i dosažení EDSS 8 a konverzi do SP-RS (Leray E. et al., 2010; Scalfari A. et al., 2010; Vasconcelos C.C.F. et al., 2016). Naopak, příznivější průběh onemocnění byl pozorován u pacientů, jejichž první příznaky tvořila symptomatika z postižení aferentních drah, s kompletní úzdravou po prvním relapsu, a s nízkým počátečním ARR (Skoog B. et al., 2012).

#### **1.4.2.1.5 Komorbidity**

Přítomnost vaskulárních komorbidit (diabetes mellitus, arteriální hypertenze, hypercholesterolemie, kardiální onemocnění, onemocnění periferních cév) v době prvního relapsu, v době diagnózy, i nový záchyt cévních rizik kdykoliv v průběhu onemocnění RS, jsou asociovány s rychlejším zhoršováním funkčního postižení (Marrie R.A. et al., 2010). Také zvyšují riziko relapsu, pravděpodobnost eskalace terapie v následujících pěti letech a jsou asociovány s horším kognitivním výkonem (Marrie R.A. et al., 2022; Petruzzo M. et al., 2021). Podobně byla pozorována korelace s vyšší mírou funkčního postižení u pacientek s psychiatrickými komorbiditami (afektivní nebo úzkostné poruchy) (McKay K.A. et al., 2018). Pacienti s RS jsou ve vyšším riziku vzniku epilepsie (všechny typy záchvatů) i cévní mozkové příhody (jakýkoli typ) (Hong Y. et al., 2019; Poser C.M., Brinar V.V., 2003). Kombinace uvedených neurologických onemocnění jistě podmiňuje horší

prognózu, studie zaměřené na tuto problematiku však zatím nebyly provedeny. V porovnání se zdravou populací je dále u pacientů s RS vyšší incidence nejen jiných autoimunitních onemocnění, zejména onemocnění štítné žlázy, zánětlivého postižení GIT (inflammatory bowel disease) a psoriázy, ale také jiných onemocnění – meningeomů, karcinomů urogenitálního traktu, dráždivého tračníku, katarakt a syndromu neklidných nohou (Marrie R.A. et al., 2015).

#### **1.4.2.2 Nález na magnetické rezonanci**

Kromě diagnostiky a sledování průběhu onemocnění má MR významné místo i při odhadu prognózy onemocnění.

##### **1.4.2.2.1 Počet T2 lézí na první magnetické rezonanci mozku**

Jeden z nejdůležitějších parametrů je počet T2 lézí na první MR mozku. U pacientů s CIS predikuje přítomnost lézí na první MR mozku výrazně vyšší pravděpodobnost přechodu do CD-MS i následné dosažení EDSS 3, zatímco u pacientů s RR-RS byla prokázána přímá úměrnost mezi počtem lézí na první MR mozku a rizikem dosažení EDSS 6 do 20 let od diagnózy (Fisniku L.K. et al., 2008; Tintore M. et al., 2015). Ve studii s kombinovanými klinickými a MR biomarkery nejlépe predikovaly šestiměsíční potvrzené zhoršení v EDSS nálezy na první MR mozku: počet T2 lézí, celkový objem T2 a T1 lézí (lesion load) a normovaný objem corpus callosum a thalamu (Uher T. et al., 2016).

##### **1.4.2.2.2 T1 léze enhancující po podání gadolinia na první magnetické rezonanci mozku**

Přítomnost T1 lézí enhancujících po podání gadolinia v prvním roce po zahájení terapie DMD je možné využít jako „surrogate marker“ pro vznik relapsů v roce následujícím (Sormani M.P., Bruzzi P., 2013). Tento marker predikuje také přechod do SP-RS do 15 let (Brownlee W.J. et al., 2019). Vyšetření však není rutinně využíváno vzhledem ke snaze o minimalizaci podávání gadolinia vzhledem k možnosti jeho dlouhodobého ukládání do mozkové tkáně s potenciálně škodlivými účinky (Vaněčková M., Seidl Z., 2018). Místo toho se ke kontrolním vyšetřením využívají sekvence T2 a FLAIR, které poskytují dostatečnou informaci o nových a/nebo zvětšujících se lézích svědčících pro aktivitu nemoci a mají i podobnou prognostickou hodnotou (Sormani M.P., Bruzzi P., 2013). Praktický význam má hodnocení přítomnosti T1 lézí enhancujících po podání gadolinia v případě první MR mozku. Přítomnost těchto lézí u pacientů s CIS koreluje v 15letém

horizontu s výkonem v kognitivních testech „Paced Auditory Serial Addition Test“ a „Symbol Digit Modalities Test“ a zvyšuje riziko přechodu do SP-RS, zatímco počet T1 lézí koreluje ve stejném časovém horizontu s EDSS (Brownlee W.J. et al., 2019). Nepříznivá prognostická hodnota T1 lézí enhancujících po podání gadolinia je také zohledněna v indikačních kritériích anti-CD20 terapie po prvním relapsu onemocnění. Terapie anti-CD20 může být v současné době zahájena, pokud jsou na MR mozku přítomny známky nepříznivé prognózy, za které se pokládá přítomnost T1 lézí enhancujících po podání gadolinia, infratentoriálních lézí nebo lézí spinálních (viz níže). Neenhancující T1 léze („black holes“) nejlépe korelují s mírou funkčního postižení dle EDSS (kdykoliv v průběhu onemocnění), méně tak T1 léze enhancující po podání gadolinia, případně T2 léze (Valizadeh A. et al., 2021; Vaněčková M., Seidl Z., 2018).

#### **1.4.2.2.3 Infratentoriální léze na první magnetické rezonanci mozku**

Lokalizace ložisek na první MR mozku je dalším uznávaným prognostickým biomarkerem. Jejich přítomnost v infratentoriální lokalizaci predikuje u pacientů s RIS konverzi do CD-MS do 10 let (Lebrun-Frenay C. et al., 2020). Podobně predikují léze v této oblasti u pacientů s CIS konverzi do CD-MS, i dřívější dosažení EDSS 3 (Minneboo A. et al., 2004; Tintore M. et al., 2010).

#### **1.4.2.2.4 Spinální léze v době diagnózy**

Přítomnost spinálních lézí v době diagnózy u pacientů s RIS zvyšuje riziko přechodu do CD-MS do 5 let (Okuda D.T. et al., 2014). U pacientů s CIS přítomnost spinálních lézí v době diagnózy, stejně jako nové spinální léze v prvních letech od diagnózy, koreluje s EDSS v dalším průběhu a významně zvyšuje riziko přechodu do SP-RS v 15letém horizontu (Brownlee W.J. et al., 2019). U pacientů s CIS, kteří vyvinou CD-MS, počet spinálních lézí koreluje s ARR (Cordonnier C. et al., 2003).

#### **1.4.2.2.5 Atrofie mozku a míchy**

Obecně je u pacientů s RS atrofie mozku asociována s horším kognitivním výkonem (Pitteri M. et al., 2016; Uher T. et al., 2017), atrofie míchy s mírou funkčního postižení (Casserly C. et al., 2018). Míra mozkové atrofizace se využívá v klinických studiích jako jeden z parametrů hodnocení efektu terapie DMD – patří do konceptu NEDA 4 (rozdíl od NEDA 3, viz výše). Celková mozková atrofie, kortikální atrofie a rozšíření komorového

systému na první MR mozku korelují s budoucím klinickým postižením definovaným jako šestiměsíční potvrzené zhoršení v EDSS (Uher T. et al., 2014).

### **1.4.2.3 Biomarkery v séru a likvoru**

Zatím žádný z likvorových či sérových biomarkerů nebyl dostatečně validován, aby se mohl stát součástí běžné klinické praxe.

#### **1.4.2.3.1 Intrathekální syntéza imunoglobulinů**

Využití intrathekální syntézy imunoglobulinů v diagnostice RS již bylo popsáno výše. V této části se zaměřujeme na jejich roli ve stanovování prognózy onemocnění, zejména na oligoklonální pásy a třídu IgM.

##### **1.4.2.3.1.1 Imunoglobuliny G**

Vzhledem k tomu, že jsou OCGB součástí aktuálních diagnostických kritérií, nelze jejich pouhou pozitivitu využít jako prognostický marker. Prognostická hodnota kvantitativního stanovení OCGB v likvoru byla již studována a přinesla rozporuplné výsledky (Avasarala J.R. et al., 2001; Dalla Costa G. et al., 2015).

##### **1.4.2.3.1.2 Imunoglobuliny M**

Na rozdíl od IgG byla intrathekální syntéza ve třídě IgM prokázána pomocí oligoklonálních pásů (OCMB) u 20,8 % pacientů s RS, a skýtá proto potenciál jako prognostický biomarker (Frau J. et al., 2018). Ve studii se 141 pacienty byla OCMB pozitivita prokázána jenom u pacientů s RS nebo s neuroinfekcí (Villar L.M. et al., 2002b). U pacientů s RS koreluje intrathekální syntéza ve třídě IgM s intrathekální syntézou C3 složky komplementu, koncentrací myelinového bazického proteinu v likvoru, CD5+ B lymfocyty v séru i likvoru a likvorovými hladinami CXCL13 a *tumor necrosis factor alpha* (Frequin S.T.F.M. et al., 1992; Sellebjerg F. et al., 1998; Villar L.M. et al., 2010). V několika studiích byla OCMB pozitivita u pacientů asociována s horší prognózou na základě vyšších hodnot EDSS, kratší doby do dosažení EDSS 3, 4 a 6, vyšší pravděpodobnosti konverze do CD-MS, kratší doby do rozvoje SP-RS a vyššího počtu relapsů (Mandrioli J. et al., 2008; Perini P. et al., 2006; Villar L.M. et al., 2002a; Villar L.M. et al., 2003; Villar L.M. et al., 2002b). V některých studiích naopak nebyla prokázána žádná korelace s dobou do dosažení EDSS 3 ani s dobou do druhého relapsu (Frau J. et al., 2018; Schneider R. et al., 2007).

#### **1.4.2.3.2 Interleukiny**

Interleukiny jsou molekuly sloužící k přenosu informací mezi buňkami imunitního systému, obecně s převažujícím pro- či protizánětlivým účinkem. V patogenezi RS byl prokázán posun této rovnováhy směrem k zvýšení („upregulace“) prozánětlivých interleukinů, zatímco protizánětlivé interleukiny jsou sníženy („downregulace“) (Ishizu T. et al., 2005).

##### **1.4.2.3.2.1 Interleukin 2**

Interleukin 2 (IL-2) je hlavní autokrinní a parakrinní růstový faktor T lymfocytů, jenž se účastní zejména regulace klonální expanze antigen specifických T lymfocytů (Peakman M., Vergani D., 2009; Schroeter M., Jander S., 2005). Hraje také roli v regulaci růstu, diferenciaci a aktivaci B lymfocytů, NK buněk a cytotoxických T lymfocytů (Peakman M., Vergani D., 2009). Zvýšená exprese IL-2 Th17 lymfocyty, buňkami s hlavní rolí v patogenezi RS, byla popsána u pacientů s RS ve srovnání se zdravými kontrolami (Capone A. et al., 2019; Volpe E. et al., 2015). Vyšší koncentrace IL-2 v likvoru byly pozorovány u pacientů s RS ve srovnání s kontrolami (Duan H. et al., 2013). Vyšší likvorové koncentrace IL-2 byly také pozorovány v době relapsu RS (Sharief M.K., Thompson E.J., 1993). Bylo nalezeno množství nukleotidových polymorfismů v genu kódujícím molekulu CD25 (alfa podjednotka receptoru pro IL-2), které zvyšují riziko rozvoje RS (Hafler D.A. et al., 2007). Na základě tohoto faktu byla na trh uvedena vysoce účinná terapie založená na monoklonálních protilátkách proti molekule CD25, i když ta musela být záhy z trhu stažena pro závažné nežádoucí účinky (Cohan S.L. et al., 2019; Preiningerova J.L., Vachova M., 2017).

##### **1.4.2.3.2.2 Interleukin 6**

Interleukin 6 (IL-6) je multifunkční cytokin produkovaný širokou škálou imunitních buněk, který hraje hlavní roli v regulaci imunitního systému (Barton B.E., 1997; Schroeter M., Jander S., 2005). Kromě toho, že je IL-6 důležitým reaktantem akutní fáze zánětu, podporuje také diferenciaci a proliferaci B lymfocytů a plazmatických buněk a zvyšuje sekreci imunoglobulinů (Barton B.E., 1997). Je klíčovým cytokinem ve vývoji Th17 lymfocytů, antigen specifických cytotoxických T lymfocytů a monocytů (Barton B.E., 1997; Peakman M., Vergani D., 2009). Při testování na zvířecím modelu RS, experimentální autoimunitní encefalomyelitidě (EAE), byly myši s homologním vyřazením genu kódujícího IL-6 rezistentní k indukci EAE (Eugster H.P. et al., 1998). U pacientů

s RS byla imunohistochemickými metodami prokázána afinita IL-6 k akutním a aktivním chronickým plakám i jeho přítomnost v nich (Maimone D. et al., 1997). Imunocytochemickými metodami byl IL-6 prokázán i v mozkové tkáni kontrol, jeho exprese byla však u pacientů s (aktivní) RS významnější (Cannella B., Raine C.S., 2004). Jiná imunocytochemická studie předpokládá možnou roli IL-6 v remyelizačních procesech, které s odstupem nastupují v místě akutní demyelinizační léze způsobené RS (Schönrock L.M. et al., 2000). Sérové i likvorové hladiny IL-6 jsou významně vyšší u pacientů s RS ve srovnání s kontrolami s nezářlivým neurologickým onemocněním (Matsushita T. et al., 2013; Stampanoni Bassi M. et al., 2020; Stelmasiak Z. et al., 2000).

#### **1.4.2.3.2.3 Interleukin 10**

Interleukin 10 (IL-10), pleiotropní cytokin produkovaný hlavně Th2 lymfocyty, se vyznačuje silným protizánětlivým efektem. Ten je zprostředkován zejména na podkladě neutralizace prozánětlivých účinků mnoha cytokinů produkovaných Th1 lymfocyty, jako jsou např. interferon gamma a *tumor necrosis factor alfa*. IL-10 výrazně snižuje expresi hlavního histokompatibilního komplexu druhé třídy, prezentaci antigenů makrofágy a prozánětlivé interakce mezi T lymfocyty a mikroglíí (Schroeter M., Jander S., 2005). U pacientů s nezářlivým neurologickým onemocněním je exprese genu pro IL-10 výraznější v likvorových buňkách než v buňkách v periferní krvi. U pacientů s RS, kteří právě prodělávají relaps onemocnění, je tento rozdíl méně patrný (Romme Christensen J. et al., 2012). U pacientů s RS je počet B lymfocytů produkujících IL-10 v séru nižší než u kontrol (Xiang W. et al., 2021). Úplná absence produkce IL-10 u myši s EAE (tj. IL-10 knockout myši) má za následek těžký průběh nemoci s tím, že k úzdravě je nutné nastartování produkce IL-10 B lymfocyty, ideálně v časných fázích onemocnění (Fillatreau S. et al., 2002; Matsushita T. et al., 2008).

#### **1.4.2.3.3 Chitinázám podobné bílkoviny**

Chitinázám podobné bílkoviny jsou exprimovány astrocyty a mikroglíí jako odpověď na zánět a účastní se tak na procesech vrozené i získané imunity (Dubuisson N. et al., 2017; Lee C.G. et al., 2011). V částech mozku, kde proběhla demyelinizace, tvoří chitinázám podobné bílkoviny součást mikroprostředí potřebného k regeneraci nervové tkáně. Tuto regeneraci zabezpečují neurální kmenové buňky, které nahrazují poškozené oligodendrocyty (Starossom S.C. et al., 2019). Dle proteomové analýzy likvoru jsou chitinase 3-like 1 (CHI3L1) a chitinase 3-like 2 (CHI3L2) významně exprimovány v CNS



u pacientů s RS ve srovnání s kontrolními subjekty (Hinsinger G. et al., 2015). Snížení hladin bílkovin s chitinázovou aktivitou po zahájení léčby DMD také naznačuje roli těchto bílkovin v patogenezi RS, i když konkrétně pro CHI3L2 toto studováno nebylo (Dubuisson N. et al., 2017).

#### **1.4.2.3.3.1 Chitinase 3-like 1**

CHI3L1 byl u pacientů s RS více zkoumán než CHI3L2 (Dubuisson N. et al., 2017). Likvorové hladiny CHI3L1 jsou významně vyšší u pacientů s RS než u zdravých kontrol. Likvorové hladiny CHI3L1 jsou také vyšší ve fázi remise onemocnění ve srovnání s hodnotami během relapsu (Floro S. et al., 2022). A konečně, likvorové hladiny CHI3L1 jsou vyšší u pacientů s PP-RS ve srovnání s pacienty s RR-RS i SP-RS (Floro S. et al., 2022). Co se týče prognostické hodnoty, bylo zjištěno, že zvýšené hodnoty CHI3L1 predikují konverzi z CIS do CD-MS, rozvoj funkčního postižení a zhoršování kognitivních funkcí v dlouhodobém horizontu (Cantó E. et al., 2015; Modvig S. et al., 2015).

#### **1.4.2.3.3.2 Chitinase 3-like 2**

Na rozdíl od CHI3L1, je význam CHI3L2, jeho nejbližšího analogu, dosud nejasný. U pacientů, kteří prodělali ON jako první příznak onemocnění, byly nalezeny zvýšené hladiny CHI3L2 v likvoru odebraném v rámci diagnostické lumbální punkce. V této skupině byly likvorové hladiny CHI3L2 vyšší než u zdravých kontrol, korelovaly s markery tkáňového poškození, jako jsou lehké řetězce neurofilament, myelinový bazický protein, osteopontin, CHI3L1, a predikovaly kognitivní dysfunkci v dlouhodobém horizontu. V multivariační analýze dokázal CHI3L2 predikovat přechod z CIS do CD-MS dokonce lépe než CHI3L1 (Møllgaard M. et al., 2016). Nedávná studie u pacientů s PP-RS označila CHI3L2 jako možný prognostický biomarker rozvoje funkčního postižení v dlouhodobém horizontu (Comabella M. et al., 2021).

#### **1.4.2.3.4 Neurofilamenta**

Neurofilamenta (Nf) tvoří základní stavební součást axonálního cytoskeletu (van Munster C.E.P., Uitdehaag B.M.J., 2017). Rozlišují se lehké řetězce (NfL), střední řetězce, těžké řetězce (NfH) a alfa internexinové podjednotky. Nf jsou z axonů neuronálních buněk permanentně uvolňována do extracelulárního prostoru. V případě axonálního postižení se výrazně zvyšují hladiny detekovatelných Nf, proto je označujeme obecně za marker neurodegenerace, i když jen nespecifický (Ferreira-Atuesta C. et al., 2021). Vzhledem k

nestabilitě struktury jsou ke stanovování na imunoassayích vhodné jenom NfL a NfH (Dubuisson N. et al., 2017).

#### **1.4.2.3.4.1 Lehké řetězce neurofilament**

V literatuře přibývá stále více studií, které hodnotí NfL jako významný biomarker prognózy, aktivity onemocnění a odpovědi na léčbu u pacientů s RS (Benkert P. et al., 2022; Ferreira-Atuesta C. et al., 2021). Hladiny NfL v likvoru velmi dobře korelují s hladinami NfL v séru, kde jsou ale násobně nižší (Disanto G. et al., 2017). V klinické praxi je proto výhodné vyšetřovat zejména sérové hladiny, což je nyní možné za pomoci moderních přístrojů jako je např. Simoa (Kuhle J. et al., 2016). Z recentní meta-analýzy, která zkoumala všechny dostupné studie o NfL v séru u pacientů s RS od začátku jejich vyšetřování až do května 2022, vyplývá, že sérové hladiny NfL jsou vyšší u pacientů s RS ve srovnání se zdravými kontrolami i s pacienty po CIS, jsou vyšší u pacientů s progresivními typy RS než u pacientů s RR-RS, a jsou vyšší i v době relapsu ve srovnání s dobou remise. Stran stanovení prognózy na počátku nemoci (zde bylo do meta-analýzy zahrnuto jenom pět studií) jsou vyšší sérové hladiny NfL schopny predikovat kratší dobu do dosažení EDSS 4 a více, ale nepredikují dobu do druhého relapsu (Ning L., Wang B., 2022). V další velké studii, která ve zmíněné meta-analýze zahrnuta nebyla, bylo potvrzeno vyšší riziko zhoršování funkčního postižení, vzniku relapsů i nových lézí na MR u pacientů s vyšší sérovou hladinou NfL, nejednalo se však o stanovení v době diagnózy (Benkert P. et al., 2022).

#### **1.4.2.3.4.2 Těžké řetězce neurofilament**

NfH bylo u pacientů s RS věnováno méně pozornosti, a to i navzdory potenciální komplementární roli NfH a NfL v patogenezi zánětlivých a neurodegenerativních procesů CNS (Dubuisson N. et al., 2017). Byla nalezena korelace mezi hladinami NfH v likvoru a věkem, ale také signifikantně vyšší hladiny u pacientů s CIS, RR-RS, SP-RS a PP-RS po korekci pro věk. Relativně vyšší hladiny NfH v likvoru byly pozorovány u pacientů s progresivními formami RS ve srovnání s RR-RS (Petzold A. et al., 2005). Během relapsu onemocnění dochází ke zvýšení likvorových hladin NfH (Kuhle J. et al., 2011). Likvorové hladiny NfH u pacientů s CIS a RR-RS v průřezových korelují s EDSS a také predikují mozkovou a míšňí atrofii v dlouhodobém horizontu (Kuhle J. et al., 2011; Petzold A., 2015; Teunissen C.E. et al., 2009). Hladiny NfH v likvoru také reagují poklesem na léčbu natalizumabem u pacientů s aktivním onemocněním (Kuhle J. et al., 2013). Na rozdíl od

NfL nekoreluje u pacientů s RS hladiny NfH v likvoru s hladinami v séru (Eikelenboom M.J. et al., 2011).

## 2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Obecným cílem této práce bylo verifikovat prognostický potenciál některých biomarkerů stanovených v likvoru a séru u pacientů s RS na počátku onemocnění. Potenciální biomarkery byly vybrány s ohledem na výše uvedený literární přehled (doplňný ex post o recentní studie), který poskytuje základní informace o možnostech stanovení prognózy a vyčerpávající informace o biomarkerech vybraných ke studiu pro účely této práce.

### 2.1 Cíle práce

Stanovit průběh onemocnění na základě:

- klinických ukazatelů: doba do druhého relapsu, ARR, změna v EDSS, šestiměsíční potvrzené zhoršení v EDSS
- MR ukazatelů: přítomnost nových lézí nebo zvětšení objemu stávajících lézí (lesion load), progresse mozkové atrofie
- komplexního ukazatele NEDA 4

Vyhodnotit schopnost uvedených biomarkerů predikovat průběh onemocnění a posoudit, zda se jedná o nezávislé prognostické markery (v korelaci s dalšími studovanými biomarkery i potenciálními „confoundery“).

### 2.2 Hypotézy

S horší prognózou onemocnění koreluje:

- pozitivita OCMB
- pozitivita intrathekální syntézy IgM dle odečtu z Reiberova diagramu (IgM calc)
- vysoká hodnota Index<sub>IL-2</sub>
- vysoká hodnota Index<sub>IL-6</sub>
- nízká hodnota Index<sub>IL-10</sub>
- vysoká hodnota Index<sub>CHI3L2</sub>
- vysoká koncentrace NfH v séru
- vysoká koncentrace NfH v likvoru

Koncentrace NfH v likvoru nekoreluje s koncentrací NfH v séru.

### 2.3 Ad hoc hypotézy

S horší prognózou onemocnění koreluje:

- vysoká koncentrace IL-2 v likvoru
- vysoká koncentrace IL-6 v likvoru
- nízká koncentrace IL-10 v likvoru
- vysoká koncentrace CHI3L2 v likvoru
- vysoká hodnota poměru likvorových hodnot IL-2 ku IL-6 (IL-2:IL-6<sub>CSF</sub>)

### **3 METODIKA**

Do studie mohli být zařazeni všichni nově diagnostikovaní a dosud neléčení pacienti s RS, kteří zahájili terapii DMD první linie v Centru pro diagnostiku a léčbu demyelinizačních onemocnění při Neurologické klinice 2. LF UK a FN Motol mezi lednem 2017 a květnem 2018. V České republice se za první linii DMD v době nábory pacientů do studie považoval glatiramer acetát, teriflunomid a skupina interferonů beta. Zařazeni byli jenom pacienti, kteří podstoupili diagnostickou lumbální punkci do čtyř měsíců od nástupu prvních příznaků RS a terapie DMD u nich byla zahájena nejpozději do jednoho roku od tohoto vyšetření. Pacienti, u nichž byla zahájena léčba DMD nebo byli přeléčeni kortikosteroidy ještě před lumbální punkcí (tj. v případě kortikosteroidů v předchozích čtyřech měsících), do studie zařazeni nebyli. Diagnóza RS byla stanovena na základě McDonaldových diagnostických kritérií z roku 2017. Během sledovacího období bylo vzhledem k aktivitě onemocnění osm pacientů eskalováno na tzv. vysoce účinnou terapii („high efficacy therapy“), zatímco 50 pacientů pokračovalo během celého sledovacího období na léčbě DMD první linie nezávisle na aktivitě onemocnění. Rozhodování ohledně terapie bylo ponecháno na neurologovi Centra pro diagnostiku a léčbu demyelinizačních onemocnění, který neměl přístup k výsledkům vyšetřovaných biomarkerů. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole dne 30.10.2018 a všichni účastníci (pacienti s RS i kontrolní subjekty) podepsali informovaný souhlas. Veškerá data tvořící podklady pro tuto studii jsou dostupná na veřejném úložišti dat (Petržalka M., 2022).

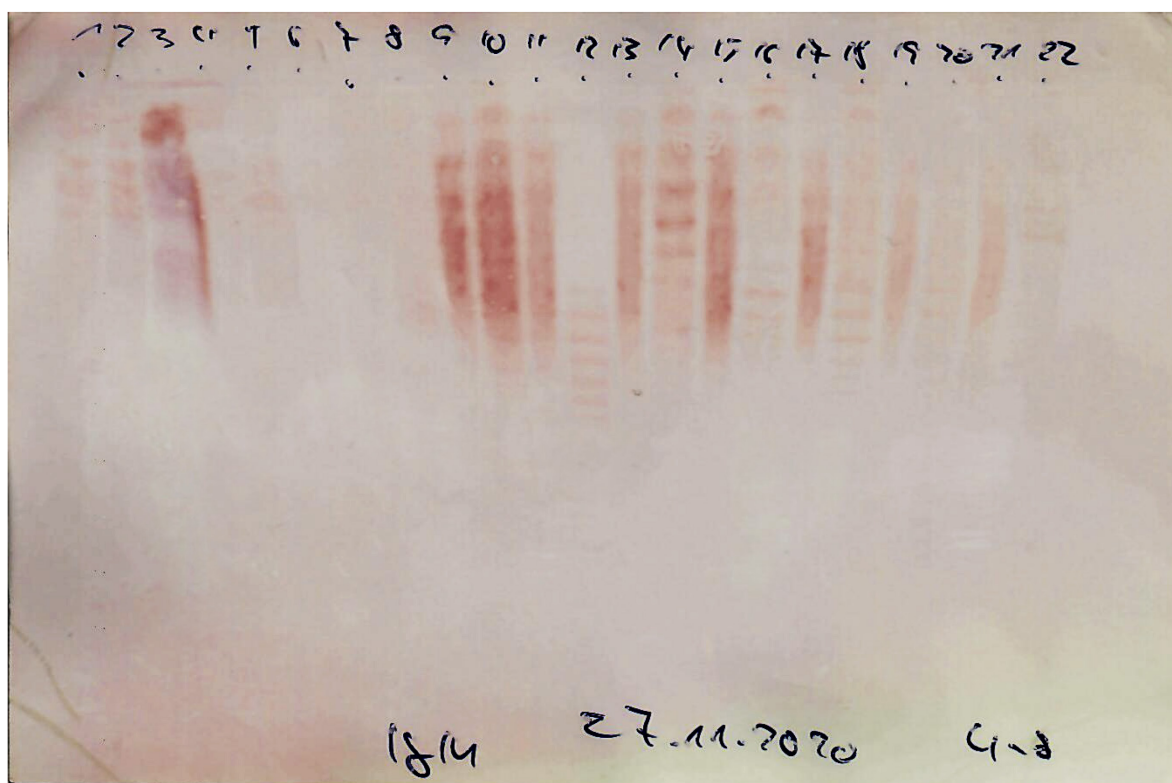
#### **3.1 Analýza likvoru a séra**

Pacienti podstoupili lumbální punkci v rámci standardního diagnostického procesu, jehož součástí je stanovení intrathekální syntézy na základě IgG calc a OCGB. Vzorky likvoru a séra byly následně uchovány při -80 °C až do provedení dalších analýz.

##### **3.1.1 Intrathekální syntéza imunoglobulinů M**

Pro účely této studie byla intrathekální syntéza ve třídě IgM stanovena oběma výše uvedenými metodami (IgM calc, OCMB). OCMB nebyly v naší laboratoři dosud vyšetřovány, bylo proto nutné zavést novou metodiku. Níže uvedený postup je výsledkem tohoto procesu, kdy jsme testovali možnosti fragmentace pentamerů, primární a sekundární protilátky, případnou afinitu primárních protilátek k jiným než lidským imunoglobulinům třídy IgM. Výsledky jsme konzultovali s dalšími likvorologickými pracovišti, čímž bylo

zajištěno dosažení validních výsledků (Obr. 4). Pro IEF ve třídě IgM bylo použito pH gelu v rozmezí mezi čtyřmi a osmi a IgM pentamery byly fragmentovány podle dříve publikovaných postupů (Villar L.M. et al., 2001; Zeman D., Kušnierová P., 2016). Jako primární protilátky byly použity protilátky *goat anti-human* (AffiniPure Goat Anti-Human IgM, Fc<sub>5μ</sub> Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.), na které se navazovaly sekundární protilátky *rabbit anti-goat* (Biotin-SP (long spacer) AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG, Fc Fragment Specific, with minimal cross-reactivity to human serum proteins, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.). Pro vizualizaci byl použit Streptavidin konjugovaný s peroxidázou (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) a 3-amino-9-etylkarbazolové tablety (Sigma-Aldrich®) ředěné v metanolu.



**Obr. 4** Výsledky IEF ve třídě IgM. Vzorky pacientů jsou na pozicích 9-22, liché pozice sérum, sudé pozice likvor. Např.: pozice 12 hodnocena jako 7 OCMB, pozice 14 jako 5 OCMB, pozice 16 jako 3 OCMB, pozice 18 jako 4 OCMB, sérové pozice jenom „smear“.

### 3.1.2 Interleukin 2, interleukin 6, interleukin 10

Ke stanovení koncentrací IL-2, IL-6 a IL10 v séru a likvoru byl použit Luminex™ 200 v protokolu s magnetickými kuličkami (Magnetic Luminex® performance Assay – Human High Sensitivity Cytokine base Kit A, Magnetic Luminex® performance Assay beads,

R&D Systems®), tj. metoda založena na mnohočetných simultánních analýzách průtokovou cytometrií.

### 3.1.3 Těžké řetězce neurofilament

NfH byly stanovovány jako fosforylovaná forma (pNfH). Koncentrace pNfH v likvoru byly stanoveny metodou ELISA (Euroimmun), zatímco pro pNfH v séru bylo validních výsledků dosaženo až metodou High Sensitivity ELISA (Euroimmun).

### 3.1.4 Chitinase 3-like 2

Koncentrace CHI3L2 v séru i likvoru byly stanoveny metodou ELISA (CircuLex Human YKL-39 ELISA high sensitivity kit, MBL Ltd.). Pro ředění séra bylo použito 13násobné ředění, pro likvor 25násobné ředění.

### 3.1.5 Další zpracování výsledků

Vzhledem k tomu, že interleukiny a CHI3L2 mohou mít původ jak v séru, tak v CNS, byly pro další korelace využity indexované hodnoty. Index analytu X byl vypočten podle vzorce  $(X_{likvor} / X_{sérum}) / (Alb_{likvor} / Alb_{sérum})$ , kde Alb znamená albumin. Vzhledem k tomu, že pNfH mají původ v CNS, byly pro další analýzy použity jak hodnoty koncentrací z likvoru, tak hodnoty koncentrací ze séra. Navíc byly tyto hodnoty testovány na přítomnost vzájemné korelace. Za pozitivní IgG calc a IgM calc byla považována hodnota v oblasti tři nebo čtyři dle Reiberova diagramu (Reiber H., Peter J.B., 2001). Za pozitivní OCGB a OCMB byly považovány nálezy izoelektroforegramů typu dva a tři (Freedman M.S. et al., 2005).

## 3.2 Sledovací období

Sledovací období bylo u všech pacientů dvouleté, počínaje dnem prvního podání DMD.

### 3.2.1 Klinické sledování

Sledování bylo zaměřeno zejména na získávání údajů o ročním počtu relapsů a doby do druhého relapsu (v tomto smyslu je za první relaps považován první příznak onemocnění). Pokud došlo k relapsu v období mezi první manifestací onemocnění a zahájením terapie DMD, byl tento relaps zahrnut do ARR pro první rok sledovacího období. Dále byla v pravidelných šestiměsíčních intervalech hodnocena míra funkčního postižení pomocí škály EDSS. Hodnota EDSS nebyla brána v potaz, pokud byla stanovena během relapsu onemocnění; v tomto případě bylo nové hodnocení provedeno po podání i.v.



methylprednisolonu a klinické stabilizaci. Hodnocena byla změna v EDSS mezi začátkem a koncem sledovacího období, a také šestiměsíční potvrzené zhoršení v EDSS (jako jedna z podmínek NEDA 4, viz výše).

### **3.2.2 Magnetická rezonance**

MR mozku byla u pacientů provedena po prvním a po druhém roce sledovacího období. Vyšetření MR se provádělo podle standardizovaného protokolu: 1) sekvence FLAIR v transverzální rovině s tloušťkou řezu 1,5 mm, počet řezů 100, velikost matrice 256×256 a velikost voxelů 1×1×1,5 mm, 2) sekvence T1 v transverzální rovině s tloušťkou řezu 1 mm, počet řezů 150, velikost matrice 256×256 a velikost voxelů 1×1×1 mm. Data z MR byla automaticky vyhodnocena pomocí softwaru MATLAB a SPM12 Toolbox software (The MathWorks Inc., 2020). Léze byly segmentovány podle léze predikujícího algoritmu (Schmidt P., 2017), který je součástí Lesion Segmentation Tool toolbox verze 3.0.0. ([www.statistical-modelling.de/1st.html](http://www.statistical-modelling.de/1st.html)) pro Statistical Parametric Mapping. Byl hodnocen objem mozku (tj. objem mozkové tkáně po odečtení objemu likvoru), přítomnost nových lézí a změna objemu lézí (lesion load).

### **3.2.3 Komplexní hodnocení**

Všechny výše uvedené parametry následně umožnily vyhodnotit, zda pacient dosahuje klinického stavu odpovídajícímu NEDA 4 (jak popsáno výše). Gadolinium nebylo při MR vyšetřeních podáváno, proto T1 gadolinium enhancující léze nebyly pro účely této studie zahrnuty do NEDA 4.

### **3.3 Kontrolní soubor**

Kontrolní soubor byl sestaven z 31 pacientů vyšetřených na Neurologické klinice 2. LF UK a FN Motol v posledních pěti letech před zahájením studie pro jiné diagnózy než demyelinizační onemocnění CNS. Tito pacienti podstoupili lumbální punkci z diagnostických důvodů buď pro bolesti hlavy, nebo bolesti v oblasti páteře. Výsledky základních vyšetření likvoru (cytologie, celková bílkovina, IgG calc) a zobrazení mozku (pokud bylo provedeno) musely být v normě. Analýza studovaných biomarkerů v likvoru a séru byla v kontrolním souboru provedena za účelem stanovení referenčních hodnot pro patientskou skupinu. Referenční hodnoty byly stanoveny přímo na základě výsledků patientské skupiny všude tam, kde to bylo možné.

### 3.4 Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena užitím software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Pro porovnání distribuce zkoumaných proměnných mezi skupinami dostatečnosti operace (např. pacienti vs. kontroly, ARR, lesion load, mozková atrofie, NEDA 4) byly použity neparametrické testy (Wilcoxonův párový test a mediánový test). Rozdíly četnosti byly testovány pomocí Chí-kvadrát testu a Fisherova exaktního testu, zatímco klinický význam jednotlivých faktorů ve vztahu k dostatečnosti operace byl vyjádřen pomocí odds ratio. V analýze pacienti vs. kontroly byly determinační schopnosti jednotlivých markerů vyjádřeny pomocí ROC křivek a obsahů ploch pod ROC křivkami, s následným stanovením specificity, senzitivity a odds ratio za účelem nalezení vhodných referenčních hodnot („cut-off“). Vztahy mezi proměnnými byly zkoumány pomocí koeficientu korelace (Spearmanova korelace). S využitím informací o době do druhého relapsu byla zkoumána pravděpodobnost jeho výskytu pomocí Kaplan-Meierových křivek přežití, rozdíly byly testovány pomocí Log-rank testu a Gehan-Wilcoxonova testu. Zde byl klinický význam jednotlivých faktorů vyjádřen pomocí hazard ratio. Analogicky se postupovalo i při analýze šestiměsíčního potvrzeného zhoršení v EDSS. Multivariační analýza byla zpracována pomocí Coxova regresního modelu. Ad hoc multivariační analýza byla provedena pomocí Coxova regresního modelu zpětné selekce, ve kterém byly postupně eliminovány parametry s hodnotou  $p$  vyšší než 0,3 v univariačních analýzách. Normalita dat pro analýzu EDSS byla testována pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu. Vzhledem k neprokázané normalitě dat byl použit párový Wilcoxonův test (rozdíl hodnot EDSS na začátku a na konci sledovacího období) a pro test rozdílu změny hodnot EDSS v čase mezi zkoumanými skupinami Wilcoxonův dvouvýběrový test. Statistická významnost byla stanovena na hranici  $\alpha = 5\%$ .

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Výchozí data souboru pacientů a kontrolního souboru

#### 4.1.1 Soubor pacientů

Celkem naplnilo zařazovací kritéria 58 pacientů (z toho čtyři pacienti odpovídali historické jednotce CIS, tj. nenaplnili McDonaldovy diagnostická kritéria z roku 2017, ale pro vysoké riziko rozvoje CD-MS u nich byla zahájena léčba DMD). Na začátku sledovacího období bylo průměrné EDSS všech pacientů ve studii  $1,5 \pm 1$ . Průměrná doba od prvních příznaků do stanovení diagnózy byla  $1,1 \pm 1,3$  měsíce. Průměrná doba od stanovení diagnózy do zahájení terapie DMD byla  $3,7 \pm 2,0$  měsíce. Většina pacientů zahájila terapii DMD peginterferonem beta-1a (27), o něco méně pacientů glatiramer acetátem (20), dále i.m. interferonem beta-1a (5), s.c. interferonem beta-1a (5) a interferonem beta-1b (1) (Tab. 4).

#### 4.1.2 Srovnání souboru pacientů a kontrolního souboru

Demografické charakteristiky obou souborů byly srovnatelné (Tab. 4). U 64 % pacientů byla prokázána pozitivita IgG calc ( $p < 0,0001$ ) a u 95 % pozitivita OCGB ( $p < 0,0001$ ). Ve třídě IgM byla u 31 % pacientů prokázána pozitivita IgM calc ( $p = 0,0004$ ) a u 36 % pozitivita OCMB ( $p = 0,0005$ ). Naproti tomu u žádného z kontrolních subjektů nebyla prokázána pozitivita OCGB či IgM calc a jenom u jednoho kontrolního subjektu (3 %) byla prokázána pozitivita OCMB. Jak při Index<sub>IL-2</sub> ( $p = 0,0157$ ), tak při Index<sub>IL-10</sub> ( $p = 0,0143$ ) byl prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi souborem pacientů a kontrolním souborem. Index<sub>IL-2</sub> nižší než 0,34 znamenal 4,5násobně vyšší riziko RS ( $p = 0,0063$ ) s vysokou senzitivitou (87,7 %), ale nízkou specificitou (38,7 %). Podobně Index<sub>IL-10</sub> nižší než 0,23 znamenal 4,6násobně vyšší riziko RS ( $p = 0,0053$ ) se senzitivitou 58,6 % a specificitou 71,4 %. Nebyla nalezena korelace mezi pNfH v likvoru a pNfH v séru ( $r_s = 0,05$ ,  $p = 0,7341$ ).

**Tab. 4** Výchozí data

Hodnoty jsou uvedeny jako absolutní hodnoty nebo průměry  $\pm$  směrodatná odchylka, pokud neuvedeno jinak. Hodnoty OCGB a IgM jsou založeny na statistické simulaci (nula subjektů v kontrolním souboru). PT = párový test; ET = exaktní test; - = nehodnoceno; n = počet; Ž = ženy; M = muži; r = roky; m = měsíce; RS = roztroušená skleróza; CIS = klinicky izolovaný syndrom; DMD = disease modifying drugs; EDSS = Expanded Disability Status Scale; IgG calc = intrathekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG; IgM calc = intrathekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu; OCMB = oligoklonální pásy ve třídě IgM; IL-2 = interleukin 2; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; CHI3L2 = chitinase 3-like 2 protein; pNfH = fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament; s.c. = subkutánní; i.m. = intramuskulární

## 4.2 Relapsy

### 4.2.1 Doba do druhého relapsu

#### 4.2.1.1 Univariační analýzy

Analýza doby do druhého relapsu (Tab. 5) prokázala statisticky významné rozdíly mezi pacienty rozdělenými do skupin podle hodnoty Index<sub>IL-2</sub> ( $p=0,0367$ ) a také mezi pacienty rozdělenými do skupin podle hodnoty EDSS v době zahájení terapie DMD ( $p<0,0001$ ). Statisticky nejsilnější cut-off pro Index<sub>IL-2</sub> byl 0,26 ( $p=0,0277$ ), kde vyšší hodnoty znamenaly 2,5násobné riziko ( $p=0,0347$ ) druhého relapsu v prvních dvou letech (Obr. 5). To odpovídá 52% přežití (tj. pravděpodobnosti neprodělání relapsu) v měsíci 12 a 40% přežití v měsíci 24 v rizikové skupině, ve srovnání se 78% v měsíci 12 a 80% v měsíci 24 v méně rizikové skupině. Pacienti s EDSS vyšším než nebo rovným 1,5 v době zahájení terapie DMD měli 2,8násobně vyšší riziko relapsu ( $p=0,0426$ ). Statisticky signifikantní rozdíl byl také nalezen pro pacienty rozdělené do skupin podle sérové koncentrace pNfH ( $p=0,0445$ ); nicméně v dalších analýzách nebylo nalezeno statisticky signifikantní cut-off. Ženské pohlaví také představovalo rizikový faktor ( $p=0,0466$ ), toto ale nebylo potvrzeno v Coxově regresním modelu.

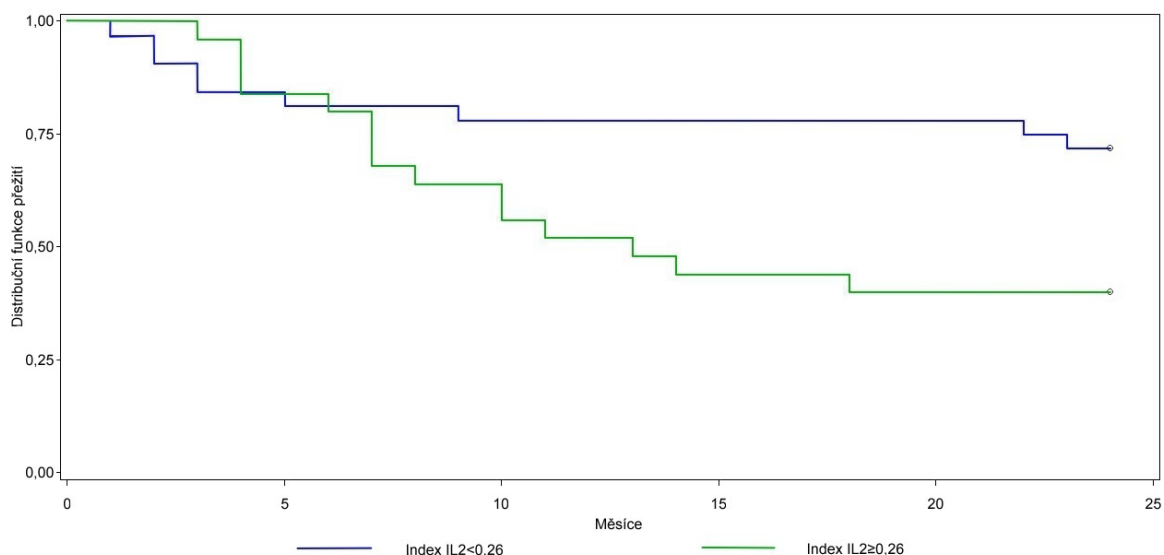
#### 4.2.1.2 Multivariační analýza

V multivariační analýze se věk nižší než 22 let při první manifestaci onemocnění ( $p=0,0465$ ), EDSS v době zahájení terapie DMD vyšší než nebo rovno 1,5 ( $p=0,0496$ ) a pozitivní IgM calc ( $p=0,0151$ ) ukázaly být nezávislými prognostickými markery (Tab. 5).

**Tab. 5** Doba do druhého relapsu

Zkratky v závorkách se vztahují k datům uvedeným v sloupcích označených „Riziková skupina“. K-M = Kaplan-Meier; Ž = ženy; - = nehodnoceno; r = roky; m = měsíce; RS = roztroušená skleróza; CIS = klinicky izolovaný syndrom; N/A = data nedostupná; DMD = disease modifying drugs; s.c. = subkutánní; EDSS = Expanded Disability Status Scale; IgG calc = intratekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu; kval = kvalitativně; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG; IgM calc = intratekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu; OCMB = oligoklonální pásy ve třídě IgM; IL-2 = interleukin 2; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; CHI3L2 = chitinase 3-like 2 protein; pNfH = fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament

	Univariační					Multivariační		
	K-M p-hodnota	Riziková skupina	Cut-off			Riziková skupina	Cut-off	
			K-M p-hodnota	Coxova regrese			Hazard Ratio	p-hodnota
				Hazard Ratio			Hazard Ratio	p-hodnota
Pohlaví	0,0466	Ž	-	3,2	0,0621	Ž	2,2	0,3258
Věk v době prvního relapsu (r)	0,4768	<22	0,2194	2,1	0,2349	<22	5,6	0,0465
Doba do diagnózy (m)	0,2991	≥2	0,4209	1,4	0,4279	≥2	4,0	0,1047
Doba do zahájení terapie (m)	0,7898	<4	0,3355	1,5	0,3437	<4	3,2	0,1447
RS/CIS v době diagnózy	0,1155	N/A	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
DMD první volby	0,5086	interferon beta-1a s.c.	0,2184	2,1	0,2337	interferon beta-1a s.c.	4,6	0,1394
EDSS v době zahájení terapie	<0,0001	≥1,5	0,0326	2,8	0,0426	≥1,5	3,4	0,0496
IgG calc (kval)	0,0970	pozitivní	-	2,1	0,1086	pozitivní	1,5	0,6366
OCGB (kval)	0,6746	pozitivní	-	1,5	0,6801	pozitivní	4,5	0,2708
IgM calc (kval)	0,1850	pozitivní	-	1,7	0,1947	pozitivní	6,6	0,0151
OCMB (kval)	0,5138	negativní	-	1,3	0,5196	negativní	3,9	0,0562
Index <sub>IL-2</sub>	0,0367	≥0,26	0,0277	2,5	0,0347	≥0,26	1,2	0,7869
Index <sub>IL-6</sub>	0,0849	≥0,25	0,0517	2,7	0,0646	≥0,25	3,3	0,1682
Index <sub>IL-10</sub>	0,1334	≥0,20	0,1026	1,9	0,1127	≥0,20	2,0	0,4648
Index <sub>CHI3L2</sub>	0,7056	≥1,79	0,1326	1,8	0,1424	≥1,79	1,4	0,5757
pNfH v likvoru (pg/ml)	0,9237	≥95,0	0,3385	2,5	0,3609	≥95,0	2,1	0,4761
pNfH v séru (pg/ml)	0,0445	<23,3	0,0560	2,7	0,0695	<23,3	1,5	0,6307



**Obr. 5** Doba do druhého relapsu – Index<sub>IL-2</sub>. Graf znázorňuje analýzu „přežití“ pacientů rozdělených dle cut-off 0,26 pro Index<sub>IL-2</sub>. V univariační analýze byl rozdíl mezi skupinami statisticky významný ve prospěch pacientů s nižšími hladinami Index<sub>IL-2</sub> (p=0,0277).

#### 4.2.2 Roční počet relapsů

V analýze ARR (Tab. 6) pro první rok sledovacího období byly EDSS v době zahájení terapie DMD (rizikové hodnoty vyšší než nebo rovné 1,5, p=0,0430), Index<sub>IL-2</sub> (rizikové hodnoty vyšší než nebo rovné 0,26, p=0,0086) a Index<sub>IL-6</sub> (rizikové hodnoty vyšší než nebo rovné 0,25, p=0,0265) schopny rozdělit pacienty do skupin s vyšším, resp. nižším počtem relapsů. Tento efekt již nebyl patrný pro druhý rok sledovacího období, i když stejné markery se ukázaly jako rizikové v analýze kumulativního počtu relapsů za oba roky sledovacího období dohromady (p=0,0453 pro EDSS v době zahájení terapie DMD, p=0,0165 pro Index<sub>IL-2</sub> a p=0,0327 pro Index<sub>IL-6</sub>). Signifikantně víc relapsů během celého sledovacího období (ne ale při hodnocení ARR pro každý rok zvlášť) prodělali pacienti s koncentracemi pNfH v séru nižšími než 23,3 pg/ml (p=0,0406) a pacientky ženského pohlaví (p=0,0375).

**Tab. 6** Roční počet relapsů

Zkratky v závorkách se vztahují k datům uvedeným v sloupcích označených „Riziková skupina“. ARR = roční počet relapsů; Ž = ženy; r = roky; m = měsíce; RS = roztroušená skleróza; CIS = klinicky izolovaný syndrom; DMD = disease modifying drugs; s.c. = subkutánní; EDSS = Expanded Disability Status Scale; IgG calc = intrathekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu; kval = kvalitativně; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG; IgM calc = intrathekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu; OCMB = oligoklonální pásy ve třídě IgM; IL-2 = interleukin 2; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; CHI3L2 = chitinase 3-like 2 protein; pNfH = fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament

	ARR - rok 1		ARR - rok 2		Roky 1 + 2	
	Mediánový test	Cut-off	Mediánový test	Cut-off	Mediánový test	Cut-off
	p-hodnota	Riziková skupina	p-hodnota	Riziková skupina	p-hodnota	Riziková skupina
Pohlaví	0,0994	Ž	0,0560	Ž	0,0375	Ž
Věk v době prvního relapsu (r)	0,2916	<22	0,3203	≥22	0,4288	<22
Doba do diagnózy (m)	0,4221	≥2	0,7880	<2	0,3570	≥2
Doba do zahájení terapie (m)	0,4218	<4	0,9302	≥4	0,3459	<4
RS/CIS v době diagnózy	0,1082	RS	0,3785	RS	0,0737	RS
DMD první volby	0,2916	interferon beta-1a s.c.	0,1169	interferon beta-1a s.c.	0,4288	interferon beta-1a s.c.
EDSS v době zahájení terapie	0,0430	≥1,5	0,4039	≥1,5	0,0453	≥1,5
IgG calc (kval)	0,2726	pozitivní	0,0911	pozitivní	0,0951	pozitivní
OCGB (kval)	0,8673	pozitivní	0,3856	negativní	0,7279	pozitivní
IgM calc (kval)	0,2078	pozitivní	0,5377	negativní	0,2029	pozitivní
OCMB (kval)	0,5899	negativní	0,3464	negativní	0,5651	negativní
Index <sub>IL-2</sub>	0,0086	≥0,26	0,2560	≥0,26	0,0165	≥0,26
Index <sub>IL-6</sub>	0,0265	≥0,25	0,5377	≥0,25	0,0327	≥0,25
Index <sub>IL-10</sub>	0,1075	≥0,2	0,3246	≥0,14	0,0623	≥0,14
Index <sub>CHI3L2</sub>	0,1146	≥1,79	0,8404	≥1,79	0,1565	≥1,79
pNfH v likvoru (pg/ml)	0,3915	≥95,0	0,3203	≥95,0	0,2793	≥95,0
pNfH v séru (pg/ml)	0,1184	<25,5	0,1536	<23,3	0,0406	<23,3

#### 4.2.3 Doba do druhého relapsu: hodnoty v likvoru – ad hoc analýza

Po prvotní analýze vyvstala hypotéza, že by prognostická hodnota studovaných biomarkerů mohla být nezávislá na původu jejich vzniku. Abychom tuto hypotézu ověřili, provedli jsme zvlášť analýzu likvorových hodnot IL-2, IL-6, IL-10 a CHI3L2. Do analýzy jsme, na základě předchozích výsledků a v souladu s popsányi funkcemi obou interleukinů, zahrnuli také poměr likvorových hodnot IL-2 a IL6 (IL-2:IL-6CSF) předpokládajíc jejich komplementární funkce (Liao W. et al., 2013).



#### 4.2.3.1 Univariační analýzy

Univariační analýza neprokázala statisticky významné rozdíly ani u jednoho ze studovaných parametrů, až do provedení analýzy nejsilnějšího cut-off (Tab. 7). Poměr IL2:IL6<sub>CSF</sub> nižší než 0,48 znamenal 3,8násobné riziko ( $p=0,0151$ ) druhého relapsu v prvních dvou letech. Koncentrace IL-6 v likvoru vyšší než nebo rovna 2,89 pg/ml znamenala rovněž 3,8násobné riziko ( $p=0,0151$ ). Koncentrace IL-10 v likvoru vyšší než nebo rovna 0,76 pg/ml znamenala 2,4násobné riziko ( $p=0,0367$ ). Cut-off hodnota 1,23 pg/ml pro koncentrace IL-2 v likvoru byla statisticky signifikantní, nicméně hodnota hazard ratio 3,9 nedosáhla statistické významnosti.

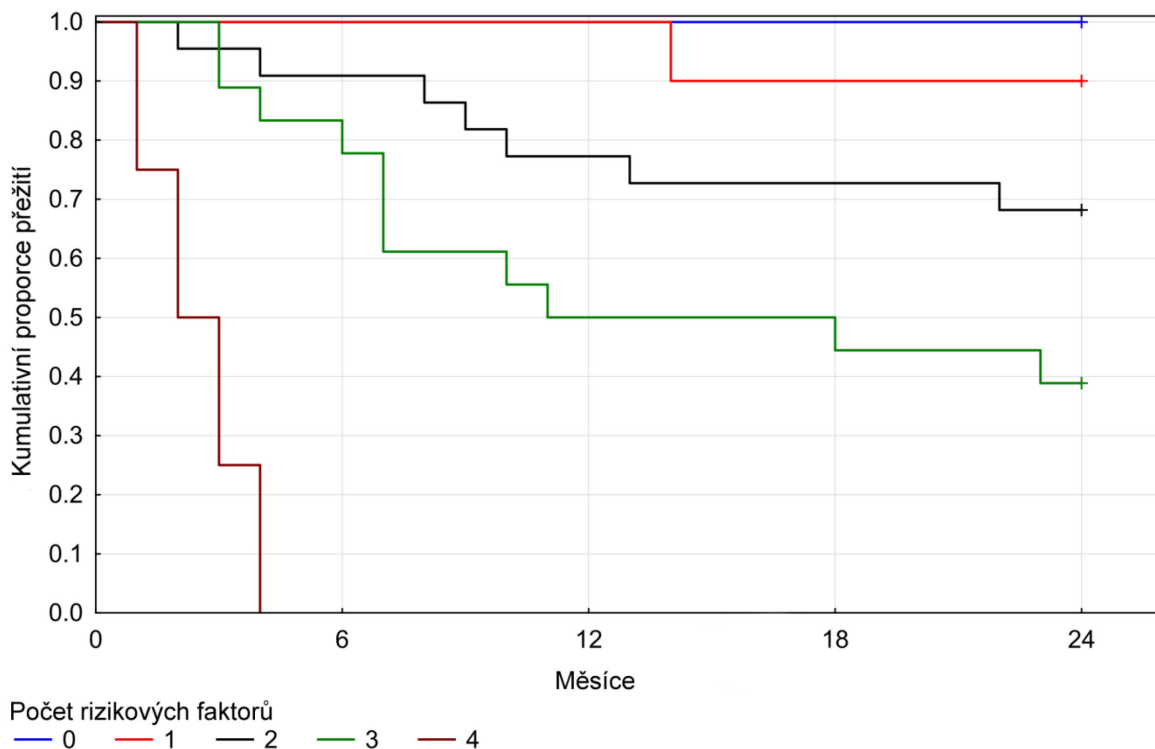
#### 4.2.3.2 Multivariační analýza

Celkem pět parametrů se v multivariační analýze ukázalo být nezávislými prognostickými markery (Tab. 7). Nejvýznamnější z nich, poměr IL-2:IL-6<sub>CSF</sub>, zvyšoval při hodnotách pod 0,48 riziko druhého relapsu v prvních dvou letech až sedminásobně ( $p=0,0028$ ). Všechny další statisticky významné parametry dosahovaly hazard ratio minimálně 3,0: koncentrace IL-2 v likvoru vyšší než nebo rovna 1,23 pg/ml ( $p=0,0260$ ), koncentrace CHI3L2 v likvoru vyšší než nebo rovna 7900 pg/ml ( $p=0,0330$ ), věk při první manifestaci onemocnění nižší než 22 ( $p=0,0312$ ) a EDSS v době zahájení terapie DMD vyšší než nebo rovno 1,5 ( $p=0,0481$ ). „Likelihood ratio“ uvedeného modelu bylo 23,0677 ( $p=0,0004$ ). Závislost mezi počtem pozitivních biomarkerů a rizikem druhého relapsu je znázorněna na Obr. 6.

**Tab. 7** Doba do druhého relapsu včetně likvorových hodnot

Zkratky v závorkách se vztahují k datům uvedeným v sloupcích označených „Riziková skupina“. K-M = Kaplan-Meier; Ž = ženy; - = nehodnoceno; n.s. = statisticky nevýznamné; r = roky; m = měsíce; x = eliminováno z multivariační analýzy; RS = roztroušená skleróza; CIS = klinicky izolovaný syndrom; N/A = data nedostupná; DMD = disease modifying drugs; s.c. = subkutánní; EDSS = Expanded Disability Status Scale; IgG calc = intrathekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu; kval = kvalitativně; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG; IgM calc = intrathekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu; OCMB = oligoklonální pásy ve třídě IgM; IL-2 = interleukin 2; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; CHI3L2 = chitinase 3-like 2 protein; pNfH = fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament

	Univariační					Multivariační		
	K-M	Cut-off			Cut-off			
		Riziková skupina	K-M p-hodnota	Coxova regrese		Riziková skupina	Coxova regrese	
p-hodnota			Hazard Ratio	p-hodnota		Hazard Ratio	p-hodnota	
Pohlaví	0,0466	Ž	-	3,2	0,0621	-	-	n.s.
Věk v době prvního relapsu (r)	0,4768	<22	0,2194	2,1	0,2349	<22	4,3	0,0312
Doba do diagnózy (m)	0,2991	≥2	0,4209	1,4	0,4279	x	x	x
Doba do zahájení terapie (m)	0,7898	<4	0,3355	1,5	0,3437	x	x	x
RS/CIS v době diagnózy	0,1155	N/A	-	N/A	N/A	x	x	x
DMD první volby	0,5086	interferon beta-1a s.c.	0,2184	2,1	0,2337	-	-	n.s.
EDSS v době zahájení terapie	<0,0001	≥1,5	0,0326	2,8	0,0426	≥1,5	3,0	0,0481
IgG calc (kval)	0,0970	pozitivní	-	2,1	0,1086	-	-	n.s.
OCGB (kval)	0,6746	pozitivní	-	1,5	0,6801	x	x	x
IgM calc (kval)	0,1850	pozitivní	-	1,7	0,1947	-	-	n.s.
OCMB (kval)	0,5138	negativní	-	1,3	0,5196	x	x	x
Index <sub>IL-2</sub>	0,0367	≥0,26	0,0277	2,5	0,0347	-	-	n.s.
Index <sub>IL-6</sub>	0,0849	≥0,25	0,0517	2,7	0,0646	-	-	n.s.
Index <sub>IL-10</sub>	0,1334	≥0,20	0,1026	1,9	0,1127	-	-	n.s.
Index <sub>CHI3L2</sub>	0,7056	≥1,79	0,1326	1,8	0,1424	-	-	n.s.
pNfH v likvoru (pg/ml)	0,9237	≥95,0	0,3385	2,5	0,3609	x	x	x
pNfH v séru (pg/ml)	0,0445	<23,3	0,0560	2,7	0,0695	-	-	n.s.
IL2:IL6 v likvoru	0,2021	<0,48	0,0082	3,8	0,0151	<0,48	7,0	0,0028
IL-2 v likvoru (pg/ml)	0,2029	≥1,23	0,0463	3,9	0,0670	≥1,23	6,1	0,0260
IL-6 v likvoru (pg/ml)	0,2691	≥2,89	0,0082	3,8	0,0151	-	-	n.s.
IL-10 v likvoru (pg/ml)	0,0897	≥0,76	0,0294	2,4	0,0367	-	-	n.s.
CHI3L2 v likvoru (pg/ml)	0,3514	≥7900	0,0627	2,3	0,0735	≥7900	3,1	0,0330



**Obr. 6** Doba do druhého relapsu – vztah k počtu pozitivních biomarkerů. Graf znázorňuje pět Kaplan-Meierových křivek reprezentujících počet pozitivních biomarkerů (0–4) definovaných na základě multivariační analýzy (tj. věk v době prvního příznaku, EDSS v době zahájení terapie, IL2:IL6<sub>CSF</sub>, IL-2 v likvoru, CHI3L2 v likvoru). Doba do druhého relapsu se zkracuje s každým dalším pozitivním biomarkerem. V naší kohortě jsme nezaznamenali žádného pacienta s pozitivitou všech pěti biomarkerů.

### 4.3 Expanded Disability Status Scale

#### 4.3.1 Změna v Expanded Disability Status Scale

V této analýze jsme se zaměřili na změnu v EDSS mezi začátkem (T=0) a koncem (T=24) sledovacího období (Tab. 8). Při srovnání iniciálních hodnot EDSS nebyly objeveny žádné rozdíly pro ani jeden ze studovaných biomarkerů. Při srovnání změny v EDSS mezi T=0 a T=24 byl jenom Index<sub>IL-2</sub> schopen oddělit pacienty s příznivějším průběhem od těch s průběhem méně příznivým. Skupina pacientů s hodnotami Index<sub>IL-2</sub> vyššími než nebo rovnými 0,34 dosáhla statisticky signifikantního snížení v EDSS ( $p=0,0239$ ).

**Tab. 8** Změna v EDSS

Zkratky v závorkách se vztahují k datům uvedeným v sloupcích označených „Riziková skupina“. EDSS = Expanded Disability Status Scale; T = čas; Ž = ženy; - = nehodnoceno; ↓ = snížení; r = roky; m = měsíce; RS = roztroušená skleróza; CIS = klinicky izolovaný syndrom; DMD = disease modifying drugs; s.c. = subkutánní; IgG calc = intratekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu; kval = kvalitativně; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG; IgM calc = intratekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu; OCMB = oligoklonální pásy ve třídě IgM; IL-2 = interleukin 2; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; CHI3L2 = chitinase 3-like 2 protein; pNfH = fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament

	Cut-off	EDSS při T=0		Změna v EDSS T=0 vs T=24						
		p-hodnota	Riziková skupina (vyšší EDSS)	Skupina < cut-off		Skupina ≥ cut-off		Mezi skupinami		
				p-hodnota	zvýšení / snížení	p-hodnota	zvýšení / snížení	p-hodnota	zvýšení / snížení	Riziková skupina
Pohlaví	Ž	0,4736	-	0,1094	-	0,0235	↓	0,6046	-	-
Věk v době prvního relapsu (r)	22	0,4533	-	0,5000	-	0,0001	↓	0,0544	-	-
Doba do diagnózy (m)	2	0,4625	-	0,0023	↓	0,6875	-	0,2165	-	-
Doba do zahájení terapie (m)	4	0,1346	-	0,0037	↓	0,3398	-	0,5272	-	-
RS/CIS v době diagnózy	RS	0,2542	-	1,0000	-	0,0006	↓	0,3985	-	-
DMD první volby	interferon beta-1a s.c.	0,0097	interferon beta-1a s.c.	0,0206	↓	0,1250	-	0,0341	↓	interferon beta-1a s.c.
IgG calc (kval)	pozitivní	0,3263	-	0,0195	↓	0,0685	-	0,4257	-	-
OCGB (kval)	pozitivní	0,2527	-	1,0000	-	0,0043	↓	0,9554	-	-
IgM calc (kval)	pozitivní	0,3958	-	0,0019	↓	0,3633	-	0,2908	-	-
OCMB (kval)	pozitivní	0,8489	-	0,0333	↓	0,0483	↓	0,7967	-	-
Index <sub>IL-2</sub>	0,34	0,6449	-	0,0491	↓	0,0313	↓	0,0239	↓	≥0,34
Index <sub>IL-6</sub>	0,25	0,2961	-	0,1250	-	0,0153	↓	0,7685	-	-
Index <sub>IL-10</sub>	0,14	0,4921	-	0,2500	-	0,0130	↓	0,6506	-	-
Index <sub>CHI3L2</sub>	1,79	0,2848	-	0,0820	-	0,0306	↓	0,2502	-	-
pNfH v likvoru (pg/ml)	95,0	0,9774	-	0,7500	-	0,0022	↓	0,8484	-	-
pNfH v séru (pg/ml)	25,5	0,8458	-	0,0327	↓	0,0625	-	0,3659	-	-

#### 4.3.2 Šestiměsíční potvrzené zhoršení v Expanded Disability Status Scale

Dále jsme analyzovali schopnost studovaných biomarkerů rozdělit pacienty do skupin s vyšším a nižším rizikem vzhledem k šestiměsíčnímu potvrzenému zhoršení v EDSS (Tab. 9). V této analýze představoval věk nižší než 22 let při prvním relapsu onemocnění ( $p=0,0111$ ) 12,1 násobné riziko. Nebyly nalezeny žádné další statisticky významné rozdíly, až do provedení analýzy nejsilnějšího cut-off. Skupina pacientů se sérovou koncentrací pNfH vyšší než nebo rovnou 51,9 pg/ml ( $p=0,0068$ ) byla v 9,2násobně větším riziku ( $p=0,0268$ ). Skupina pacientů s hodnotou EDSS nižší než 1,5 v době zahájení terapie DMD ( $p=0,0496$ ) byla shledána riziková ( $p=0,0042$ ), nebylo však možné dopočítat hazard ratio.

**Tab. 9** Šestiměsíční potvrzené zhoršení v EDSS

Zkratky v závorkách se vztahují k datům uvedeným ve sloupci označeném „Riziková skupina“. K-M = Kaplan-Meier; Ž = ženy; - = nehodnoceno; r = roky; m = měsíce; RS = roztroušená skleróza; CIS = klinicky izolovaný syndrom; DMD = disease modifying drugs; s.c. = subkutánní; N/A = data nedostupná; EDSS = Expanded Disability Status Scale; IgG calc = intratekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu; kval = kvalitativně; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG; IgM calc = intratekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu; OCMB = oligoklonální pásy ve třídě IgM; IL-2 = interleukin 2; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; CHI3L2 = chitinase 3-like 2 protein; pNfH = fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament

	K-M	Cut-off			
		Riziková skupina	K-M	Coxova regrese	
	p-hodnota		p-hodnota	Hazard Ratio	p-hodnota
Pohlaví	0,9800	Ž	-	1,0	0,9802
Věk v době prvního relapsu (r)	0,0111	<22	0,0011	12,6	0,0117
Doba do diagnózy (m)	0,4516	<2	0,9800	1,0	0,9802
Doba do zahájení terapie (m)	0,7477	≥4	0,7675	1,3	0,7693
RS/CIS v době diagnózy	0,1362	RS	-	4,7	0,1789
DMD první volby	0,6733	interferon beta-1a s.c.	0,5323	N/A	N/A
EDSS v době zahájení terapie	0,2996	<1,5	0,0042	N/A	N/A
IgG calc (kval)	0,5342	negativní	-	1,8	0,5422
OCGB (kval)	0,6350	N/A	-	N/A	N/A
IgM calc (kval)	0,3913	pozitivní	-	2,3	0,4069
OCMB (kval)	0,5478	pozitivní	-	1,8	0,5553
Index <sub>IL-2</sub>	0,9903	≥0,26	0,7918	1,3	0,7933
Index <sub>IL-6</sub>	0,5980	<0,25	0,4044	2,2	0,4192
Index <sub>IL-10</sub>	0,5790	<0,15	0,2079	N/A	N/A
Index <sub>CHI3L2</sub>	0,1115	<1,79	0,5033	2,1	0,5151
pNfH v likvoru (pg/ml)	0,0944	<95,0	0,2033	3,9	0,2403
pNfH v séru (pg/ml)	0,6283	≥51,9	0,0068	9,2	0,0268

#### 4.4 Magnetická rezonance

Analýza MR byla provedena z dat získaných po prvním (T=12) a po druhém (T=24) roce sledovacího období. Vstupní MR nebyla zahrnuta do analýzy, protože byla u většiny pacientů provedena na extramurálních pracovištích a parametry těchto vyšetření tudíž nekorespondovaly s protokolem studie. Z podobných (technických) důvodů bylo 14 pacientů (z celkem 58) vyřazeno z jakékoliv analýzy MR dat.

#### 4.4.1 Nové T2 léze, nárůst lesion load

V této analýze jsme sledovali schopnost rozlišit pomocí studovaných biomarkerů pacienty, kteří budou/nebudou mít na kontrolní MR mozku nové T2 léze a/nebo nárůst lesion load (Tab. 10). Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly, až do provedení analýzy nejsilnějšího cut-off. Skupina pacientů s koncentrací pNfH v likvoru nižší než 95,0 pg/ml ( $p=0,0423$ ) byla shledána riziková, nicméně odds ratio 6,5 nedosáhlo statistické významnosti.

**Tab. 10** Nové T2 léze, nárůst lesion load

Zkratky v závorkách se vztahují k datům uvedeným ve sloupci označeném „Riziková skupina“. PT = párový test; ET = exaktní test; Ž = ženy; - = nehodnoceno; r = roky; m = měsíce; RS = roztroušená skleróza; CIS = klinicky izolovaný syndrom; DMD = disease modifying drugs; s.c. = subkutánní; EDSS = Expanded Disability Status Scale; IgG calc = intrathekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu; kval = kvalitativně; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG; N/A = data nedostupná; IgM calc = intrathekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu; OCMB = oligoklonální pásy ve třídě IgM; IL-2 = interleukin 2; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; CHI3L2 = chitinase 3-like 2 protein; pNfH = fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament

	Wilcoxonův PT/ Fisherův ET/ Mediánový test/ Chí-kvadrát test	Cut-off			
		Riziková skupina	Fisherův ET	Odds Ratio	
			p-hodnota	Hodnota	Konfidenční Interval
Pohlaví	1,0000	Ž	-	1,0	0,2-4,1
Věk v době prvního relapsu (r)	0,0619	<22	0,3364	3,0	0,4-20,2
Doba do diagnózy (m)	0,7463	<2	0,2775	3,3	0,6-17,8
Doba do zahájení terapie (m)	0,7094	<4	0,3440	2,2	0,6-8,0
RS/CIS v době diagnózy	1,0000	RS	-	1,2	0,1-13,8
DMD první volby	0,5932	interferon beta-1a s.c.	1,0000	1,8	0,2-18,9
EDSS v době zahájení terapie	0,3487	$\geq 1,5$	0,2002	2,5	0,7-9,0
IgG calc (kval)	1,0000	pozitivní	-	1,2	0,3-4,5
OCGB (kval)	1,0000	N/A	-	N/A	N/A
IgM calc (kval)	0,3401	pozitivní	-	1,9	0,5-7,0
OCMB (kval)	0,5248	pozitivní	-	1,8	0,5-6,3
Index <sub>IL-2</sub>	0,6092	<0,26	1,0000	1,2	0,3-4,1
Index <sub>IL-6</sub>	0,5531	$\geq 0,25$	0,7190	1,7	0,4-7,8
Index <sub>IL-10</sub>	0,4046	<0,13	0,2241	5,0	0,6-45,0
Index <sub>CHI3L2</sub>	0,9516	<1,79	0,7614	1,3	0,4-4,4
pNfH v likvoru (pg/ml)	0,6366	<95,0	0,0423	6,5	0,6-68,2
pNfH v séru (pg/ml)	0,3643	$\geq 12,3$	0,3415	2,1	0,5-8,1

#### 4.4.2 Mozková atrofie

Dále jsme analyzovali schopnost studovaných biomarkerů rozlišit pacienty s ročním nárůstem mozkové atrofie alespoň o 0,4 % od těch s menší mírou atrofizace (Tab. 11). V této analýze představovalo EDSS nižší než 2 v době zahájení terapie DMD ( $p=0,0209$ ) 5,7násobně větší riziko ( $p=0,0246$ ). Nebyly nalezeny žádné další statisticky významné rozdíly, až do provedení analýzy nejsilnějšího cut-off. Hodnoty  $Index_{IL-10}$  nižší než 0,13 ( $p=0,0368$ ) a koncentrace pNfH v séru vyšší než nebo rovné 10,8 pg/ml ( $p=0,0428$ ) byly rizikové. Odds ratio pro ani jeden z těchto parametrů však nedosáhlo statistické významnosti.

**Tab. 11** Mozková atrofie

Zkratky v závorkách se vztahují k datům uvedeným ve sloupci označeném „Riziková skupina“. Hodnoty v řádku „ $Index_{IL-10}$ “ jsou založeny na statistické simulaci (nula subjektů v kontrolním souboru). PT = párový test; ET = exaktní test; M = muži; - = nehodnoceno; r = roky; m = měsíce; RS = roztroušená skleróza; CIS = klinicky izolovaný syndrom; N/A = data nedostupná; DMD = disease modifying drugs; s.c. = subkutánní; EDSS = Expanded Disability Status Scale; IgG calc = intratekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu; kval = kvalitativně; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG; IgM calc = intratekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu; OCMB = oligoklonální pásy ve třídě IgM; IL-2 = interleukin 2; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; CHI3L2 = chitinase 3-like 2 protein; pNfH = fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament

	Wilcoxonův PT/ Fisherův ET/ Mediánový test/ Chí-kvadrát test	Riziková skupina	Cut-off		
			Fisherův ET	Odds Ratio	
				p-hodnota	Hodnota
	p-hodnota				
Pohlaví	0,7222	M	-	1,5	0,3-6,9
Věk v době prvního relapsu (r)	0,4686	<22	0,6467	2,2	0,2-22,1
Doba do diagnózy (m)	0,6615	<2	0,4676	1,9	0,5-7,8
Doba do zahájení terapie (m)	0,2444	≥4	0,5219	1,9	0,5-6,8
RS/CIS v době diagnózy	0,5402	CIS	-	N/A	N/A
DMD první volby	0,2189	jiné než interferon beta- 1a s.c.	0,5962	2,1	0,3-16,4
EDSS v době zahájení terapie	0,0209	<2	0,0246	5,7	1,3-24,5
IgG calc (kval)	1,0000	negativní	-	1,1	0,3-3,9
OCGB (kval)	1,0000	pozitivní	-	N/A	N/A
IgM calc (kval)	1,0000	pozitivní	-	1,1	0,3-3,9
OCMB (kval)	1,0000	pozitivní	-	1,1	0,3-3,8
$Index_{IL-2}$	0,0817	<0,26	0,0642	3,6	1,0-13,5
$Index_{IL-6}$	0,7491	≥0,25	1,0000	1,1	0,3-4,8
$Index_{IL-10}$	0,1149	<0,13	0,0368	5,7	0,6-50,7
$Index_{CHI3L2}$	0,4617	≥1,79	1,0000	1,1	0,3-3,8
pNfH v likvoru (pg/ml)	0,6491	<95,0	1,0000	1,0	0,1-12,5
pNfH v séru (pg/ml)	0,3843	≥10,8	0,0428	9,8	1,0-98,0

#### 4.5 No evidence of disease activity 4

Vzhledem k omezenému objemu dat z MR byl koncept NEDA 4 analyzován u 44 pacientů a jenom pro druhý rok sledovacího období. Žádný ze studovaných biomarkerů nebyl schopen rozlišit pacienty, kteří dosáhnou NEDA 4, od těch ve vyšším riziku (Tab. 12).

**Tab. 12** NEDA 4

Zkratky v závorkách se vztahují k datům uvedeným ve sloupci označeném „Riziková skupina“. PT = párový test; ET = exaktní test; M = muži; - = nehodnoceno; r = roky; N/A = data nedostupná; m = měsíce; RS = roztroušená skleróza; CIS = klinicky izolovaný syndrom; DMD = disease modifying drugs; s.c. = subkutánní; EDSS = Expanded Disability Status Scale; IgG calc = intratekální syntéza ve třídě IgG dle odečtu z Reiberova diagramu; kval = kvalitativně; OCGB = oligoklonální pásy ve třídě IgG; IgM calc = intratekální syntéza ve třídě IgM dle odečtu z Reiberova diagramu; OCMB = oligoklonální pásy ve třídě IgM; IL-2 = interleukin 2; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; CHI3L2 = chitinase 3-like 2 protein; pNfH = fosforylovaná forma těžkých řetězců neurofilament

	Wilcoxonův PT/ Fisherův ET/ Mediánový test/ Chí-kvadrát test	Cut-off			
		Riziková skupina	Fisherův ET	Odds Ratio	
			p-hodnota	Hodnota	Konfidenční Interval
Pohlaví	1,0000	M	-	1,1	0,2-6,5
Věk v době prvního relapsu (r)	0,4398	≥22	0,5710	N/A	N/A
Doba do diagnózy (m)	0,9457	≥2	0,1756	3,9	0,8-19,0
Doba do zahájení terapie (m)	0,4819	≥4	1,0000	1,3	0,3-5,9
RS/CIS v době diagnózy	1,0000	RS	-	N/A	N/A
DMD první volby	0,8826	jiné než interferon beta- 1a s.c.	1,0000	1,3	0,1-12,9
EDSS v době zahájení terapie	0,3221	≥1,5	0,6918	1,9	0,3-10,5
IgG calc (kval)	1,0000	negativní	-	1,2	0,3-5,8
OCGB (kval)	1,0000	negativní	-	N/A	N/A
IgM calc (kval)	0,2455	pozitivní	-	2,5	0,5-12,0
OCMB (kval)	1,0000	negativní	-	1,0	0,2- 5,0
Index <sub>IL-2</sub>	0,1667	≥0,26	0,4513	2,1	0,4-9,9
Index <sub>IL-6</sub>	0,9888	<0,25	0,4027	2,0	0,4-10,0
Index <sub>IL-10</sub>	0,2693	≥0,37	0,1957	4,0	0,6-29,2
Index <sub>CHI3L2</sub>	0,2940	<1,79	1,0000	1,3	0,3-6,2
pNfH v likvoru (pg/ml)	0,6730	≥95,0	1,0000	N/A	N/A
pNfH v séru (pg/ml)	0,5748	<10,8	0,2030	3,9	0,5-28,4



## 5 DISKUZE

Ruku v ruce se zvětšujícím se portfoliem léčiv charakteru DMD schválených pro léčbu RS vyvstává i požadavek na personalizaci léčby na základě předpokládaného průběhu onemocnění. Tato práce měla za cíl stanovit prognostický význam biomarkerů získaných ze séra a likvoru v časně fázi onemocnění: intrathekální syntéza IgM, IL-2, IL-6, IL-10, CHI3L2 a pNfH. Ke zhodnocení byly použity zavedené klinické (doba do druhého relapsu, ARR, změna v EDSS, šestiměsíční potvrzené zhoršení v EDSS), zobrazovací (nové T2 léze a nárůst lesion load, progresse mozkové atrofie) a komplexní (NEDA 4) ukazatele. I přesto, že některé ze studovaných biomarkerů prokázaly statisticky významnou prognostickou hodnotu v některých z testovaných ukazatelů (jak bude diskutováno níže), žádný z nich neprokázal významnou prognostickou hodnotu ve všech sledovaných ukazatelích.

### 5.1 Asociace s roztroušenou sklerózou

V naší kohortě jsme zaznamenali statisticky významné rozdíly mezi souborem pacientů a kontrolním souborem v pozitivitě IgM calc, OCGB a OCMB a v hodnotách Index<sub>IL-2</sub> a Index<sub>IL-10</sub>. 95% pozitivita OCGB v souboru pacientů proti 0% v kontrolním souboru a 36% pozitivita OCMB v souboru pacientů proti 3% v kontrolním souboru, jsou v souladu s literárními údaji (Dobson R. et al., 2013; Frau J. et al., 2018; Haghghi S. et al., 2000; Thangarajh M. et al., 2008). Index<sub>IL-10</sub> byl asociován s vyšším rizikem RS, což je v souladu s nepřímými daty naznačujícími jeho nižší hodnoty u pacientů s RS (Fillatreau S. et al., 2002; Matsushita T. et al., 2008; Romme Christensen J. et al., 2012; Xiang W. et al., 2021). Překvapivě byl Index<sub>IL-2</sub> také asociován s RS, což by mohlo být vysvětleno teorií o nerovnováze T buněčné imunity, viz níže. U ostatních studovaných biomarkerů nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi souborem pacientů a kontrolním souborem, což může být zapříčiněno částečně použitím indexovaných hodnot v naší studii a/nebo, v případě pNfH, přítomností věkově odpovídajícího kontrolního souboru.

### 5.2 Interleukin 2, interleukin 6, interleukin 10

Pokud je autorovi této práce známo, nebyly zatím provedeny žádné studie zkoumající IL-2 v likvoru v časně fázi RS jako potenciální prediktor dalšího průběhu onemocnění. V našich podmínkách byl Index<sub>IL-2</sub> ( $\geq 0,26$ ) schopen predikovat kratší dobu do druhého relapsu, vyšší ARR během prvního roku sledovacího období, a také vyšší kombinovaný ARR během

celého sledovacího období. Nicméně, vyšší hodnoty  $\text{Index}_{\text{IL-2}} (\geq 0,34)$  byly shledány protektivní vzhledem k horšení v EDSS. Tyto zdánlivě protichůdné výsledky by mohly být vysvětleny všeobecně uznávanou teorií nerovnováhy mezi regulační a efektorovou T buněčnou adaptivní imunitou (Höfer T. et al., 2012; Liao W. et al., 2013). Předpokládáme, že vysoké hodnoty  $\text{Index}_{\text{IL-2}}$  indikují fyziologicky vyšší koncentrace IL-2 v CNS zajišťující správné fungování regulačních mechanismů (přežití T regulačních buněk). Střední hodnoty ( $\geq 0,26$  a  $< 0,34$ ), které v našem souboru svědčily pro méně příznivý průběh onemocnění, mohou odrážet funkci IL-2 jako aktivátoru dráhy Th1 lymfocytů, který zároveň potlačuje diferenciaci lymfocytů Th17. Nejnižší hodnoty ( $< 0,26$ ), které vykazovali pacienti s příznivějším průběhem onemocnění, jsou zřejmě výsledkem aktivace jiných buněčných subpopulací (tj. Th17, Th2) nebo slabší aktivace Th1 lymfocytů. Tato teorie je také v souladu s výsledky získanými z analýzy  $\text{Index}_{\text{IL-6}}$ , kde, podobně jako u  $\text{Index}_{\text{IL-2}}$ , vyšší hodnoty predikovaly vyšší ARR během prvního roku sledovacího období, a také vyšší kombinovaný ARR během celého sledovacího období. Zatímco dráha Th17 lymfocytů může být částečně inhibována nadbytkem IL-2, dalším krokem v aktivační kaskádě je koaktivace prostřednictvím IL-6 a TGF beta (Liao W. et al., 2013). V nedávné studii bylo zjištěno, že pro udržení Th17 lymfocytů je nutná nepřetržitá signalizace prostřednictvím IL-6 (Harbour S.N. et al., 2020). Prostřednictvím hyperaktivace dráhy Th17 lymfocytů mohou proto vyšší hodnoty  $\text{Index}_{\text{IL-6}}$  implikovat horší průběh onemocnění. Výsledky této práce jsou částečně v souladu se studií, kde vyšší koncentrace IL-6 v likvoru v době diagnózy RS (s průměrným trváním nemoci šest měsíců) korelovaly s vyšším počtem relapsů, větší aktivitou na MR a vyšším EDSS po dvou a třech letech tříletého sledování (Stampanoni Bassi M. et al., 2018).

V naší studii nicméně multivariační analýza doby do druhého relapsu nepotvrdila statistickou významnost  $\text{Index}_{\text{IL-2}}$  ani  $\text{Index}_{\text{IL-6}}$  a byly objeveny jiné nezávislé prognostické markery: věk nižší než 22 při první manifestaci onemocnění, EDSS v době zahájení terapie DMD vyšší než nebo rovno 1,5 a pozitivní IgM calc. V ad hoc multivariační analýze doby do druhého relapsu, kde byly zahrnuty také samostatné likvorové hodnoty, jsme potvrdili věk při první manifestaci onemocnění a EDSS v době zahájení terapie DMD jako nezávislé klinické prognostické markery. Prognostický význam věku při první manifestaci onemocnění podporuje také analýza šestiměsíčního potvrzeného zhoršení v EDSS, ve které byl věk pod 22 let také rizikovým faktorem. Co se týče EDSS v době zahájení terapie DMD, vyšší hodnoty také predikovaly vyšší ARR, i když stejné hodnoty byly protektivní

proti výraznější atrofizaci mozku a proti potvrzení šestiměsíčního zhoršení v EDSS (k potvrzení výsledku posledně uvedené analýzy nebyl dostatek dat). Tyto výsledky si vysvětlujeme možnou chybou při hodnocení dlouhodobých ukazatelů se zároveň poměrně krátkým sledovacím obdobím v naší studii. Naše výsledky svědčící pro význam těchto klinických parametrů pro stanovení prognózy jsou částečně srovnatelné s výsledky recentní studie, která replikovala původní výzkumy z let 1988 a 2003. V této studii byly v rámci multivariační analýzy prokázány jako nezávislé prognostické markery kromě vyššího iniciálního EDSS a vyššího věku v době prvního relapsu také delší doba od prvního relapsu do diagnózy RS a sfinkterové příznaky v rámci manifestace prvního relapsu (Bergamaschi R. et al., 2022). Rozdílu ve věku, který predikuje horší průběh onemocnění, si vysvětlujeme odlišným dizajnem studií. V naší studii byla zkoumána jenom věková hranice 22 let, protože tato hodnota vyšla jako statisticky nejsilnější cut-off, i když ani ta pak v univariační analýze nedosáhla statistické významnosti. Univariční analýza doby do druhého relapsu pro parametr věk s cut-off 40 nebyla provedena a nevstoupila tak ani do multivariační analýzy.

Dalšími nezávislými prognostickými markery v naší studii byly: poměr IL-2:IL-6<sub>CSF</sub>, koncentrace IL-2 v likvoru a koncentrace CHI3L2 v likvoru. Tento výsledek podporuje výše uvedenou teorii o nerovnováze mezi jednotlivými imunitními složkami s tím, že vyšší koncentrace IL-6 v likvoru by mohla predikovat horší prognózu onemocnění i navzdory nízké likvorové koncentraci IL-2. Index<sub>IL-10</sub> se nezdá být vhodný jako prognostický marker RS, i když i IL-10 v likvoru ve vyšších koncentracích zvyšoval v univariační analýze riziko druhého relapsu.

### **5.3 Těžké řetězce neurofilament**

Byly nalezeny statisticky významné rozdíly pro pNfH v likvoru při analýze nových T2 lézí/nárůstu lesion load, a také pro pNfH v séru při analýzách doby do druhého relapsu, mozkové atrofie a šestiměsíčního potvrzeného zhoršení v EDSS; tyto výsledky se však nepotvrdily v dalších statistických testech. Navíc byla nalezena asociace mezi pNfH v séru a kombinovaným ARR během celého sledovacího období. Tento výsledek je vzhledem k našim hypotézám překvapivý, a protože nejsme schopni ho validně vysvětlit ani na základě dostupné literatury, je nutno zvažovat i možnost falešně statisticky významného výsledku. I když jsme nepotvrdili horší prognózu pacientů s vyššími koncentracemi pNfH v likvoru, jenž udávají dlouhodobé studie hodnotící zhoršování v EDSS a progresi

mozkové atrofie, naše práce je pravděpodobně první, která na podobném souboru hodnotila dobu do druhého relapsu a ARR vzhledem k pNfH (Petzold A., 2015; Petzold A. et al., 2016).

#### **5.4 Chitinase 3-like 2**

Index<sub>CHI3L2</sub> nedosáhl statistické významnosti v žádném ze sledovaných ukazatelů. V ad hoc multivariační analýze doby do druhého relapsu byl prokázán CHI3L2 v likvoru jako nezávislý prognostický marker. Tento výsledek je v souladu s předchozí studií, která zkoumala schopnost CHI3L2 predikovat přechod z CIS do CD-MS (Møllgaard M. et al., 2016).

#### **5.5 Intrathekální syntéza imunoglobulinů M**

Několik předchozích studií shledalo OCMB jako prognostický marker RS, v jiných studiích ale prognostický význam potvrzen nebyl (Frau J. et al., 2018; Mandrioli J. et al., 2008; Perini P. et al., 2006; Schneider R. et al., 2007; Villar L.M. et al., 2002a; Villar L.M. et al., 2003; Villar L.M. et al., 2002b). V naší studii nebyl prokázán prognostický význam OCMB stran relapsů, EDSS, MR ani NEDA 4. Tento výsledek může být zapříčiněn krátkým sledovacím obdobím v naší studii ve srovnání s dlouhodobými ukazateli sledovanými v jiných studiích, jako je doba do dosažení určitého EDSS a doba do přechodu do SP-RS (Mandrioli J. et al., 2008; Villar L.M. et al., 2003). Další možností je volba jiných sledovaných ukazatelů, jako je např. pravděpodobnost přechodu z CIS do CD-MS, který se dnes již vzhledem ke změně nomenklatury a diagnostických kritérií nepoužívá (Villar L.M. et al., 2002a). Význam OCMB z dlouhodobého hlediska je podpořen klonální stabilitou protilátkové imunitní odpovědi u RS během dlouhého období. Jinými slovy, pokud jsou jednou OCMB detekovány (stejně jako OCGB a oligoklonální pásy ve třídě IgA), přetrvávají již trvale (Villar L.M. et al., 2003; Walsh M.J., Tourtellotte W.W., 1986). V jedné studii byl nalezen vyšší ARR v OCMB pozitivní skupině, nicméně tato studie byla provedena jenom na malé vzorce 22 pacientů (Villar L.M. et al., 2002a).

#### **5.6 Limitace práce**

Limitace práce shledáváme v relativně malém vzorku pacientů, krátkém sledovacím období a nekompletních datech z MR. Další limitací by mohla být multivariační analýza, resp. její provedení jenom pro ukazatel doba do druhého relapsu. Toto řešení jsme zvolili z důvodu převážně negativních výsledků z univariačních analýz pro ostatní ukazatele. Fakt,

že malá skupina pacientů byla během sledovacího období eskalována na tzv. vysoce účinnou terapii, mohl ovlivnit výsledky ve smyslu podcenění jejich prognostického významu. Co se týče chitinázám podobných proteinů, do studie nebylo zahrnuto vyšetření CHI3L1, což by bývalo mohlo být přínosné stran případného přímého srovnání jejich prognostické hodnoty. Podobně stanovení NfL, jenž je výrazně prozkoumanějším biomarkerem než pNfH, nebylo do studie zahrnuto. Komparativní studie CHI3L1 a CHI3L2, stejně jako NfL a pNfH, by mohly být dobrým námětem pro další studie.

Na druhou stranu, v naší studii jsme analyzovali relativně homogenní soubor pacientů výhradně s podtypem RR-RS v časně fázi, všichni pacienti byli na terapii DMD první linie (na rozdíl od předchozích studií, které zahrnovaly neléčené pacienty), diagnóza byla stanovena na základě nejnovějších diagnostických kritérií dle McDonalda z roku 2017 a sledování bylo komplexní pomocí klinických i MR ukazatelů. Navíc jsme užili indexované hodnoty studovaných biomarkerů, jenž považujeme za nejlepší ukazatel původu biomarkerů v CNS. Ad hoc jsme potvrdili získané výsledky analýzou samostatných likvorových hodnot.

## 6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověřit prognostickou hodnotu likvorových a sérových biomarkerů u pacientů časně po prvním příznaku onemocnění RS. Ve výsledku jsme nepotvrdili hypotézy, že pozitivita OCMB, vyšší pNfH v séru či vyšší pNfH v likvoru koreluje s horší prognózou onemocnění. Tento výsledek však může být zapříčiněn sledováním krátkodobých parametrů hodnocení. Pozitivita IgM calc byla potvrzena jako nezávislý prognostický marker pro dobu do druhého relapsu spolu s klinickými parametry nižšího věku a vyššího vstupního EDSS, v ad hoc analýze vč. samostatných likvorových hodnot již ale významnost IgM calc potvrzena nebyla. Interleukiny IL-2, IL-6 i IL-10 v univariačních analýzách predikovaly relapsy v následujícím období, v multivariační analýze však tyto výsledky již nebyly statisticky signifikantní. Za nejvýznamnější výsledek považujeme výstup multivariační analýzy, která kromě klinických biomarkerů a indexovaných hodnot studovaných biomarkerů zahrnovala i jejich samostatné likvorové hodnoty. V této analýze bylo nalezeno pět nezávislých biomarkerů predikujících kratší dobu do druhého relapsu: nízká hodnota poměru IL-2:IL-6<sub>CSF</sub>, vysoká koncentrace IL-2 v likvoru, vysoká koncentrace CHI3L2 v likvoru, nižší věk při prvním relapsu onemocnění a vyšší EDSS v době zahájení terapie DMD. Ukázali jsme, jakým způsobem se zkracuje doba do druhého relapsu se stoupajícím množstvím pozitivních biomarkerů. Stanovení těchto biomarkerů v době diagnostické lumbální punkce by mohlo být v klinické praxi užitečné pro stanovení nepříznivé prognózy. Hodnocení prognostického významu studovaných biomarkerů v dlouhodobém horizontu nebylo součástí této práce. Studie na větších souborech pacientů a s delším sledovacím obdobím, stejně jako efektivnější a standardizované detekční metody jako např. technika Simoa, mohou být přínosné k dosažení statisticky významných výsledků i při některých dalších biomarkerech.

## 7 SHRNU TÍ

RS je závažné invalidizující onemocnění, s velkou variabilitou symptomů, průběhu i odpovědi na léčbu. Mezi rizikové faktory nepříznivého průběhu patří dlouhá doba do zahájení terapie DMD, kouření, některé komorbidity, jiná nežli europoidní rasa, atypický věk v době prvního relapsu, neúplné zotavení se z prvního relapsu, první příznaky onemocnění zahrnující projevy pyramidové, mozečkové, sfinkterové, kognitivní či s multifokální symptomatikou, krátká doba do druhého relapsu, vyšší ARR během prvních let od diagnózy, z nálezů na první MR mozku pak vyšší počet T2 lézí, infratentoriální, spinální a/nebo T1 léze enhancující po podání gadolinia, korová a celková atrofie. Z laboratorních biomarkerů (sérum/likvor) se jako nejslibnější jeví stanovení neurofilament, případně chitinázám podobných bílkovin, zatím ale nejsou v rutinní praxi využívány. V této práci jsme se proto zaměřili na potenciální laboratorní biomarkery časné fáze RS. Průběh onemocnění byl prospektivně sledován na vzorce 58 pacientů s RR-RS, u kterých byly vzorky likvoru a séra odebrané v době diagnózy vyšetřeny na přítomnost intrathekální syntézy IgM výpočtem a dle IEF, hladiny IL-2, IL-6, IL-10, CHI3L2 a pNfH. Průběh onemocnění byl po dvou letech sledování vyhodnocen primárně na základě parametru doba do druhé ataky, ale i dalších – ARR, změna v EDSS, šestiměsíční potvrzené zhoršení v EDSS, zvětšení objemu lézí nebo přítomnosti nových lézí na MR mozku, progresse mozkové atrofie a komplexního ukazatele NEDA 4 v roce dva. Kromě analýz relapsů nebyla potvrzena prognostická hodnota studovaných biomarkerů. V multivariační analýze doby do druhého relapsu bylo nalezeno pět nezávislých prognostických biomarkerů: nízká hodnota poměru IL-2:IL-6<sub>CSF</sub> ( $<0,48$ , HR=7,0,  $p=0,0028$ ), vysoká koncentrace IL-2 v likvoru ( $\geq 1,23$  pg/ml, HR=6,1,  $p=0,0260$ ), vysoká koncentrace CHI3L2 v likvoru ( $\geq 7900$  pg/ml, HR=3,1,  $p=0,0330$ ), nižší věk při první manifestaci onemocnění ( $<22$ , HR=4,3,  $p=0,0312$ ) a vyšší EDSS v době zahájení terapie DMD ( $\geq 1,5$ , HR=3,0,  $p=0,0481$ ). Z této práce vyplývá, že vyšetřování uvedených biomarkerů v době diagnostické lumbální punkce by v klinické praxi mohlo být užitečné pro stanovení nepříznivé prognózy.

## 8 SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is a severe, debilitating disease, with a high variability of symptoms, course and response to treatment. The risk factors for unfavorable disease course include: long time to initiation of DMD, smoking, non-caucasian origin, atypical age at clinical onset, incomplete recovery from the first relapse, first manifestation by pyramidal, cerebellar, sphincter, cognitive or multiphocal symptoms, certain comorbidities, short time to the second relapse, high ARR during the first years after diagnosis, at the initial MRI - high number of T2 lesions, infratentorial, spinal and/or gadolinium enhancing T1 lesions, cortical and global atrophy. As for serum and cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers, neurofilaments and chitinase-like proteins seem the most promising, although they are not yet validated. In this work, therefore, we aimed to assess the prognostic value of a few potential serum and CSF biomarkers in the early phases of MS. 58 patients with relapse-remitting MS were prospectively followed for two years. Intrathecal synthesis in IgM class (by calculation and by IEF), IL-2, IL-6, IL-10, CHI3L2 and pNfH values were determined from serum and CSF samples obtained at the time of diagnosis. The course of the disease was evaluated mainly according to the time to the second relapse, but other outcomes were also taken into account: ARR, change in EDSS, six months confirmed EDSS worsening, enlarging or new lesions on MRI, brain atrophy progression and complex parameter NEDA 4 in year two. The prognostic value of the studied biomarkers was not confirmed in any of the outcomes, except for analyses of relapses. In the multivariate analysis of the time to the second relapse, five independent prognostic biomarkers were identified: low IL-2:IL-6<sub>CSF</sub> ratio ( $<0.48$ , HR=7.0,  $p=0.0028$ ), high IL-2 concentration in CSF ( $\geq 1.23$  pg/ml, HR=6.1,  $p=0.0260$ ), high CSF IL-2 ( $\geq 1.23$  pg/ml, HR=6.1,  $p=0.0260$ ), high CSF CHI3L2 ( $\geq 7900$  pg/ml, HR=3.1,  $p=0.0330$ ), low age at clinical onset ( $<22$ , HR=4.3,  $p=0.0312$ ) and high EDSS at therapy initiation ( $\geq 1.5$ , HR=3.0,  $p=0.0481$ ). These results suggest that assessment of the abovementioned biomarkers at the time of diagnostic lumbar puncture might be useful in clinical setting to detect patients with unfavorable prognosis.



## 9 LITERATURA

1. Alvarez E., Piccio L., Mikesell R.J., Klawiter E.C., Parks B.J., Naismith R.T., Cross A.H. CXCL13 is a biomarker of inflammation in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and other neurological conditions. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2013;19(9):1204-8.
2. Amato M.P., Ponziani G., Bartolozzi M.L., Siracusa G. A prospective study on the natural history of multiple sclerosis: clues to the conduct and interpretation of clinical trials. *Journal of the Neurological Sciences*. 1999;168(2):96-106.
3. Andersson M., Alvarez-Cermeño J., Bernardi G., Cogato I., Fredman P., Frederiksen J., Fredrikson S., Gallo P., Grimaldi L.M., Grønning M. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1994;57(8):897-902.
4. Avasarala J.R., Cross A.H., Trotter J.L. Oligoclonal Band Number as a Marker for Prognosis in Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*. 2001;58(12):2044-5.
5. Barton B.E. IL-6: Insights into Novel Biological Activities. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1997;85(1):16-20.
6. Bellizzi A., Anzivino E., Rodio D.M., Palamara A.T., Nencioni L., Pietropaolo V. New insights on human polyomavirus JC and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:839719.
7. Benkert P., Meier S., Schaedelin S., Manouchehrinia A., Yaldizli Ö., Maceski A., Oechtering J., Achtnichts L., Conen D., Derfuss T., Lalive P.H., Mueller C., Müller S., Naegelin Y., Oksenberg J.R., Pot C., Salmen A., Willemse E., Kockum I., Blennow K., Zetterberg H., Gobbi C., Kappos L., Wiendl H., Berger K., Sormani M.P., Granziera C., Piehl F., Leppert D., Kuhle J., Aeschbacher S., Barakovic M., Buser A., Chan A., Disanto G., D'Souza M., Du Pasquier R., Findling O., Galbusera R., Hrusovsky K., Khalil M., Lorscheider J., Mathias A., Orleth A., Radue E.-W., Rahmzadeh R., Sinnecker T., Subramaniam S., Vehoff J., Wellmann S., Wuerfel J., Zecca C. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *The Lancet Neurology*. 2022;21(3):246-57.

8. Bergamaschi R. Prognosis of multiple sclerosis: clinical factors predicting the late evolution for an early treatment decision. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2006;6(3):357-64.
9. Bergamaschi R., Mallucci G., Fusco S., Montomoli C. Disability and mortality in a cohort of MS patients: how the real-world scenario is changed. *Journal of Neurology*. 2022;269(6):3355-8.
10. Bergamaschi R., Montomoli C., Candeloro E., Fratti C., Citterio A., Cosi V. Disability and Mortality in a Cohort of Multiple Sclerosis Patients: A Reappraisal. *Neuroepidemiology*. 2005;25(1):15-8.
11. Berger J.R., Aksamit A.J., Clifford D.B., Davis L., Koranik I.J., Sejvar J.J., Bartt R., Major E.O., Nath A. PML diagnostic criteria: consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section. *Neurology*. 2013;80(15):1430-8.
12. Bertolotto A., Granieri L., Marnetto F., Valentino P., Sala A., Capobianco M., Malucchi S., Di Sapio A., Malentacchi M., Matta M., Caldano M. Biological monitoring of IFN- $\beta$  therapy in Multiple Sclerosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2015;26(2):241-8.
13. Bloomgren G., Richman S., Hotermans C., Subramanyam M., Goelz S., Natarajan A., Lee S., Plavina T., Scanlon J.V., Sandrock A., Bozic C. Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(20):1870-80.
14. Bose G., Healy B.C., Barro C., Glanz B.I., Lokhande H.A., Polgar-Turcsanyi M., Guttmann C.R.G., Bakshi R., Weiner H.L., Chitnis T. Younger age at multiple sclerosis onset is associated with worse outcomes at age 50. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2022:329353.
15. Broła W., Sobolewski P., Szczuchniak W., Góral A., Fudala M., Przybylski W., Opara J. Association of seasonal serum 25-hydroxyvitamin D levels with disability and relapses in relapsing-remitting multiple sclerosis. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2016;70(9):995-9.

16. Broman T., Andersen O., Bergmann L. Clinical studies on multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1981;63(1):6-33.
17. Brownlee W.J., Altmann D.R., Prados F., Miszkiel K.A., Eshaghi A., Gandini Wheeler-Kingshott C.A.M., Barkhof F., Ciccarelli O. Early imaging predictors of long-term outcomes in relapse-onset multiple sclerosis. *Brain*. 2019;142(8):2276-87.
18. Butzkueven H., Kappos L., Spelman T., Trojano M., Wiendl H., Su R., Liao S., Hyde R., Licata S., Ho P.-R., Campbell N. No evidence for loss of natalizumab effectiveness with every-6-week dosing: a propensity score-matched comparison with every-4-week dosing in patients enrolled in the Tysabri Observational Program (TOP). *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2021;14:17562864211042458.
19. Cannella B., Raine C.S. Multiple sclerosis: Cytokine receptors on oligodendrocytes predict innate regulation. *Annals of Neurology*. 2004;55(1):46-57.
20. Cantó E., Tintoré M., Villar L.M., Costa C., Nurtdinov R., Álvarez-Cermeño J.C., Arrambide G., Reverter F., Deisenhammer F., Hegen H., Khademi M., Olsson T., Tumani H., Rodríguez-Martín E., Piehl F., Bartos A., Zimova D., Kotoucova J., Kuhle J., Kappos L., García-Merino J.A., Sánchez A.J., Saiz A., Blanco Y., Hintzen R., Jafari N., Brassat D., Lauda F., Roesler R., Rejdak K., Papuc E., de Andrés C., Rauch S., Khalil M., Enzinger C., Galimberti D., Scarpini E., Teunissen C., Sánchez A., Rovira A., Montalban X., Comabella M. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain*. 2015;138(4):918-31.
21. Capone A., Bianco M., Ruocco G., De Bardi M., Battistini L., Ruggieri S., Gasperini C., Centonze D., Sette C., Volpe E. Distinct Expression of Inflammatory Features in T Helper 17 Cells from Multiple Sclerosis Patients. *Cells*. 2019;8(6):533.
22. Carlsen H.S., Baekkevold E.S., Morton H.C., Haraldsen G., Brandtzaeg P. Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. *Blood*. 2004;104(10):3021-7.
23. Casserly C., Seyman E.E., Alcaide-Leon P., Guenette M., Lyons C., Sankar S., Svendrovski A., Baral S., Oh J. Spinal Cord Atrophy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Neuroimaging*. 2018;28(6):556-86.

24. Cohan S.L., Lucassen E.B., Romba M.C., Linch S.N. Daclizumab: Mechanisms of Action, Therapeutic Efficacy, Adverse Events and Its Uncovering the Potential Role of Innate Immune System Recruitment as a Treatment Strategy for Relapsing Multiple Sclerosis. *Biomedicines*. 2019;7(1):18.
25. Comabella M., Sastre-Garriga J., Borrás E., Villar L.M., Saiz A., Martínez-Yélamos S., García-Merino J.A., Pintea R., Fissolo N., Sánchez López A.J., Costa-Frossard L., Blanco Y., Llufríu S., Vidal-Jordana A., Sabidó E., Montalban X. CSF Chitinase 3-Like 2 Is Associated With Long-term Disability Progression in Patients With Progressive Multiple Sclerosis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2021;8(6):e1082.
26. Confavreux C., Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129(3):595-605.
27. Cordonnier C., de Seze J., Breteau G., Ferriby D., Michelin E., Stojkovic T., Pruvo J.P., Vermersch P. Prospective study of patients presenting with acute partial transverse myelopathy. *Journal of Neurology*. 2003;250(12):1447-52.
28. Covey T.J., Golan D., Doniger G.M., Sergott R., Zarif M., Bumstead B., Buhse M., Kaczmarek O., Mebrahtu S., Bergmann C., Wilken J., Gudesblatt M. Longitudinal assessment of the relationship between visual evoked potentials and cognitive performance in multiple sclerosis. *Clinical Neurophysiology*. 2022;137:66-74.
29. Cross A.H., Trotter J.L., Lyons J.-A. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *Journal of Neuroimmunology*. 2001;112(1):1-14.
30. Český statistický úřad. *Obyvatelstvo - údaj o počtu obyvatel ČR k 31.12.2021*. [online database]. 2022 [cit. 12.4.2022]. Available from: [https://www.czso.cz/csu/czso/obyvatelstvo\\_lide](https://www.czso.cz/csu/czso/obyvatelstvo_lide).
31. Dalla Costa G., Passerini G., Messina M.J., Moiola L., Rodegher M., Colombo B., Locatelli M., Comi G., Furlan R., Martinelli V. Clinical significance of the number of oligoclonal bands in patients with clinically isolated syndromes. *Journal of neuroimmunology*. 2015;289:62-7.

32. De Stefano N., Airas L., Grigoriadis N., Mattle H.P., O’Riordan J., Oreja-Guevara C., Sellebjerg F., Stankoff B., Walczak A., Wiendl H., Kieseier B.C. Clinical Relevance of Brain Volume Measures in Multiple Sclerosis. *CNS drugs*. 2014;28(2):147-56.
33. De Stefano N., Sprenger T., Sormani M.P., Havrdova E., Radue E.-W., Bergvall N., Piani Meier D., Tomic D., Kappos L. Impact of fingolimod on achieving no evidence of disease activity and worsening (NEDA)-4 in previously treated patients with high disease activity (P3.246). *Neurology*. 2015;84(14 Supplement):P3.246.
34. Di Pauli F., Reindl M., Ehling R., Schautzer F., Gneiss C., Lutterotti A., O’Reilly E.J., Munger K.L., Deisenhammer F., Ascherio A., Berger T. Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2008;14(8):1026-30.
35. Diamantopoulos P.T., Kalopisis K., Tsatsou A., Efthymiou A., Giannakopoulou N., Hatzidavid S., Viniou N.-A. Progressive multifocal leukoencephalopathy in the context of newer therapies in hematology and review of new treatment strategies. *European Journal of Haematology*. 2022;108(5):359-68.
36. DiSano K.D., Gilli F., Pachner A.R. Intrathecally produced CXCL13: A predictive biomarker in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis journal - experimental, translational and clinical*. 2020;6(4):2055217320981396-.
37. Disanto G., Barro C., Benkert P., Naegelin Y., Schädelin S., Giardiello A., Zecca C., Blennow K., Zetterberg H., Leppert D., Kappos L., Gobbi C., Kuhle J., the Swiss Multiple Sclerosis Cohort Study G. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2017;81(6):857-70.
38. Dobson R., Ramagopalan S., Davis A., Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2013;84(8):909-14.
39. Duan H., Luo Y., Hao H., Feng L., Zhang Y., Lu D., Xing S., Feng J., Yang D., Song L., Yan X. Soluble CD146 in cerebrospinal fluid of active multiple sclerosis. *Neuroscience*. 2013;235:16-26.

40. Dubuisson N., Puentes F., Giovannoni G., Gnanapavan S. Science is 1% inspiration and 99% biomarkers. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2017;23(11):1442-52.
41. Eikelenboom M.J., Uitdehaag B.M.J., Petzold A. Blood and CSF Biomarker Dynamics in Multiple Sclerosis: Implications for Data Interpretation. *Multiple sclerosis international*. 2011;2011:823176.
42. Espiritu A., Oh J. Prognostic Factors in Multiple Sclerosis [online]. *Practical neurology*. 2022:44-8 [cit. 15.8.2022]. Available from: <https://practicalneurology.com/articles/2022-feb/prognostic-factors-in-multiple-sclerosis/pdf>.
43. Eugster H.P., Frei K., Kopf M., Lassmann H., Fontana A. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*. 1998;28(7):2178-87.
44. European Medicines Agency. *Tecfidera, INN-dimethyl fumarate - summary of product characteristics* [online]. 2022a [cit. 12.5.2022]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecfidera-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecfidera-epar-product-information_en.pdf).
45. European Medicines Agency. *Tysabri, INN-natalizumab - summary of product characteristics* [online]. 2022b [cit. 13.5.2022]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tysabri-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tysabri-epar-product-information_en.pdf).
46. Fatima M., Lamis A., Siddiqui S.W., Ashok T., Patni N., Fadiora O.E. Therapeutic Role of Vitamin D in Multiple Sclerosis: An Essentially Contested Concept. *Cureus*. 2022;14(6):e26186.
47. Ferreira-Atuesta C., Reyes S., Giovannoni G., Gnanapavan S. The Evolution of Neurofilament Light Chain in Multiple Sclerosis. *Frontiers in neuroscience*. 2021;15:642384.
48. Fillatreau S., Sweenie C.H., McGeachy M.J., Gray D., Anderton S.M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology*. 2002;3(10):944-50.

49. Fisniku L.K., Brex P.A., Altmann D.R., Miszkiel K.A., Benton C.E., Lanyon R., Thompson A.J., Miller D.H. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2008;131(3):808-17.
50. Fitzgerald K.C., Munger K.L., Köchert K., Arnason B.G.W., Comi G., Cook S., Goodin D.S., Filippi M., Hartung H.-P., Jeffery D.R., O'Connor P., Suarez G., Sandbrink R., Kappos L., Pohl C., Ascherio A. Association of Vitamin D Levels With Multiple Sclerosis Activity and Progression in Patients Receiving Interferon Beta-1b. *JAMA Neurology*. 2015;72(12):1458-65.
51. Floro S., Carandini T., Pietroboni A.M., De Riz M.A., Scarpini E., Galimberti D. Role of Chitinase 3-like 1 as a Biomarker in Multiple Sclerosis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2022;9(4):e1164.
52. Frau J., Villar L.M., Sardu C., Secci M.A., Schirru L., Ferraro D., Coghe G., Lorefice L., Fenu G., Bedin R., Sola P., Marrosu M.G., Cocco E. Intrathecal oligoclonal bands synthesis in multiple sclerosis: is it always a prognostic factor? *Journal of Neurology*. 2018;265(2):424-30.
53. Freedman M.S., Thompson E.J., Deisenhammer F., Giovannoni G., Grimsley G., Keir G., Öhman S., Racke M.K., Sharief M., Sindic C.J.M., Sellebjerg F., Tourtellotte W.W. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis: A Consensus Statement. *Archives of Neurology*. 2005;62(6):865-70.
54. Frequin S.T.F.M., Barkhof F., Lamers K.J.B., Hommes O.R., Borm G.F. CSF myelin basic protein, IgG and IgM levels in 101 MS patients before and after treatment with high-dose intravenous methylprednisolone. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1992;86(3):291-7.
55. Frohman E.M., Monaco M.C., Remington G., Ryschkewitsch C., Jensen P.N., Johnson K., Perkins M., Liebner J., Greenberg B., Monson N., Frohman T.C., Douek D., Major E.O. JC Virus in CD34+ and CD19+ Cells in Patients With Multiple Sclerosis Treated With Natalizumab. *JAMA Neurology*. 2014;71(5):596-602.

56. Gay F.W., Drye T.J., Dick G.W., Esiri M.M. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain*. 1997;120(8):1461-83.
57. Ghafouri-Fard S., Honarmand K., Taheri M. A comprehensive review on the role of chemokines in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Metabolic Brain Disease*. 2021;36(3):375-406.
58. Giovannoni G., Butzkueven H., Dhib-Jalbut S., Hobart J., Kobelt G., Pepper G., Sormani M.P., Thalheim C., Traboulsee A., Vollmer T. Brain health: time matters in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2016;9:S5-S48.
59. Groves D.T., Jiang Y. Chemokines, a Family of Chemotactic Cytokines. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1995;6(2):109-18.
60. Hafler D.A., Compston A., Sawcer S., Lander E.S., Daly M.J., De Jager P.L., de Bakker P.I.W., Gabriel S.B., Mirel D.B., Ivinson A.J., Pericak-Vance M.A., Gregory S.G., Rioux J.D., McCauley J.L., Haines J.L., Barcellos L.F., Cree B., Oksenberg J.R., Hauser S.L. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(9):851-62.
61. Haghighi S., Andersen O., Rosengren L., Bergström T., Wahlström J., Nilsson S. Incidence of CSF abnormalities in siblings of multiple sclerosis patients and unrelated controls. *Journal of Neurology*. 2000;247(8):616-22.
62. Handel A.E., Williamson A.J., Disanto G., Dobson R., Giovannoni G., Ramagopalan S.V. Smoking and Multiple Sclerosis: An Updated Meta-Analysis. *PLOS One*. 2011;6(1):e16149.
63. Harbour S.N., DiToro D.F., Witte S.J., Zindl C.L., Gao M., Schoeb T.R., Jones G.W., Jones S.A., Hatton R.D., Weaver C.T. T(H)17 cells require ongoing classic IL-6 receptor signaling to retain transcriptional and functional identity. *Science immunology*. 2020;5(49):eaaw2262.
64. Havrdova E., Galetta S., Stefoski D., Comi G. Freedom from disease activity in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74(17 Supplement 3):S3.



65. Healy B.C., Ali E.N., Guttmann C.R.G., Chitnis T., Glanz B.I., Buckle G., Houtchens M., Stazzone L., Moodie J., Berger A.M., Duan Y., Bakshi R., Khoury S., Weiner H., Ascherio A. Smoking and Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*. 2009;66(7):858-64.
66. Hedström A.K., Alfredsson L., Lundkvist Ryner M., Fogdell-Hahn A., Hillert J., Olsson T. Smokers run increased risk of developing anti-natalizumab antibodies. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2013a;20(8):1081-5.
67. Hedström A.K., Bäärnhielm M., Olsson T., Alfredsson L. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2011;17(7):788-93.
68. Hedström A.K., Ryner M., Fink K., Fogdell-Hahn A., Alfredsson L., Olsson T., Hillert J. Smoking and risk of treatment-induced neutralizing antibodies to interferon  $\beta$ -1a. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2013b;20(4):445-50.
69. Heidari M., Radcliff A.B., McLellan G.J., Ver Hoeve J.N., Chan K., Kiland J.A., Keuler N.S., August B.K., Sebo D., Field A.S., Duncan I.D. Evoked potentials as a biomarker of remyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(52):27074-83.
70. Heydarpour P., Manouchehrinia A., Beiki O., Mousavi S.E., Abdolalizadeh A., Lakeh M.M., Sahraian M.A. Smoking and worsening disability in multiple sclerosis: A meta-analysis. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2018;138(1):62-9.
71. Hinsinger G., Galéotti N., Nabholz N., Urbach S., Rigau V., Demattei C., Lehmann S., Camu W., Labauge P., Castelnovo G., Brassat D., Loussouarn D., Salou M., Laplaud D., Casez O., Bockaert J., Marin P., Thouvenot E. Chitinase 3-like proteins as diagnostic and prognostic biomarkers of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2015;21(10):1251-61.
72. Höfer T., Krichevsky O., Altan-Bonnet G. Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Frontiers in immunology*. 2012;3:268.

73. Hong Y., Tang H.R., Ma M., Chen N., Xie X., He L. Multiple sclerosis and stroke: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurology*. 2019;19(1):139.
74. Horáková D., Libertínová J. Sledování efektu léčby a stavu pacienta při imunomodulační léčbě. In *Roztroušená skleróza*. 1. ed. Praha: Mladá fronta a. s.; 2013. p. 346-62.
75. Ishizu T., Osoegawa M., Mei F.-J., Kikuchi H., Tanaka M., Takakura Y., Minohara M., Murai H., Mihara F., Taniwaki T., Kira J.-i. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in optico-spinal multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(5):988-1002.
76. Jarius S., Aboulenein-Djamshidian F., Waters P., Kuenz B., Hauser A., Berger T., Lang W., Reindl M., Vincent A., Kristoferitsch W. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain: a journal of neurology*. 2008;131:3072-80.
77. Jarius S., Paul F., Aktas O., Asgari N., Dale R.C., de Seze J., Franciotta D., Fujihara K., Jacob A., Kim H.J., Kleiter I., Kümpfel T., Levy M., Palace J., Ruprecht K., Saiz A., Trebst C., Weinshenker B.G., Wildemann B. MOG encephalomyelitis: international recommendations on diagnosis and antibody testing. *Journal of neuroinflammation*. 2018;15(1):134.
78. Kalincik T., Buzzard K., Jokubaitis V., Trojano M., Duquette P., Izquierdo G., Girard M., Lugaresi A., Grammond P., Grand'Maison F., Oreja-Guevara C., Boz C., Hupperts R., Petersen T., Giuliani G., Iuliano G., Lechner-Scott J., Barnett M., Bergamaschi R., Van Pesch V., Amato M.P., van Munster E., Fernandez-Bolanos R., Verheul F., Fiol M., Cristiano E., Slee M., Rio M.E., Spitaleri D., Alroughani R., Gray O., Saladino M.L., Flechter S., Herbert J., Cabrera-Gomez J.A., Vella N., Paine M., Shaw C., Moore F., Vucic S., Savino A., Singhal B., Petkowska-Boskova T., Parratt J., Sirbu C.-A., Rozsa C., Liew D., Butzkueven H. Risk of relapse phenotype recurrence in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2014;20(11):1511-22.
79. Kalincik T., Vivek V., Jokubaitis V., Lechner-Scott J., Trojano M., Izquierdo G., Lugaresi A., Grand'Maison F., Hupperts R., Oreja-Guevara C., Bergamaschi R., Iuliano G., Alroughani R., Van Pesch V., Amato M.P., Slee M., Verheul F., Fernandez-Bolanos R., Fiol M., Spitaleri D.L., Cristiano E., Gray O., Cabrera-Gomez

- J.A., Shaygannejad V., Herbert J., Vucic S., Needham M., Petkovska-Boskova T., Sirbu C.-A., Duquette P., Girard M., Grammond P., Boz C., Giuliani G., Rio M.E., Barnett M., Flechter S., Moore F., Singhal B., Bacile E.A., Saladino M.L., Shaw C., Skromne E., Poehlau D., Vella N., Spelman T., Liew D., Kilpatrick T.J., Butzkueven H., on behalf of the M.S.G. Sex as a determinant of relapse incidence and progressive course of multiple sclerosis. *Brain*. 2013;136(12):3609-17.
80. Kappos L., De Stefano N., Freedman M.S., Cree B.A., Radue E.-W., Sprenger T., Sormani M.P., Smith T., Häring D.A., Piani Meier D., Tomic D. Inclusion of brain volume loss in a revised measure of 'no evidence of disease activity' (NEDA-4) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2016;22(10):1297-305.
81. Khademi M., Kockum I., Andersson M.L., Iacobaeus E., Brundin L., Sellebjerg F., Hillert J., Piehl F., Olsson T. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2010;17(3):335-43.
82. Kovářová I., Zámečník L., Blahová Dušánková J., Nytrová P. Klinický obraz roztroušené sklerózy a neuromyelitis optica. In *Roztroušená skleróza*. 1. ed. Praha: Mladá fronta a.s.; 2013. p. 117-63.
83. Kowarik M.C., Cepok S., Sellner J., Grummel V., Weber M.S., Korn T., Berthele A., Hemmer B. CXCL13 is the major determinant for B cell recruitment to the CSF during neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:93-.
84. Krejsek J., Havrdová E., Nytrová P., Marečková H. Patogeneze roztroušené sklerózy. In *Roztroušená skleróza*. 1. ed. Praha: Mladá fronta a. s.; 2013. p. 39-86.
85. Kubala Havrdova E. Ofatumumab. *Remedia*. 2021;31:264–8.
86. Kubala Havrdová E., Piřha J. *Klinický doporučený postup pro diagnostiku a léčbu roztroušené sklerózy a neuromyelitis optica a onemocnění jejího širšího spektra* [electronic book]. 2020 [cit. 24.4.2022]. Available from: <https://www.czech-neuro.cz/aktualita/klinicky-doporuceny-postup-pro-diagnostiku-a-lecbu-roztrousene-sklerozy-a-neuromyelitis-optica-a-onemocneni-jejeho-sirsiho-spektra/>.

87. Kuhle J., Barro C., Andreasson U., Derfuss T., Lindberg R., Sandelius Å., Liman V., Norgren N., Blennow K., Zetterberg H. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2016;54(10):1655-61.
88. Kuhle J., Leppert D., Petzold A., Regeniter A., Schindler C., Mehling M., Anthony D.C., Kappos L., Lindberg R.L.P. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology*. 2011;76(14):1206.
89. Kuhle J., Malmeström C., Axelsson M., Plattner K., Yaldizli Ö., Derfuss T., Giovannoni G., Kappos L., Lycke J. Neurofilament light and heavy subunits compared as therapeutic biomarkers in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2013;128(6):e33-e6.
90. Langer-Gould A.M., Gonzales E.G., Smith J.B., Li B.H., Nelson L.M. Racial and Ethnic Disparities in Multiple Sclerosis Prevalence. *Neurology*. 2022;98(18):e1818.
91. Le Y., Zhou Y., Iribarren P., Wang J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cellular & molecular immunology*. 2004;1(2):95-104.
92. Lebrun-Frenay C., Kantarci O., Siva A., Sormani M.P., Pelletier D., Okuda D.T., for the 10-year Risc study group on behalf of Sfsep O. Radiologically Isolated Syndrome: 10-Year Risk Estimate of a Clinical Event. *Annals of Neurology*. 2020;88(2):407-17.
93. Lee C.G., Da Silva C.A., Dela Cruz C.S., Ahangari F., Ma B., Kang M.-J., He C.-H., Takyar S., Elias J.A. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annual review of physiology*. 2011;73:479-501.
94. Lefort M., Vukusic S., Casey R., Edan G., Leray E. Disability progression in multiple sclerosis patients using early first-line treatments. *European Journal of Neurology*. 2022;29(9):2761-71.
95. Legler D.F., Loetscher M., Roos R.S., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Moser B. B Cell-attracting Chemokine 1, a Human CXC Chemokine Expressed in Lymphoid

Tissues, Selectively Attracts B Lymphocytes via BLR1/CXCR5. *Journal of Experimental Medicine*. 1998;187(4):655-60.

96. Lennon V.A., Kryzer T.J., Pittock S.J., Verkman A.S., Hinson S.R. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(4):473-7.
97. Leray E., Yaouanq J., Le Page E., Coustans M., Laplaud D., Oger J., Edan G. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2010;133(7):1900-13.
98. Liao W., Lin J.-X., Leonard W.J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*. 2013;38(1):13-25.
99. Libertinova J., Meluzinova E., Tomek A., Horakova D., Kovarova I., Matoska V., Kumstyrova S., Zajac M., Hyncicova E., Liskova P., Houzvickova E., Martinkovic L., Bojar M., Havrdova E., Marusic P. Myxovirus Resistance Protein A mRNA Expression Kinetics in Multiple Sclerosis Patients Treated with IFN $\beta$ . *PLOS One*. 2017;12(1):e0169957.
100. Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*. 2000;47(6):707-17.
101. Luetic G.G., Menichini M.L., Vrech C., Pappolla A., Patrucco L., Cristiano E., Marrodán M., Ysraelit M.C., Fiol M., Correale J., Cohen L., Alonso R., Silva B., Casas M., Garcea O., Deri N., Burgos M., Liwacki S., Tkachuk V., Barboza A., Piedrabuena R., Blaya P., Steinberg J., Martínez A., Carrá A., Tavolini D., López P., Knorre E., Nofal P., Volman G., Carnero Contentti E., Pinheiro A.A., Leguizamón F., Silva E., Hryb J., Balbuena M.E., Zanga G., Kohler M., Chertcoff A., Lazaro L., Tizio S., Mainela C., Reich E., Recchia L., Blanche J., Marcilla M.P., Fracaro M.E., Sgrilli G., Divi P., Jacobo M., Cabrera M., Pagani Cassara F., Sinay V., Curbelo C., Míguez J., Coppola M., Liguori N.F., Martos I., Pettinicchi J.P., Viglione J.P., José G., Bestoso S., Manzi R., Vázquez G., Nadur D., Martínez C., Serena M.A., Rojas J.I. Clinical and demographic characteristics of male MS patients included in the national registry-RelevarEM. Does sex or phenotype make the difference in the association with poor prognosis? *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2022;58:103401.

- 102.Maimone D., Guazzi G.C., Annunziata P. IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *Journal of the Neurological Sciences*. 1997;146(1):59-65.
- 103.Major E.O., Yousry T.A., Clifford D.B. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy and risks associated with treatments for multiple sclerosis: a decade of lessons learned. *The Lancet Neurology*. 2018;17(5):467-80.
- 104.Mandrioli J., Sola P., Bedin R., Gambini M., Merelli E. A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*. 2008;255(7):1023.
- 105.Marrie R.A., Cohen J., Stuve O., Trojano M., Sørensen P.S., Reingold S., Cutter G., Reider N. A systematic review of the incidence and prevalence of comorbidity in multiple sclerosis: Overview. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2015;21(3):263-81.
- 106.Marrie R.A., Patel R., Figley C.R., Kornelsen J., Bolton J.M., Graff L.A., Mazerolle E.L., Helmick C., Uddin M.N., Figley T.D., Marriott J.J., Bernstein C.N., Fisk J.D. Effects of Vascular Comorbidity on Cognition in Multiple Sclerosis Are Partially Mediated by Changes in Brain Structure. *Frontiers in neurology*. 2022;13.
- 107.Marrie R.A., Rudick R., Horwitz R., Cutter G., Tyry T., Campagnolo D., Vollmer T. Vascular comorbidity is associated with more rapid disability progression in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74(13):1041.
- 108.Masouris I., Manz K., Pfirrmann M., Dreyling M., Angele B., Straube A., Langer S., Huber M., Koedel U., Von Baumgarten L. CXCL13 and CXCL9 CSF Levels in Central Nervous System Lymphoma-Diagnostic, Therapeutic, and Prognostic Relevance. *Frontiers in neurology*. 2021;12:654543.
- 109.Matsushita T., Tateishi T., Isobe N., Yonekawa T., Yamasaki R., Matsuse D., Murai H., Kira J.-I. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLOS One*. 2013;8(4):e61835.
- 110.Matsushita T., Yanaba K., Bouaziz J.-D., Fujimoto M., Tedder T.F. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(10):3420-30.

111. McDonald W.I., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H.-P., Lublin F.D., McFarland H.F., Paty D.W., Polman C.H., Reingold S.C., Sandberg-Wollheim M., Sibley W., Thompson A., Van Den Noort S., Weinshenker B.Y., Wolinsky J.S. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2001;50(1):121-7.
112. McKay K.A., Tremlett H., Fisk J.D., Zhang T., Patten S.B., Kastrukoff L., Campbell T., Marrie R.A. Psychiatric comorbidity is associated with disability progression in multiple sclerosis. *Neurology*. 2018;90(15):e1316.
113. McLaughlin L., Clarke L., Khalilidehkordi E., Butzkueven H., Taylor B., Broadley S.A. Vitamin D for the treatment of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Journal of Neurology*. 2018;265(12):2893-905.
114. Mikaeloff Y., Caridade G., Tardieu M., Suissa S., on behalf of the K.s.g. Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children. *Brain*. 2007;130(10):2589-95.
115. Minneboo A., Barkhof F., Polman C.H., Uitdehaag B.M.J., Knol D.L., Castelijns J.A. Infratentorial Lesions Predict Long-term Disability in Patients With Initial Findings Suggestive of Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*. 2004;61(2):217-21.
116. Modvig S., Degn M., Roed H., Sørensen T.L., Larsson H.B.W., Langkilde A.R., Frederiksen J.L., Sellebjerg F. Cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain predict multiple sclerosis development and disability after optic neuritis. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2015;21(14):1761-70.
117. Møllgaard M., Degn M., Sellebjerg F., Frederiksen J.L., Modvig S. Cerebrospinal fluid chitinase-3-like 2 and chitotriosidase are potential prognostic biomarkers in early multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2016;23(5):898-905.
118. Mothapo Khutso M., Verbeek Marcel M., van der Velden Lieven B., Ang C.W., Koopmans Peter P., van der Ven A., Stelma F., Munson E. Has CXCL13 an Added Value in Diagnosis of Neurosyphilis? *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(5):1693-6.

119. Mowry E.M., Pesic M., Grimes B., Deen S.R., Bacchetti P., Waubant E. Clinical predictors of early second event in patients with clinically isolated syndrome. *Journal of Neurology*. 2009;256(7):1061-6.
120. Nadační fond IMPULS. *Souhrnná zpráva z registru k 31. 12. 2020*. [online database]. 2021 [cit. 12.4.2022]. Available from: [https://nfimpuls.cz/images/docs/remus\\_zaverecne-zpravy/zaverecna\\_zprava\\_2020\\_12\\_souhrna\\_web.pdf](https://nfimpuls.cz/images/docs/remus_zaverecne-zpravy/zaverecna_zprava_2020_12_souhrna_web.pdf).
121. Ning L., Wang B. Neurofilament light chain in blood as a diagnostic and predictive biomarker for multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS One*. 2022;17(9):e0274565.
122. Nytrová P., Doležal O. Sex bias in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders: How it influences clinical course, MRI parameters and prognosis [online]. *Frontiers in immunology*. 2022; 13[cit. 28.8.2022]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.933415/full>.
123. Okuda D.T., Siva A., Kantarci O., Inglese M., Katz I., Tutuncu M., Keegan B.M., Donlon S., Hua L.H., Vidal-Jordana A., Montalban X., Rovira A., Tintoré M., Amato M.P., Brochet B., de Seze J., Brassat D., Vermersch P., De Stefano N., Sormani M.P., Pelletier D., Lebrun C., on behalf of the Radiologically Isolated Syndrome C., Club Francophone de la Sclérose en P. Radiologically Isolated Syndrome: 5-Year Risk for an Initial Clinical Event. *PLOS One*. 2014;9(3):e90509.
124. Peakman M., Vergani D. Appendix 2: Major cytokines, cells releasing them, targets and functions. In *Basic and Clinical Immunology*. 2. ed. London: Elsevier Health Sciences; 2009. p. 342-4.
125. Perini P., Ranzato F., Calabrese M., Battistin L., Gallo P. Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2006;77(8):953.
126. Petruzzo M., Reia A., Maniscalco G.T., Luiso F., Lanzillo R., Russo C.V., Carotenuto A., Allegorico L., Palladino R., Brescia Morra V., Moccia M. The Framingham cardiovascular risk score and 5-year progression of multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2021;28(3):893-900.



- 127.Petržalka M. *CSF Biomarkers in early MS*. G-Node [online database]. 2022 [cit. 25.3.2022]. Available from: <https://doi.org/10.12751/g-node.74jj3f>.
- 128.Petržalka M., Meluzínová E., Mojžišová H., Libertínová J., Ročková P., Němá E., Elišák M., Marusič P. Efektivita prodlouženého dávkovacího intervalu natalizumabu u pacientů s roztroušenou sklerózou. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2020;83(1):79-83.
- 129.Petzold A. The prognostic value of CSF neurofilaments in multiple sclerosis at 15-year follow-up. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2015;86(12):1388.
- 130.Petzold A., Eikelenboom M.J., Keir G., Grant D., Lazeron R.H.C., Polman C.H., Uitdehaag B.M.J., Thompson E.J., Giovannoni G. Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2005;76(2):206-11.
- 131.Petzold A., Steenwijk M.D., Eikelenboom J.M., Wattjes M.P., Uitdehaag B.M.J. Elevated CSF neurofilament proteins predict brain atrophy: A 15-year follow-up study. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2016;22(9):1154-62.
- 132.Phadke J.G. Clinical aspects of multiple sclerosis in north-east scotland with particular reference to its course and prognosis. *Brain*. 1990;113(6):1597-628.
- 133.Pitteri M., Romualdi C., Magliozzi R., Monaco S., Calabrese M. Cognitive impairment predicts disability progression and cortical thinning in MS: An 8-year study. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2016;23(6):848-54.
- 134.Polman C.H., O'Connor P.W., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Miller D.H., Phillips J.T., Lublin F.D., Giovannoni G., Wajgt A., Toal M., Lynn F., Panzara M.A., Sandrock A.W. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(9):899-910.
- 135.Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F.D., Montalban X., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J.S.

- Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*. 2011;69(2):292-302.
136. Polman C.H., Reingold S.C., Edan G., Filippi M., Hartung H.-P., Kappos L., Lublin F.D., Metz L.M., McFarland H.F., O'Connor P.W., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Weinshenker B.G., Wolinsky J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of Neurology*. 2005;58(6):840-6.
137. Poser C.M. Diagnostic techniques in multiple sclerosis. *Survey of Ophthalmology*. 1980;25(2):91-101.
138. Poser C.M., Brinar V.V. Epilepsy and multiple sclerosis. *Epilepsy & Behavior*. 2003;4(1):6-12.
139. Preiningerova J.L., Vachova M. Daclizumab high-yield process in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2017;10(1):67-75.
140. Reiber H., Peter J.B. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *Journal of the Neurological Sciences*. 2001;184(2):101-22.
141. Rice G.P.A., Hartung H.-P., Calabresi P.A. Anti- $\alpha$ 4 integrin therapy for multiple sclerosis. *Neurology*. 2005;64(8):1336.
142. Riise T., Grønning M., Fernández O., Lauer K., Midgard R., Minderhoud J.M., Nyland H., Pálffy G., Poser S., Aarli J.A. Early prognostic factors for disability in multiple sclerosis, a European multicenter study. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1992;85(3):212-8.
143. Romme Christensen J., Börnsen L., Hesse D., Krakauer M., Sørensen P.S., Søndergaard H.B., Sellebjerg F. Cellular sources of dysregulated cytokines in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:215.
144. Rosso M., Chitnis T. Association Between Cigarette Smoking and Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA Neurology*. 2020;77(2):245-53.

145. Ryerson L.Z., Foley J., Kister I., Cutter G., Metzger R., Goldberg J.D., Li X., Riddle E., Smirnakis K., Jin L., Ren Z., Campbell N. Natalizumab Extended Interval Dosing (EID) is Associated with a Reduced Risk of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML) Compared with Every-4-week (Q4W) Dosing: Updated Analysis of the TOUCH® Prescribing Program Database (4419). *Neurology*. 2021;96(15 Supplement):4419.
146. Scalfari A., Neuhaus A., Degenhardt A., Rice G.P., Muraro P.A., Daumer M., Ebers G.C. The natural history of multiple sclerosis, a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*. 2010;133(7):1914-29.
147. Sellebjerg F., Christiansen M., Garred P. MBP, anti-MBP and anti-PLP antibodies, and intrathecal complement activation in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 1998;4(3):127-31.
148. Serafini B., Rosicarelli B., Magliozzi R., Stigliano E., Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2004;14(2):164-74.
149. Seyman E., Jones A., Guenette M., Vosoughi R., Selchen D., Amezcua L., Baral S., Oh J. Clinical and MRI characteristics of multiple sclerosis in patients of Middle Eastern and North African ancestry residing in Ontario, Canada. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2020;27(7):1027-36.
150. Sharief M.K., Thompson E.J. Correlation of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor with clinical activity of multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1993;56(2):169-74.
151. Schmidt P. *Bayesian inference for structured additive regression models for large-scale problems with applications to medical imaging*. [Dissertation]: LMU München; 2017. [cit. 1.5.2022]. Available from: [https://edoc.ub.uni-muenchen.de/20373/1/Schmidt\\_Paul.pdf](https://edoc.ub.uni-muenchen.de/20373/1/Schmidt_Paul.pdf).
152. Schneider R., Euler B., Rauer S. Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *European Journal of Neurology*. 2007;14(8):907-11.

153. Schönrock L.M., Gawlowski G., Brück W. Interleukin-6 expression in human multiple sclerosis lesions. *Neuroscience Letters*. 2000;294(1):45-8.
154. Schroeter M., Jander S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. *NeuroMolecular Medicine*. 2005;7(3):183-95.
155. Simpson Jr S., Taylor B., Blizzard L., Ponsonby A.-L., Pittas F., Tremlett H., Dwyer T., Gies P., van der Mei I. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2010;68(2):193-203.
156. Skoog B., Runmarker B., Winblad S., Ekholm S., Andersen O. A representative cohort of patients with non-progressive multiple sclerosis at the age of normal life expectancy. *Brain*. 2012;135(3):900-11.
157. Sormani M.P., Bruzzi P. MRI lesions as a surrogate for relapses in multiple sclerosis: a meta-analysis of randomised trials. *The Lancet Neurology*. 2013;12(7):669-76.
158. Sriwastava S., Chaudhary D., Srivastava S., Beard K., Bai X., Wen S., Khalid S.H., Lisak R.P. Progressive multifocal leukoencephalopathy and sphingosine 1-phosphate receptor modulators used in multiple sclerosis: an updated review of literature. *Journal of Neurology*. 2022;269(3):1678-87.
159. Stampanoni Bassi M., Iezzi E., Drulovic J., Pekmezovic T., Gilio L., Furlan R., Finardi A., Marfia G.A., Sica F., Centonze D., Buttari F. IL-6 in the Cerebrospinal Fluid Signals Disease Activity in Multiple Sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2020;14:120.
160. Stampanoni Bassi M., Iezzi E., Landi D., Monteleone F., Gilio L., Simonelli I., Musella A., Mandolesi G., De Vito F., Furlan R., Finardi A., Marfia G.A., Centonze D., Buttari F. Delayed treatment of MS is associated with high CSF levels of IL-6 and IL-8 and worse future disease course. *Journal of Neurology*. 2018;265(11):2540-7.
161. Starossom S.C., Campo Garcia J., Woelfle T., Romero-Suarez S., Olah M., Watanabe F., Cao L., Yeste A., Tukker J.J., Quintana F.J., Imitola J., Witzel F., Schmitz D., Morkel M., Paul F., Infante-Duarte C., Khoury S.J. Chi3l3 induces oligodendrogenesis in an experimental model of autoimmune neuroinflammation. *Nature communications*. 2019;10(1):217.

162. Stelmasiak Z., Koziol-Montewka M., Dobosz B., Rejdak K., Bartosik-Psujek H., Mitosek-Szewczyk K., Belniak-Legieć E. Interleukin-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2000;6(6):1104-8.
163. Storch M.K., Piddlesden S., Haltia M., Iivanainen M., Morgan P., Lassmann H. Multiple sclerosis: In situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Annals of Neurology*. 1998;43(4):465-71.
164. Strimbu K., Tavel J.A. What are biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*. 2010;5(6):463-6.
165. Štětkářová I. Elektrofyziologické metody v diagnostice roztroušené sklerózy. In *Roztroušená skleróza*. 1. ed. Praha: Mladá fronta a. s.; 2013. p. 198-213.
166. Teunissen C.E., Iacobaeus E., Khademi M., Brundin L., Norgren N., Koel-Simmelink M.J.A., Schepens M., Bouwman F., Twaalfhoven H.A.M., Blom H.J., Jakobs C., Dijkstra C.D. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology*. 2009;72(15):1322.
167. Thangarajh M., Gomez-Rial J., Hedström A.K., Hillert J., Alvarez-Cermeño J.C., Masterman T., Villar L.M. Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2008;14(9):1208-13.
168. The MathWorks Inc. *MATLAB and SPM12 Toolbox* [software]. Ver. Release 2020a. Natick, Massachusetts, United States, 2020 [cit. 25.3.2022]. Available from: <https://uk.mathworks.com/products/matlab.html>.
169. Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F., Carroll W.M., Coetzee T., Comi G., Correale J., Fazekas F., Filippi M., Freedman M.S., Fujihara K., Galetta S.L., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D., Marrie R.A., Miller A.E., Miller D.H., Montalban X., Mowry E.M., Sorensen P.S., Tintoré M., Traboulsee A.L., Trojano M., Uitdehaag B.M.J., Vukusic S., Waubant E., Weinshenker B.G., Reingold S.C., Cohen J.A. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018;17(2):162-73.

170. Tintore M., Rovira A., Arrambide G., Mitjana R., Río J., Auger C., Nos C., Edo M.C., Castelló J., Horga A., Perez-Miralles F., Huerga E., Comabella M., Sastre-Garriga J., Montalban X. Brainstem lesions in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010;75(21):1933.
171. Tintore M., Rovira À., Río J., Otero-Romero S., Arrambide G., Tur C., Comabella M., Nos C., Arévalo M.J., Negrotto L., Galán I., Vidal-Jordana A., Castelló J., Palavra F., Simon E., Mitjana R., Auger C., Sastre-Garriga J., Montalban X. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain*. 2015;138(7):1863-74.
172. Trapp B.D., Peterson J., Ransohoff R.M., Rudick R., Mörk S., Bö L. Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(5):278-85.
173. Uher T., Horakova D., Bergsland N., Tyblova M., Ramasamy D.P., Seidl Z., Vaneckova M., Krasensky J., Havrdova E., Zivadinov R. MRI correlates of disability progression in patients with CIS over 48 months. *NeuroImage Clinical*. 2014;6:312-9.
174. Uher T., Vaneckova M., Sobisek L., Tyblova M., Seidl Z., Krasensky J., Ramasamy D., Zivadinov R., Havrdova E., Kalincik T., Horakova D. Combining clinical and magnetic resonance imaging markers enhances prediction of 12-year disability in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2016;23(1):51-61.
175. Uher T., Vaneckova M., Sormani M.P., Krasensky J., Sobisek L., Dusankova J.B., Seidl Z., Havrdova E., Kalincik T., Benedict R.H.B., Horakova D. Identification of multiple sclerosis patients at highest risk of cognitive impairment using an integrated brain magnetic resonance imaging assessment approach. *European Journal of Neurology*. 2017;24(2):292-301.
176. Vachová M. Epidemiologie roztroušené sklerózy. In *Roztroušená skleróza*. 1. ed. Praha: Mladá fronta a.s.; 2013. p. 21-38.
177. Valizadeh A., Moassefi M., Barati E., Ali Sahraian M., Aghajani F., Fattahi M.-R. Correlation between the clinical disability and T1 hypointense lesions' volume in

- cerebral magnetic resonance imaging of multiple sclerosis patients: A systematic review and meta-analysis. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2021;27(11):1268-80.
178. Van Der Voort L.F., Visser A., Knol D.L., Oudejans C.B.M., Polman C.H., Killestein J. Lack of interferon-beta bioactivity is associated with the occurrence of relapses in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2009;16(9):1049-52.
179. van Munster C.E.P., Uitdehaag B.M.J. Outcome Measures in Clinical Trials for Multiple Sclerosis. *CNS drugs*. 2017;31(3):217-36.
180. van Pesch V., Sindic C.J., Fernández O. Effectiveness and safety of natalizumab in real-world clinical practice: Review of observational studies. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2016;149:55-63.
181. Vaněčková M., Seidl Z. *Roztroušená skleróza a onemocnění bílé hmoty v MR zobrazení*. 1. ed. Praha: Mladá fronta a.s.; 2018.
182. Vasconcelos C.C.F., Aurenção J.C.K., Thuler L.C.S., Camargo S., Alvarenga M.P., Alvarenga R.M.P. Prognostic factors associated with long-term disability and secondary progression in patients with Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2016;8:27-34.
183. Ventura R.E., Antezana A.O., Bacon T., Kister I. Hispanic Americans and African Americans with multiple sclerosis have more severe disease course than Caucasian Americans. *Multiple sclerosis: clinical and laboratory research*. 2016;23(11):1554-7.
184. Villar L.M., Espiño M., Cavanillas M.L., Roldán E., Urcelay E., de la Concha E.G., Sádaba M.C., Arroyo R., González-Porqué P., Álvarez-Cermeño J.C. Immunological mechanisms that associate with oligoclonal IgM band synthesis in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*. 2010;137(1):51-9.
185. Villar L.M., González-Porqué P., Masjuán J., Alvarez-Cermeño J.C., Bootello A., Keir G. A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *Journal of immunological methods*. 2001;258(1):151-5.
186. Villar L.M., Masjuan J., González-Porqué P., Plaza J., Sádaba M.C., Roldán E., Bootello A., Alvarez-Cermeño J.C. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*. 2002a;59(4):555.

187. Villar L.M., Masjuan J., González-Porqué P., Plaza J., Sádaba M.C., Roldán E., Bootello A., Alvarez-Cermeño J.C. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2003;53(2):222-6.
188. Villar L.M., Masjuan J., González-Porqué P., Plaza J., Sádaba M.C., Roldán E., Bootello A., Alvarez-Cermeño J.C. Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: Relationship with disability in MS. *Neurology*. 2002b;58(5):824.
189. Visscher B.R., Liu K.-S., Clark V.A., Detels R., Malmgren R.M., Dudley J.P. Onset symptoms as predictors of mortality and disability in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1984;70(5):321-8.
190. Vitkova M., Diouf I., Malpas C., Horakova D., Kubala Havrdova E., Patti F., Ozakbas S., Izquierdo G., Eichau S., Shaygannejad V., Onofrij M., Lugesesi A., Alroughani R., Prat A., Larochele C., Girard M., Duquette P., Terzi M., Boz C., Grand, Maison F., Sola P., Ferraro D., Grammond P., Butzkueven H., Buzzard K., Skibina O., Yamout B.I., Karabudak R., Gerlach O., Lechner-Scott J., Maimone D., Bergamaschi R., Van Pesch V., Iuliano G., Cartechini E., José Sà M., Ampapa R., Barnett M., Hughes S.E., Ramo-Tello C.M., Hodgkinson S., Spitaleri D.L.A., Petersen T., Butler E.G., Slee M., McGuigan C., McCombe P.A., Granella F., Cristiano E., Prevost J., Taylor B.V., Sánchez-Menoyo J.L., Laureys G., Van Hijfte L., Vucic S., Macdonell R.A., Gray O., Olascoaga J., Deri N., Fragoso Y.D., Shaw C., Kalincik T. Association of Latitude and Exposure to Ultraviolet B Radiation With Severity of Multiple Sclerosis. *Neurology*. 2022;98(24):e2401.
191. Volpe E., Battistini L., Borsellino G. Advances in T Helper 17 Cell Biology: Pathogenic Role and Potential Therapy in Multiple Sclerosis. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:475158.
192. Wagner J.N., Weis S., Kubasta C., Panholzer J., von Oertzen T.J. CXCL13 as a diagnostic marker of neuroborreliosis and other neuroinflammatory disorders in an unselected group of patients. *Journal of Neurology*. 2018;265(1):74-81.
193. Walsh M.J., Tourtellotte W.W. Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 1986;163(1):41-53.



194. Wingerchuk D.M., Banwell B., Bennett J.L., Cabre P., Carroll W., Chitnis T., de Seze J., Fujihara K., Greenberg B., Jacob A., Jarius S., Lana-Peixoto M., Levy M., Simon J.H., Tenenbaum S., Traboulsee A.L., Waters P., Wellik K.E., Weinshenker B.G., International Panel for N.M.O.D. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2015;85(2):177-89.
195. Wynford-Thomas R., Jacob A., Tomassini V. Neurological update: MOG antibody disease. *Journal of Neurology*. 2019;266(5):1280-6.
196. Xiang W., Xie C., Guan Y. The identification, development and therapeutic potential of IL-10-producing regulatory B cells in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2021;354:577520.
197. Yousry T.A., Major E.O., Ryschkewitsch C., Fahle G., Fischer S., Hou J., Curfman B., Miszkil K., Mueller-Lenke N., Sanchez E., Barkhof F., Radue E.-W., Jäger H.R., Clifford D.B. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *The New England journal of medicine*. 2006;354(9):924-33.
198. Zafeiropoulos P., Katsanos A., Kitsos G., Stefanidou M., Aspridis I. The contribution of multifocal visual evoked potentials in patients with optic neuritis and multiple sclerosis: a review. *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology*. 2021;142(3):283-92.
199. Zeman D., Kušnierová P. Detection of oligoclonal IgM in cerebrospinal fluid. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2016;24(3):141-6.

## 10 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

1. Původní vědecké práce, které jsou podkladem disertační práce:

a) s impakt faktorem (IF):

**Petržalka M**, Meluzínová E, Libertínová J, Mojžišová H, Hanzalová J, Ročková P, Elišák M, Kmetonyová S, Šanda J, Sobek O, Marusič P. IL-2, IL-6 and chitinase 3- like 2 might predict early relapse activity in multiple sclerosis. *PLOS One* [Online]. 2022; 17(6):e0270607. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270607>.

IF (2021): 3,752

b) bez IF: nejsou

2. Původní vědecké práce, které souvisí s tématem disertační práce, ale nejsou jejím podkladem:

a) s IF:

**Petržalka M**, Meluzínová E, Libertínová J, Hanzalová J, Marusič P. Biomarkery progresu onemocnění a prognózy u pacientů s roztroušenou sklerózou. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie*. 2018;81(4):404-409.

IF (2018): 0,355

**Petržalka M**, Meluzínová E, Mojžišová H, Libertínová J, Ročková P, Němá E, Elišák M, Marusič P. Efektivita prodlouženého dávkovacího intervalu natalizumabu u pacientů s roztroušenou sklerózou. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2020;83(1):79-83.

IF (2020): 0,35

b) bez IF: nejsou

3. Původní vědecké práce bez vztahu k tématu disertační práce:

a) s IF:

Kmetonyova S, Paulasova Schwabova J, Sramkova T, Dankova M, Olserova A, **Petrzalka M**, et al. Posterior circulation stroke diagnosis in unselected group of acutely dizzy patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery* [published online ahead of print]. 2022; 224:107541. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030384672200422X>

IF (2021): 1,876

Libertinova J, Meluzinova E, Nema E, Rockova P, Elisak M, **Petrzalka M**, Mojzisova H, Hammer J, Tomek A, Marusic P. Elevated D-dimer as an immediate response to alemtuzumab treatment. *Multiple Sclerosis Journal*. 2021;27(1):151-154.

IF (2021): 6,312

Mojžišová H, Elišák M, Hanzalová J, **Petržalka M**, Marusič P. Autoimunitní encefalitidy s negativitou neurálních protilátek – klinické charakteristiky a možnosti detekce protilátek. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie*. 2020;83/116:251-256.

IF (2020): 0,35

Němá E, Libertínová J, Ročková P, **Petržalka M**, Houžvičková E, Meluzínová E. Pegylovaný interferon beta 1-a v klinické praxi. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie*. 2019;82(5):556-560.

IF (2019): 0,377

b) bez IF: nejsou

## 11 PŘÍLOHY