

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Praha, 2024

MUDr. Michal Židó

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Metabolomika mozkomíšního moku u roztroušené sklerózy

Metabolomika mozkomíšního moku jako zdroj nových biomarkerů v počátečních stádiích roztroušené sklerózy

Metabolomics of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis

Metabolomics of cerebrospinal fluid as a new source of biomarkers in early stages of multiple sclerosis

Školitel: Prof. MUDr. Ivana Štětkářová, CSc., MHA

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.

Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému (SIS 3.LF UK) jsou totožné.

V Praze, 06.03.2024

MUDr. Michal Židó

.....

Identifikační záznam:

Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

ŽIDÓ, Michal. *Metabolomika mozkomíšního moku u roztroušené sklerózy. [Metabolomics of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis]*. Praha, 2024. 120 stran, 1 příloha. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Neurologická Klinika 3. LF UK a FNKV 2024. Prof. MUDr. Ivana Štětkařová, CSc. MHA.

Klíčová slova: biomarker, demyelinizační onemocnění, evokované potenciály, gliální fibrilární acidický protein, likvor, metabolomika, motorické evokované potenciály, mozkomíšní mok, neurofilamenta, roztroušená skleróza, somatosenzorické evokované potenciály

Key words: biomarker, cerebrospinal fluid, demyelinating disease, evoked potentials, glial fibrillar acidic protein, metabolomics, motor evoked potentials, multiple sclerosis, neurofilaments, somatosensory evoked potentials

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval svojí školitelce prof. MUDr. Ivaně Štětkářové, CSc., MHA., přednostce Neurologické kliniky FNKV a 3. LF UK, za odborné vedení, energii a trpělivost vynaloženou při práci na odborných publikacích a dizertační práci. Dále za vytvoření příležitostí a podnětu k rozvoji akademických a klinických dovedností a za podněty k dalšímu výzkumu a publikační činnosti.

Děkuji svým rodičům za jejich nezištnou psychickou, hmotní i duševní podporu nejen při tvorbě této práce, ale i celém dosavadním studiu a rozhodnutí studovat a pracovat v Praze. Dále taky děkuji i svému bratrovi za jeho psychickou podporu a rady, které mi ochotně poskytl.

Děkuji taky laboratornímu týmu Národního ústavu duševního zdraví (NUDZ), Klecany, jmenovitě Davidovi Kačerovi, Danielovi Bermejo Rodriguezovi a RNDr. Karlu Valešovi Ph.D. za jejich neocenitelnou práci a zkušenosti při laboratorním zpracování vzorků. Taky děkuji prim. MUDr. Ondřeji Sobkovi, CSc. a laboratoři Topelex za poskytnutí přístroje a zpracování částí vzorků laboratorní metodou SIMOA.

V neposlední řadě děkuji kolegům Neurologické kliniky FNKV, jmenovitě MUDr. Denise Zimové, prim. MUDr. Tomáši Peiskerovi Ph.D., MUDr. Zuzaně Svobodové, prof. MUDr. Alešovi Bartošovi, Ph.D., MUDr. Václavovi Bočkovi, laborantkám Ivaně Peluhové, Vlastě Brandejsové a Renátě Lejčkové.

Děkuji ještě jednou všem zmíněným, protože bez nich by tahle práce nemohla vzniknout.

Abstrakt

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění, poškozující dominantně bílou hmotu centrálního nervového systému (CNS). Přesná příčina vzniku RS je stále neznámá, avšak se předpokládá, že se na rozvoji podílí rozličné environmentální i genetické faktory. Patofyziologie RS je velice komplexní proces. RS je v současné době zatím nevyléčitelná nemoc, ale pomocí specifické terapie lze ovlivnit její průběh. Metabolomika je systematická studie, která využívá přístup analytické chemie k profilaci endogenně malých molekul metabolitů přítomných ve zkoumaném preparátu. Hlavním cílem této dizertace bylo stanovit signifikantní rozdíly v metabolomu likvoru pacientů v počátečním stádiu RS v porovnání s kontrolami. Dále jsme chtěli provést korelační analýzu těchto výsledků v čase s klinickým stavem pacientů v podobě hodnot EDSS. Následně jsme v rámci dalších analýz hodnotili i další potenciální biomarkery RS, přesněji evokované potenciály (EP), lehké řetězce neurofilament (NfL) a gliální fibrilární acidický protein (GFAP). Celkem jsme sesbírali vzorky likvoru od 40 pacientů v časných stádiích RS, a vzorky likvoru od 33 zdravých kontrol. Následná analýza těchto vzorků byla provedena pomocí vysoce výkonné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrofotometrií, s detektorem s vysokým rozlišením. Dále proběhla analýza části vzorků pomocí Single Molecule Array (SIMOA) a u části pacientů byly provedeny EP a následně korelované s hodnotami EDSS. Statisticky signifikantní změny (p -value $<0,05$) byly pozorovány v likvoru u argininu, histidinu, spermidinu, glutamátu, cholinu, tyrozinu, serinu, kyseliny olejové, stearové a linoleové. Dále jsme pozorovali významnou korelaci při vyšetření EP a u metabolitu histidinu s hodnotami EDSS. Tím jsme poukázali na jejich možný prognostický potenciál. V případě NfL a GFAP jsme u ostatních metabolitů významnou korelaci s hodnotami EDSS nepozorovali. Závěrem lze říci, že jsme v naší práci prokázali statisticky významné rozdíly v koncentracích některých metabolitů v likvoru pacientů v počátečních stádiích RS, které by mohly být využity jako nové biomarkery RS. Dále jsme prokázali, že EP korelují s aktuálními hodnotami EDSS. Zdá se, že u pacientů v počátečních stádiích RS mají schopnost předvídat na základě hodnot EDSS vývoj klinického stavu v následujících letech nemoci.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease that damages white matter of the central nervous system (CNS). The exact cause of MS is still unknown, but various environmental and genetic factors are believed to be involved in its development. The pathophysiology of MS is a very complex. MS is currently an incurable disease, but specific therapy can be used to influence its course. Metabolomics is a systematic study that uses an analytical chemistry approach to profile endogenously small molecule metabolites present in the examined preparation. The main goal of this dissertation was to determine significant differences in the metabolome of the cerebrospinal fluid of patients in the initial stage of MS compared to controls. Furthermore, we performed a correlation analysis of these results over time with the clinical condition of the patients in the form of EDSS values. Subsequently, as part of further analyses, we also evaluated other potential biomarkers of MS, more precisely evoked potentials (EP), neurofilament light chains (NfL) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). In total, we collected CSF samples from 40 patients in the early stages of MS, and CSF samples from 33 healthy controls. Subsequent analysis of these samples was performed using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrophotometry, with a high-resolution detector. Furthermore, some samples were analyzed with the help of Single Molecule Array (SIMOA) and in some patients, EP was performed and subsequently correlated with EDSS values. Statistically significant changes (p -value <0.05) were observed in CSF for arginine, histidine, spermidine, glutamate, choline, tyrosine, serine, oleic, stearic and linoleic acids. Furthermore, we observed a significant correlation in the examination of EP and histidine metabolite with the EDSS values, thus pointing out their possible prognostic potential. In the case of NfL and GFAP, we did not observe a significant correlation with EDSS values for the other metabolites. In conclusion, we demonstrated statistically significant differences in the concentrations of some metabolites in the cerebrospinal fluid of patients in the initial stages of MS, which could be used as new biomarkers of MS. We further demonstrated that EPs correlate with current EDSS values. In patients in the early stages of MS evoked potentials seem to have the ability to predict, based on EDSS values, the development of the clinical condition in the following years of the disease.

Seznam použitých zkratek:

- ACN** acetonitril
- ADEM** akutní diseminovaná encefalomyelitida
- ADM** musculus abductor digiti minimi
- AQP-4** aquaporin-4
- BAEP** kmenové sluchové evokované potenciály
- CCT** centrální kondukční čas
- CIS** klinicky izolovaný syndrom
- CLDN3** claudin-3
- CMCT** centrální motorický kondukční čas
- CNS** centrální nervový systém
- CRP** C-reaktivní protein
- CSF** mozkomíšní mok
- CUR** curtain gas
- CxM** kortikální svalová odpověď
- DMD** disease modifying drugs
- DNA** deoxyribonukleová kyselina
- EB** Epstein-Barrové
- EBNA** jaderný antigen viru Epstein-Barrové
- EBV** virus Epstein-Barrové
- EDSS** expanded disability status scale
- eNOS** endoteliální syntáza oxidu dusného
- EP** evokované potenciály
- FDR** the Benjamini-Hochberg false-discovery rate
- FLAIR** fluid attenuated inversion recovery
- FSS** functional systems scores
- GFAP** gliální fibrilární acidický protein
- Glc** glukóza
- GS** ion source gas
- H₂O** voda
- HCOOH** kyselina mravenčí
- HEFT** high efficacy frontline treatment
- HLA** lidský leukocytový antigen

HPLC vysoko výkonná kapalinová chromatografie
HPLC-MS/MS HPLC s tandemovou hmotnostní spektrofotometrií
CHI3L1 chitináza-3-like-1
ID identifikační číslo
IDA informačně závislá akvizice
IEF izoelektrická fokusace
IF impact faktor
IgG imunoglobulin G
IgM imunoglobulin M
iNOS indukibilní syntáza oxidu dusného
IPA izopropylalkohol
IVIG intravenózně podaný imunoglobulin G
JC John Cunningham
JCV John Cunningham virus
l.sin lateris sinistri
LC-MS kapalinová chromatografie – hmotnostní fotospektrometrie
LETM dlouhá extenzivní transverzální myelitida
LITE lower initial treatment efficacy
m. musculus
m/z hmotnost / náboj
MeOH metanol
MEP motorické evokované potenciály
MOG myelinový oligodendrocytární protein
MOGAD nemoc asociovaná s protilátkami proti MOG
MR magnetická rezonance
MS multiple sclerosis
MSSS Multiple Sclerosis Severity Score
n. nervus
N/A nedostupné
NEDA no evident disease activity
NfL lehké řetězce neurofilament
NMOSD spektrum onemocnění neuromyelitis optica
nNOS neuronální syntáza oxidu dusného
NO oxid dusný

Nrf2 nuclear factor – like 2
OCB oligoklonální pásy
OCT optická koherenční tomografie
pH potenciál vodíku
PML progresivní multifokální leukoencefalopatie
q3EPS kvantitativní skóre tří evokovaných potenciálů
qEPS kvantitativní skóre evokovaných potenciálů
qMEP kvantitativní skóre motorických evokovaných potenciálů
qSEP kvantitativní skóre somatosenzorických evokovaných potenciálů
qVEP kvantitativní skóre vizuálních evokovaných potenciálů
RIS radiologicky izolovaný syndrom
RNA ribonukleová kyselina
RNFL tloušťka vrstvy nervových vláken sítnice
RS roztroušená skleróza
RT retenční čas
S1P sfingosin-1-fosfát
SEP somatosenzorické evokované potenciály
SIMOA single molecule array
st.p. status post
SÚKL Státní ústav pro kontrolu léčiv
SxM spinální svalová odpověď
TA musculus tibialis anterior
TEM teplota
TMV celkový objem makuly
tzv. takzvaný
USA Spojené státy americké
VEP zrakové evokované potenciály
WPW syndrome Wolf-Parkinson-White syndrome

Obsah

1. Úvod	14
1.1 Roztroušená skleróza	15
1.1.1 Etiologie roztroušené sklerózy	16
1.1.1.1 Genetické faktory.....	16
1.1.1.2 Environmentální faktory	17
1.1.2 Epidemiologie roztroušené sklerózy	18
1.1.3 Patofyziologie roztroušené sklerózy	19
1.1.3.1 Zánětlivé procesy	20
1.1.3.2 Axonální neurodegenerace	21
1.1.3.3 Remyelinizace	22
1.1.4 Diagnostika roztroušené sklerózy	23
1.1.4.1 Klinické příznaky roztroušené sklerózy	23
1.1.4.2 Magnetická rezonance u roztroušené sklerózy	24
1.1.4.3 Biochemická analýza likvoru	27
1.1.4.4 Evokované potenciály	27
1.1.4.5 Optická koherentní tomografie	30
1.1.5 Léčba roztroušené sklerózy	31
1.1.5.1 Akutní terapie atak	32
1.1.5.2 Symptomatická terapie roztroušené sklerózy	33
1.1.5.3 Chronická „DMD“ terapie roztroušené sklerózy	34
1.1.5.3.1 Léky první linie	34
1.1.5.3.2 Eskalační terapie	36
1.1.5.3.3 Léčba progresivních fází roztroušené sklerózy	38
1.1.5.4 Cíl a strategie léčby roztroušené sklerózy	39
1.1.6 Diferenciální diagnóza demyelinizačních onemocnění CNS	40
1.1.6.1 NMOSD	40
1.1.6.2 MOGAD	42
1.1.6.3 ADEM	42
1.2 Mozkomíšní mok	43
1.2.1 Funkce mozkomíšního moku	43
1.2.2 Laboratorní využití mozkomíšního moku	44
1.3 Biomarkery roztroušené sklerózy	45

1.3.1	Lehké řetězce neurofilament (NfL)	45
1.3.2	Neuron specifická enoláza	46
1.3.3	Gliální fibrilární acidický protein (GFAP)	46
1.3.4	Myelinový oligodendrocytový protein	46
1.3.5	Chitináza-3-like-1 prekurzor	46
1.3.6	Střevo a roztroušená skleróza	47
1.4	Metabolomika	47
1.5	Současný stav zkoumaného problému	49
2.	Cíl dizertační práce	50
2.1	Hypotézy	50
3.	Metodika dizertace	51
3.1	Strategie dizertace	51
3.2	Popis a charakteristika zkoumaného souboru	51
3.3	Odběr a zpracování biologického materiálu	53
3.4	Laboratorní zpracování metabolomiky mozkomíšního moku	54
3.4.1	Laboratorní analýza vzorků	54
3.4.2	Zpracování laboratorních dat	55
3.5	Zpracování klinických a paraklinických dat	56
3.5.1	Extrakce klinických dat	56
3.5.2	Extrakce paraklinických dat	56
3.5.2.1	Evokované potenciály a EP skóre	57
3.6	Analýza hladin NfL a GFAP	59
3.7	Statistická a korelační analýza	59
4.	Výsledky	60
4.1	Výsledky metabolomické analýzy	67
4.1.1	Korelace metabolomické analýzy s hodnotami EDSS	74
4.1.2	Korelace metabolomické analýzy s časem odběru likvoru od vzniku klinický obtíží	76
4.2	Výsledky analýzy NfL a GFAP	76
4.2.1	Korelace hladin NfL a GFAP s hodnotami EDSS	76
4.3	Výsledky evokovaných potenciálů a EP skóre	79
4.3.1	Korelace mezi evokovanými potenciály a hodnotami EDSS	81
5.	Diskuze	84
6.	Závěr dizertační práce	92

6.1 Zhodnocení cílů a hypotéz dizertace	93
7. Souhrn	94
8. Summary	95
9. Použitá literatura	96
10. Seznam publikované literatury	117
10.1 Publikace související s tématem dizertační práce	117
10.1.1 Prvoautorské publikace v časopisech s IF	117
10.1.2 Spoluautorské publikace v časopisech s IF	117
10.2 Publikace nesouvisející s tématem dizertační práce	117
10.2.1 Spoluautorské publikace v časopisech s IF	117
10.3 Ostatní práce	118
10.3.1 Postery, přednášky, kapitoly v knihách související s tématem dizertační práce	118
10.3.2 Postery, přednášky, kapitoly v knihách nesouvisející s tématem dizertační práce	118
11. Příloha I: Originály publikací související s tématem dizertační práce	120

1. Úvod

Vzrůstající incidence autoimunitních onemocnění v české, ale i ve světové populaci, představuje vážný problém nejen pro moderní medicínu. Jedním z takových onemocnění je i roztroušená skleróza. Jedná se o závažné zánětlivé autoimunitní onemocnění postihující centrální nervový systém. Roztroušená skleróza je nevléčitelné onemocnění, avšak za pomoci nových léčebných postupů jsme schopni toto onemocnění na různě dlouhou dobu stabilizovat a pacientům výrazně prodloužit délku kvalitního života s minimálním postižením. Nemoc postihuje primárně mladé lidi v produktivním věku a je jednou z nejčastějších příčin jejich disability, z čehož vyplývá i značný socio-ekonomický dopad této nemoci. Péče o pacienty s roztroušenou sklerózou a jejich léčba jsou finančně i časově nákladné. V rámci České republiky jí zabezpečují neurologové v specializovaných centrech pro demyelinizační onemocnění.

Současné možnosti léčby roztroušené sklerózy jsou rozsáhlé. K dispozici je velké množství léků a stále přibývají další, ale jejich efektivita se značně liší. Jednomu pacientovi lék nemoc účinně stabilizuje i na období několika let, druhému ale nepomůže nebo mu naopak uškodí například kvůli různorodým, někdy až život ohrožujícím nežádoucím účinkům. Proto je v rámci péče o pacienty s roztroušenou sklerózou preferován a podporován individuální přístup k pacientovi s prevencí rozvoje disability brzkým zahájením terapie.

Snaha o časnou efektivní léčbu roztroušené sklerózy s nasazením co nejlépe vyhovující terapie každému pacientovi se setkává v dnešní době s problémem nedostatku vhodných prognostických biomarkerů, které by byly schopné předvídat závažnost a progresi onemocnění, včetně odezvy na podanou terapii.

Téma zde předkládané práce bylo zvoleno z výše uvedených důvodů. Cílem práce bylo analyzovat metabolomiku mozkomíšního moku, neurofilamenta, gliální fibrilární acidický protein (GFAP) a evokované potenciály u pacientů s roztroušenou sklerózou a identifikovat nové potenciální prognostické biomarkery tohoto onemocnění.

1.1. Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza, poprvé popsána v 1868 francouzským neurologem Jean-Martin Charcot jako „sclerose en plaques“, je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění postihující dominantně bílou hmotu centrálního nervového systému (CNS) s opakovanou fokální demyelinizací a v menší míře i axonální degenerací, což vede k postupnému rozvoji disability (Weiner, 2004). Toto onemocnění primárně postihuje mladé lidi a častěji ženy než muže.

Roztroušenou sklerózu můžeme rozdělit do několika základních subtypů dle ustanovení konsenzu z roku 1996. Nejčastějším typem je relabující-remitentní forma roztroušené sklerózy. Vyskytuje se u cca 80 - 85 % pacientů a projevuje se kolísavým průběhem, kde se střídají období relapsů (atak, exacerbací), kdy dochází k opětovnému vzplanutí autoimunitního zánětu a poškozování nervové tkáně, a období remise, kdy zánět ustupuje a dominují reparační a regenerační procesy jako například proces remyelinizace. Po 10 až 15 letech tato forma roztroušené sklerózy přechází do sekundárně progresivní roztroušené sklerózy. Jedná se o formu, kde dominují procesy axonální degenerace nad procesy demyelinizace, a tím dochází k postupnému zhoršování disability. V cca 10 - 15 % případů se u pacientů od začátku onemocnění rozvíjí primárně progresivní forma roztroušené sklerózy, při které dochází k postupnému rozvoji a zhoršování disability, bez specifických relapsů či období remise. Ve vzácných případech (cca ve 3 %) se může rozvinout i progresivní relabující forma, pro kterou je specifický agresivní průběh se závažnými relapsy (Lublin et al., 1996). Tato klasifikace, i když stále užívaná, již v průběhu času ztrácí na validitě a do popředí přicházejí návrhy na novou klasifikaci, která zatím nebyla oficiálně ustanovená (Fred et al., 2014). Rozlišuje se například klinicky izolovaný syndrom (CIS) či remitentní RS (s aktivitou, nebo bez) a progresivní RS (s progresí a aktivitou, s progresí bez aktivity, bez progresu s aktivitou, bez progresu a bez aktivity).

Klinicky izolovaný syndrom (CIS) je definovaný jako první epizoda klinických obtíží, trvajících minimálně 24 hodin, které jsou způsobené zánětem a demyelinizací (prokázáno pomocí magnetické rezonance a analýzy mozkomíšního moku). V případě, že se jedná jen o nález na magnetické rezonanci, odpovídající demyelinizačnímu onemocnění a bez jasných klinických obtíží, nazýváme tento

stav jako *radiologicky izolovaný syndrom (RIS)*. V obou případech postupem času může, ale nemusí dojít k rozvoji roztroušené sklerózy. Na základě nálezů na magnetické rezonanci a na základě analýzy mozkomíšního moku můžeme hodnotit riziko přechodu CIS do roztroušené sklerózy jako nízké, střední nebo vysoké riziko. Celkově se však u přibližně 65 % pacientů s CIS roztroušená skleróza rozvine (Efendi et al., 2015).

1.1.1 Etiologie roztroušené sklerózy

Přesná příčina vzniku roztroušené sklerózy je zatím stále neznámá. Dle dostupných výsledků z mnohaletých vědeckých studií se předpokládá, že se na rozvoji tohoto onemocnění podílí veliké množství rozličných patogenních mechanismů. Z rizikových faktorů je pro rozvoj nemoci známý podíl genetických faktorů (genetická predispozice) a faktorů vnějšího prostředí, avšak i po mnoha letech nejsou všechny popsány a stále přibývají nové.

1.1.1.1 Genetické faktory

Z genetických faktorů bylo prokázáno, že s větším rizikem výskytu roztroušené sklerózy jsou asociované některé alely skupiny lidských leukocytových antigenů (HLA) 1 a 2. Tato asociace byla poprvé popsána již před několika desítkami let (Bertrams et al., 1972; Maito et al., 1972). HLA systém představuje důležitou součást imunitních procesů. Podílí se na správné tvorbě a fungování antigen prezentujících T lymfocytů, přesněji kóduje příslušné proteiny receptorů těchto buněk. HLA systém je kontrolován geny, které se nacházejí na segmentu 6. chromozómu. Studiemi bylo prokázáno, že alely HLA-DRB5, HLA-DRB1, HLA-DQA1 a HLA-DQB1 jsou asociované s vyšším rizikem rozvoje roztroušené sklerózy (Sachs 1977; De Silvestri et al., 2019). V případě HLA-DQB1 je riziko vzniku roztroušené sklerózy až několikanásobně vyšší (Fogdell-Hahn et al., 2000).

Roztroušená skleróza není sama o sobě dědičné onemocnění, ale i přesto existuje díky výše zmíněným genetickým faktorům forma familiární, kdy potomkové mohou po rodičích podědit rizikové genetické predispozice. S pozitivní rodinnou anamnézou stoupá i riziko výskytu této nemoci (Al Jumah et al., 2011).

1.1.1.2 Environmentální faktory

Do skupiny rizikových faktorů vnějšího prostředí můžeme zařadit velké množství různých faktorů. K těm hlavním patří věk, pohlaví, rasa, kouření, obezita, nedostatek vitamínu D a herpetické infekce (především infekce virem Epstein-Barrové) (Taan et al., 2021).

Kouření představuje významný rizikový faktor pro rozvoj mnoha onemocnění jako například onemocnění kardiovaskulárního systému nebo nemoci onkologického charakteru. V případě roztroušené sklerózy bylo prokázáno, že kouření významně zvyšuje riziko vzniku roztroušené sklerózy (Halawani et al., 2018). Jedna z možných hypotéz vlivu kouření na rozvoj nemoci je senzitivita oligodendrocytů (buněk produkujících myelin) vůči oxidu dusnému (NO). Opakované vystavování se NO vede k buněčné smrti apoptózou nebo nekrózou. NO je obsažen v cigaretách a může způsobovat a podporovat degeneraci, demyelinizaci a nekrózu oligodendrocytů (Mitrovic et al., 1995).

Vitaminy skupiny D (kalciferoly) jsou v tučích rozpustné sekosteroidy, které jsou v neaktivní formě získávané z potravy nebo vznikají syntézou v kůži v závislosti na expozici ultrafialovému záření B. Následně jsou tyto neaktivní formy aktivovány v játrech a v ledvinách, kde vzniká biologicky aktivní forma – kalcitriol (1, 25-dihydroxycholecalciferol). O vitamínu D se ví, že se podílí na mnoha imunoregulačních dějích a tím se uplatňuje i v procesech autoimunitních onemocnění. Vitamin D může hrát roli jako endogenní „brzda“ zánětu (Goldsmith et al., 2015). Vitamin D indukuje expresi inhibičních receptorů ILT-3, které regulují aktivaci T lymfocytů a tím snižují riziko autoimunitní reakce (Waschbisch et al., 2014). Hypovitaminóza D je spojená s vyšším rizikem výskytu roztroušené sklerózy a zároveň může vysvětlit vyšší incidenci nemoci v severnějších oblastech, kde je nižší expozice slunečnímu svitu (Ramagopalan et al., 2011).

Virus Epstein-Barrové (EB virus) je lymfotropní herpetický DNA virus, který se uplatňuje u řady onkologických onemocnění. Ve většině populace tento vir přetrvává jako latentní infekce. Recentní studie poukazují i na jeho roli v rozvoji roztroušené sklerózy. EB virus zřejmě v patofyziologii roztroušené sklerózy sehrává roli „triggeru“ neboli spouštěče, a to na podkladě několika možných

patologických procesů. Jednou z možností jsou molekulární mimikry, kdy dochází ke zkřížené reaktivitě mezi tělu vlastními antigeny a EBV antigeny. Tento proces zahrnuje humorální i buněčnou imunitu. Příkladem může být zkřížená reakce mezi protilátkami proti různým částem EBNA 1 (jaderný antigen viru Epstein-Barrové) a myelinového bazického proteinu (Jog et al., 2019) nebo adhezivními molekulami gliálních buněk (glialCAM) (Lanz et al., 2022) či anoctaminu 2 (ANO2), proteinu chloridového kanálu (Tengvall et al., 2019). Dalším mechanismem může být imortalizace a transformace B lymfocytů EB virem, která může vést až ke klonální expanzi. Není přesně známé, které subtypy B lymfocytů jsou nebo nejsou náchylné k tomuto procesu, ale imortalizace autoreaktivních B lymfocytů může hrát roli jako spouštěč roztroušené sklerózy (Pender et al., 2011). Dalším z možných procesů může být infiltrace CNS EB virem, přesněji řečeno migrace B lymfocytů infikovaných EB virem do CNS, kde mohou ovlivňovat imunitní reakce. Několik studií prokázalo přítomnost EBV-pozitivních B lymfocytů v lézích CNS u pacientů s roztroušenou sklerózou. U kontrolních skupin tento nálezn nebyl prokázán (Veroni et al., 2018; Magliozzi et al., 2013; Serafini et al., 2010).

Pohlaví samo o sobě také představuje rizikový faktor rozvoje roztroušené sklerózy. Je patrný významně vyšší výskyt roztroušené sklerózy u žen než u mužů. V posledních letech incidence této nemoci stoupá, a to převážně v ženské populaci (Orton et al., 2010; Ahlgren et al., 2011; Wallin et al., 2012). Některé studie popisují poměr výskytu mezi ženami a muži až 3,5:1 (Harbo et al., 2013).

1.1.2 Epidemiologie roztroušené sklerózy

Dle epidemiologické studie z roku 2020 je na světě kolem 2,8 milionů pacientů s roztroušenou sklerózou, avšak toto číslo může být i vyšší vzhledem k menším diagnostickým možnostem v některých zemích. V České republice je registrovaných k 31. 12. 2023 přes 20 000 pacientů dle českého registru pacientů s roztroušenou sklerózou (ReMuS). Nejčastěji tato nemoc postihuje mladé lidi ve věku mezi 20 až 40 lety; v dětství a po 60. roce věku je výskyt vzácný. Jak už bylo dříve uvedeno, ženy jsou postižené častěji než muži, a to 2-3x častěji. Největší vnímavost k tomuto onemocnění má indoevropská a černá rasa a nejmenší má hispánská a orientální rasa (Langer-Gould et al., 2022).

Z hlediska výskytu onemocnění můžeme sledovat takzvaný geografický gradient, kde se prevalence roztroušené sklerózy zvyšuje se vzdáleností od rovníku. Avšak i toto má své výjimky a neplatí úplně. Nejvyšší prevalence je v oblastech Severní Ameriky a Evropy, nejmenší zase v oblastech sub-Saharské Afriky a východní Asie. Nejvyšší prevalence roztroušené sklerózy je v severních oblastech USA, v Kanadě a v severní Evropě a činí až 220/100 000 obyvatel. Na druhou stranu nejnižší prevalence je v oblastech Latinské Ameriky, Afriky a Asie, kolem 5-30/100 000 obyvatel. U některých populací jako například Aboriginci, Maoři a Inuiti se roztroušená skleróza téměř nevyskytuje. V České republice je prevalence roztroušené sklerózy vysoká, kolem 160/100 000 obyvatel. Studován byl taky efekt migrace na prevalenci roztroušené sklerózy. Bylo zjištěno, že důležitou roli hraje věk, ve kterém se daná osoba přestěhovala. V případě, že k přesunu došlo před 15. rokem života, tak si jedinec přisvojí riziko země, do které se přestěhoval, a v případě, že ke stěhování dojde po 15. roce života, přináší si pacient riziko ze země, kde před tím žil (Cabre et al., 2005).

Celosvětovým problémem však zůstává neustále se zvyšující prevalence i incidence této nemoci. V 80. letech v České republice byla prevalence roztroušené sklerózy kolem 71/100 000 obyvatel, zatím co v současné době je to kolem 160/100 000 obyvatel. Tento trend je pozorován celosvětově a má za následek vyšší socioekonomické náklady i zátěž pro stávající centra, pečující o pacienty s demyelinizačními onemocněními (Walton et al., 2020; Vachová 2012). V České republice zabezpečuje péči o pacienty s roztroušenou sklerózou celkem 15 specializovaných center – 4 v Praze, 2 v Brně, dále v Českých Budějovicích, v Hradci Králové, v Jihlavě, v Olomouci, v Ostravě, v Pardubicích, v Plzni, v Teplicích a v Zlíně.

1.1.3 Patofyziologie roztroušené sklerózy

Patofyziologie roztroušené sklerózy je velice komplexní multicelulární proces, který se vyvíjí v průběhu nemoci. Sestává z několika základních mechanismů, kterými jsou autoimunitní zánět, proces demyelinizace a remyelinizace, reaktivní glióza a neuroaxonální degenerace. U jednotlivých pacientů jsou tyto složky zastoupeny různě. V počátcích onemocnění převládá spíše

zánětlivé/demyelinizační postižení CNS nad axonálním/neurodegenerativním, které převládá v pozdějších stádiích nemoci. I když axonální neurodegenerace převládá v pozdějších stádiích, neznamená to, že není přítomna i v počátcích onemocnění.

1.1.3.1 Zánětlivé procesy

V případě relabující-remitentní formy roztroušené sklerózy jsou relapsy spojené s přítomností zánětlivých demyelinizačních lézí, které vznikají na podkladě infiltrace periferních imunitních buněk přes hemato-encefalickou bariéru do CNS. Tato infiltrace představuje hlavní rys v počátečních stádiích roztroušené sklerózy. Zpočátku přecházejí přes hematoencefalickou bariéru makrofágy, které jsou následovány T lymfocyty, ve větším množství CD8⁺ a v menším CD4⁺ T lymfocyty. Předpokládá se, že jejich hlavním cílem jsou antigeny odvozené od myelinového bazického proteinu. Po přechodu přes hemato-encefalickou bariéru dochází k aktivaci CD4⁺ T lymfocytů pomocí antigen prezentujících buněk. Po aktivaci dochází k zánětlivé reakci, která podporuje infiltraci CNS monocyty a též podporuje aktivaci dalších CD4⁺ T lymfocytů. Tím prohlubuje zánětlivou reakci. Po T lymfocytech přecházejí hemato-encefalickou bariérou i B lymfocyty a plazmocyty. B lymfocyty u roztroušené sklerózy můžeme nalézt v meningách, parenchymu i v mozkomíšním moku, kde produkují specifické autoprotiátky, které mohou být detekovány z mozkomíšního moku a hrají důležitou roli v diagnóze nemoci. Množství plazmocytů, které tvoří protiátky, stoupá s věkem pacienta (Frisher et al., 2009). U pacientů se sekundárně progresivní roztroušenou sklerózou dochází vzhledem k dlouhodobému zánětu k tvorbě takzvaných terciárních lymfoidních struktur, což jsou agregáty folikulární dendritických buněk, T lymfocytů, B lymfocytů a plazmocytů (Howell et al., 2011). V případě primárně progresivní roztroušené sklerózy nedochází k tvorbě těchto struktur, ale je pro ni typická difúzní infiltrace mening (Choi et al., 2012). Kromě infiltrace imunitních buněk do CNS, dochází i k poruše funkcí regulačních buněk a tím i celkové dysregulaci mezi regulačními a efektorovými buňkami a dalšími procesy. Objevují se autoreaktivní imunitní buňky, které jsou schopné poškozovat CNS. Vzniká

poškození myelinu a oligodendrocytů a rozvoj demyelinizačních lézí, které jsou patrné na magnetické rezonanci (Denrou et al., 2015).

1.1.3.2 Axonální neurodegenerace

Proces neurodegenerace, doposud ne plně pochopen, byl kdysi považován za dominantu pozdějších stádií roztroušené sklerózy, avšak jak se v posledních letech zjistilo, tomu tak není. Díky dostupné terapii jsme schopni redukovat množství relapsů, avšak i tak nedochází ke zlepšení dlouhodobé progrese nemoci. To lze vysvětlit již od počátku nemoci chronickým neurodegenerativním procesem, který probíhá i při absenci infiltrace CNS imunitními buňkami z periferie, která pohasíná nejspíše z důvodu vyčerpání chronickým prezentováním antigenů (Wherry 2011). Příčiny neurodegenerace u roztroušené sklerózy jsou nejspíše důsledkem většího množství procesů jako například oxidačního stresu, deficitu energie, iontové dysbalance, selhání neuroprotektivních a regeneračních mechanismů aj. Tyto procesy akcentuje i probíhající chronický zánět, který významně narušuje homeostázu buněk CNS. Jde například o astrocyty a mikroglie, které mohou při poškození produkovat i značné množství neurotoxických a prozánětlivých mediátorů. Tyto mediátory podporují a udržují neurodegenerativní poškození axonů (Frieze et al., 2014). Dalším možným procesem může být i neadekvátní aktivace mikroglie v oblasti poškozených axonů, která může dokonce být jádrem při formaci nové léze (Kolasinski et al., 2012). V zdravém mozku je fagocytární aktivita mikroglie blokována kontinuálně exprimovanými inhibitory zdravých neuronů, která je však při poškození axonů nedostatečná. Další možný podíl na rozvoj a udržování neurodegenerace má neadekvátní neuroprotektivní reakce mikroglie, která také podílí na rozvoji primární neurodegenerace u jiných onemocnění jako například u Alzheimerovy nemoci (Heneka et al., 2014). Pokud mikroglie zůstanou bez kontroly, mohou způsobovat další poškození buněk a tím podporovat cyklus axonální neurodegenerace (Zephir 2018).

1.1.3.3 Remyelinizace

Remyelinizace znamená spontánní reparační proces CNS, při kterém dochází k vytváření nových vrstev myelinu kolem demyelinizovaného axonu, u něhož dochází k jeho strukturální reparaci i návratu jeho kondukčních schopností (Smith et al., 1979). Hlavní roli mají oligodendrocyty, ale původ oligodendrocytů podílejících se na remyelinizaci byl kontroverzní a vedl k vytvoření dvou hlavních hypotéz. První předpokládala, že se na remyelinizaci podílejí přeživší oligodendrocyty z poškozené. Druhá hypotéza tvrdila, že se jedná o nové oligodendrocyty, které vznikly z oligodendrocytových progenitorových buněk. Nyní se předpokládá, že oligodendrocyty tvořící nový myelin v demyelinizačních lézích, pocházejí z oligodendrocytových progenitorových buněk. Ty tvoří přibližně 3 – 9 % populace buněk CNS u dospělých (Polito et al., 2005). Samotná remyelinizace probíhá ve dvou fázích. První fáze se nazývá fáze rekrutace, při které dochází k proliferaci oligodendrocytových progenitorových buněk s cílem obsadit demyelinizovanou oblast. V druhé fázi tyto nezralé oligodendrocyty putují na místo demyelinizace a přicházejí do kontaktu s axonem, což vede k jejich zrání a následnému zahájení tvorby funkčního myelinu. Tento proces však probíhá v normálním zdravém prostředí, na rozdíl od roztroušené sklerózy, kde rovněž působí makrofágy a T lymfocyty. Pro úspěšný proces remyelinizace musí správně fungovat signální molekuly – nejprve ty, které podporují proliferaci progenitorových buněk a pak ty, které podporují dozrávání oligodendrocytů (Franklin, 2002).

Průběh a rozsah průběhu remyelinizace u roztroušené sklerózy je značně variabilní. Záleží na mnoha faktorech, například na fázi progresu léze, ale také na množství přítomných oligodendrocytů a makrofágů v lézi (Lucchinetti et al., 1999). Remyelinizace může probíhat rychle s tvorbou tenkých vrstev myelinu nebo probíhá současně s infiltrací tkání makrofágy. Ve vzácných případech se objevuje i současná demyelinizace právě remyelinizovaných axonů (Prineaset et al., 1993). U chronických lézí pacientů s dlouhodobě trvající nemocí bývá remyelinizace minimální. Podobně tomu bývá i u pacientů s primárně progresivní roztroušenou sklerózou (Lassmann et al., 1997; Chari et al., 2007).

1.1.4 Diagnostika roztroušené sklerózy

Diagnóza roztroušené skleróze je postavená na kombinaci objektivního klinického nález, nálezu na magnetické rezonanci mozku a míchy a na výsledku analýzy mozkomíšního moku. Jako další pomocné diagnostické metody se používají evokované potenciály. Pro diagnózu roztroušené sklerózy byla v roce 2001 vytvořena klinická, radiologická a laboratorní diagnostická McDonaldova kritéria, která byla v roce 2017 revidována (Thompson et al., 2018).

1.1.4.1 Klinické příznaky roztroušené sklerózy

Základní charakteristikou roztroušené sklerózy jsou demyelinizační léze CNS, zahrnující léze optického nervu, supratentoriální léze, infratentoriální léze (léze mozkového kmene a mozečku) a spinální léze. Z toho vyplývají různorodé klinické příznaky, kterými mohou pacienti trpět. Klinická manifestace onemocnění záleží na oblasti mozku nebo míchy, kterou ataka postihla. Některé oblasti CNS bývají postižené častěji než jiné, proto se některé příznaky manifestují více než jiné.

Nejčastější prvním příznakem roztroušené sklerózy bývá jednostranná optická neuritida, která se projevuje postupným zhoršováním zraku, spojeným s bolestmi za okem a při pohybu bulbem. Maximum obtíží bývá do 2 týdnů a ani při brzké terapii nemusí dojít k úplnému odeznění obtíží. Dalším obzvláště častým projevem bývají pozitivní či negativní senzitivní příznaky (parestezie, dysestezie nebo hypostezie). Při postižení míchy se k senzitivním příznakům přidružují i motorické příznaky. Jejich rozsah a závažnost záleží na velikosti a umístění léze. Může se jednat o monoparetické, hemiparetické, paraparetické anebo kvadraparetické postižení. Typické jsou příznaky postižení centrálního motoneuronu – svalový hypertonus, hypereflexie, pyramidové jevy iritační. V případě lézí v oblasti krční míchy se objevuje Lhermitteův příznak, u kterého dochází po flexi krku k rozvoji bolestí charakteru elektrického výboje, jež se šíří od šíje podél páteře až do končetin. U lézí v oblasti hrudní páteře jsou typické dysestezie, kdy si pacient stěžuje na pocit svíravé obruče kolem hrudníku nebo břicha (tzv. „MS hug“ příznak). Specifickým postižením míchy jsou obtíže s mikcí, například močová retence, časté nucení na močení, obtíže s defekací a sexuální dysfunkce.

Při lézích v oblasti mozkového kmene jsou častými příznaky diplopie, vertigo a závratě, dysartrie, faciální paréza anebo postižení senzitivní inervace v oblasti tváře. Typickým nálezem je porucha okulomotoriky až internukleární paréza, kdy dochází k postižení fasciculus longitudinalis medialis. To se projevuje parézou m. rectus medialis na addukujícím oku a nystagmem abdukujícího oka. Pohled ke straně léze zůstává neporušený. Ve většině případů se příznaky rozvíjejí postupně v průběhu několika dnů. Považujeme je za *ataku onemocnění* u relabujících-remitentní formy, pokud trvají alespoň 24 hodin, a to bez přítomnosti infekčního onemocnění nebo febrilií. U primárně progresivní formy se symptomy musejí postupně rozvíjet a zhoršovat v období alespoň 12 měsíců (Ford 2020). Na hodnocení celkové klinického stavu se u pacientů s roztroušenou sklerózou využívá „Functional Systems Scores (FSS)“ a „Expanded Disability Status Scale (EDSS)“. FSS hodnotí 7 funkčních systémů (pyramidové, mozečkové, senzitivní, kmenové, vegetativní, zrakové, mentální funkce) a další funkce spolu s chůzí. Výsledný skór se interpretuje do hodnoty EDSS, která je v rozsahu od 0 (normální neurologicky nález) až po 10 (smrt kvůli roztroušené skleróze) (Kurtzke 1983).

1.1.4.2 Magnetická rezonance u roztroušené sklerózy

Magnetická rezonance (MR) mozku a míchy je důležitou vyšetřovací metodou pro stanovení nebo vyloučení diagnózy roztroušené sklerózy. Po svém uvedení v roce 1980 způsobila revoluci v diagnóze a léčbě roztroušené sklerózy, tím že umožnila vizualizaci lézí a jejich aktivitu. V současnosti představuje magnetická rezonance nenahraditelnou součást dlouhodobého sledování vývoje této nemoci.

Při podezření na roztroušenou sklerózu se nejčastěji využívají T2 vážené sekvence a FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) sekvence. T2 vážené snímky zobrazují vodu, a tudíž i likvor hypersignálně, bílou hmotu hyposignálně a šedou hmotu hypersignálně, zatímco jejich upravená verze FLAIR potlačí signál vody a tím zobrazuje likvor hyposignálně. T2 vážené sekvence se především využívají k zobrazení ložisek s větším obsahem vody a FLAIR sekvence k zobrazení periventrikulárních ložisek.

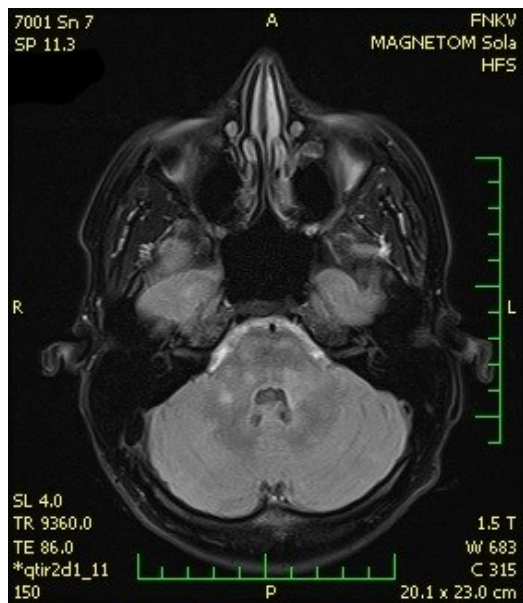
Typickým nálezem pro roztroušenou sklerózu je nález hypersignálních lézí, patrných na T2 vážených snímcích v oblastech periventrikulárně, kortikálně nebo juxtakortikálně, infratentoriálně nebo v míše (obr. 1-3). Dalším typickým nálezem u roztroušené sklerózy může být nález hypersignální léze v retrobulbární části nervus opticus odpovídající retrobulbární neuritidě (obr. 4). Pomocí intravenózně podané kontrastní látky, kterou tvoří gadolinium, dokážeme identifikovat metabolicky aktivní léze. Magnetická rezonance je schopná hodnotit diseminaci lézí v prostoru a v čase. Pod pojmem *diseminace v prostoru* se rozumí přítomnost T2 vážených hypersignálních lézí v alespoň 2 ze 4 typických, výše zmíněných, oblastí pro roztroušenou sklerózu. *Diseminace v čase* znamená simultánní přítomnost gadolinium-sytících se a nesytlících se ložisek nebo přítomnost nových gadolinium-sytících se ložisek na kontrolních MR zobrazeních (Ford 2020).

Další důležitou funkcí magnetické rezonance v rámci roztroušené sklerózy je hodnocení atrofie mozku a míchy, která představuje vysoce relevantní nález obzvláště v pozdějších stádiích roztroušené sklerózy.

I když má magnetická rezonance vysokou senzitivitu, její velká nevýhoda je nedostatek specifity pro roztroušenou sklerózu a je také limitována v metrikách potřebných pro klinickou validaci a prognózu onemocnění.



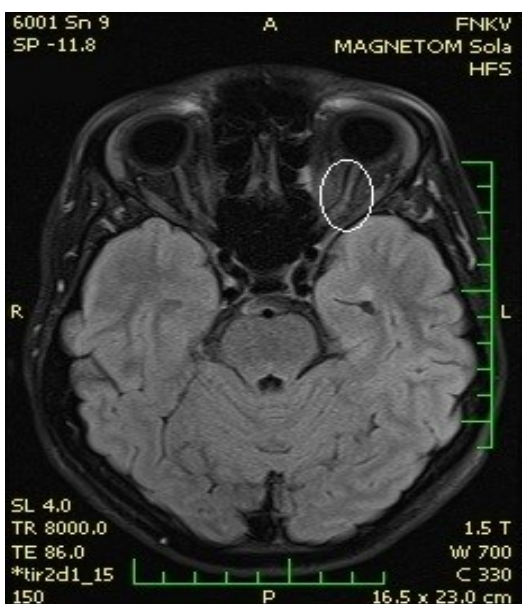
Obr. 1. MR vyšetření mozku s T2 hypersignálními ložisky bílé hmoty periventrikulárně juxtakortikálně



Obr. 2: MR vyšetření mozku s T2 hypersignálními ložisky infra-tentoriálně v oblasti mozkového kmene a mozečku



Obr. 3. MR vyšetření krční páteře s T2 hypersignálními ložisky v oblasti míchy



Obr. 4. MR vyšetření mozku se zvýšeným signálem n. opticus vlevo v oblasti hrotu orbity, odpovídající optické neuritidě vlevo

1.1.4.3 Biochemická analýza likvoru

Biochemická analýza mozkomíšního moku neboli likvoru představuje další důležitou metodu využívanou v diagnóze roztroušené sklerózy, zejména v případech, kdy nejsou klinické nálezy či nálezy na magnetické rezonanci dostatečně přesvědčivé. Základní biochemický a cytologický nálezy v likvoru bývá u roztroušené sklerózy normální. Je-li přítomná výrazná proteinorachie nebo pleiocytóza může se jednat o jiné onemocnění. Pro roztroušenou sklerózu je klíčový nálezy intratekální syntézy imunoglobulinů a průkaz oligoklonálních pásov.

Intratekální syntéza imunoglobulinu (především imunoglobulinu G) svědčí o přítomnosti imunitních buněk produkujících imunoglobuliny v rámci CNS. To ji řadí k důležitým, i když nespecifickým markerům roztroušené sklerózy.

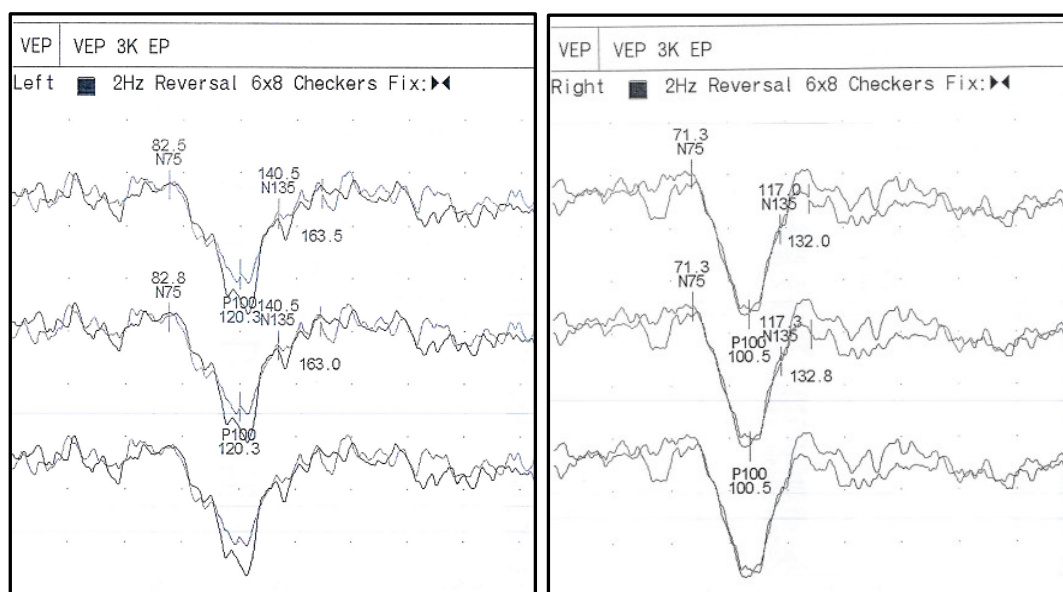
Oligoklonální pásy se vyšetřují z mozkomíšního moku pomocí izoelektrické fokusace a pomáhají stanovit oligoklonální imunoglobuliny přítomné pouze v likvoru, a ne v séru. Velmi důležité jsou v diagnóze roztroušené sklerózy oligoklonální pásy IgG a IgM, avšak stanovují se také oligoklonální pásy lehkých řetězců kappa a lambda. Dříve se předpokládalo, že se jedná o specifické protilátky pro roztroušenou sklerózu, ale pozdější studie zjistily, že se jedná o protilátky proti rozpadovým produktům v rámci demyelinizace a neurodegenerace (Winger et al., 2016).

1.1.4.4 Evokované potenciály

Multimodální evokované potenciály představují specifickou neurofyziologickou vyšetřovací metodu, která měří propagaci signálu, sumaci elektrické aktivity a centrální synapse specifických nervových drah CNS. Jednotlivé typy evokovaných (vyvolaných) potenciálů rozdílných modalit vznikají na základě různých stimulů. V neurologické praxi se využívají čtyři základní typy neboli modalit evokovaných potenciálů, a to zrakové (vizuální) evokované potenciály, kmenové sluchové evokované potenciály, somatosenzorické a motorické evokované potenciály. Před zavedením magnetické rezonance do běžné klinické praxe měly evokované potenciály důležitou roli v diagnóze roztroušené sklerózy. Demyelinizace je charakterizována prodloužením latencí centrálních

odpovědi evokovaných potenciálů a prodloužením centrálního kondukčního času se zachovanými normálními amplitudami. Dnes se využívají jako pomocné vyšetřovací metody v diagnostickém procesu při nespecifických nálezech (Poser et al., 1983). V posledních letech bylo publikováno několik studií, které hodnotí prognostický potenciál jednotlivých evokovaných potenciálů (Hardmeier et al., 2021; Hardmeier et al., 2017).

Zrakové evokované potenciály (VEP) vznikají na podkladě vizuální stimulace a hodnotí vodivost zrakovými dráhami. Jsou důležité při stanovení diagnózy optické neuritidy (obr. 5), což je častý prvotní projev roztroušené sklerózy (Štětkářová et Židó, 2022). Vyšetření VEP má významně vysokou senzitivitu (kolem 90 %) a vysokou specificitu (kolem 85 %) pro optickou neuritidu (Halliday et al., 1977).

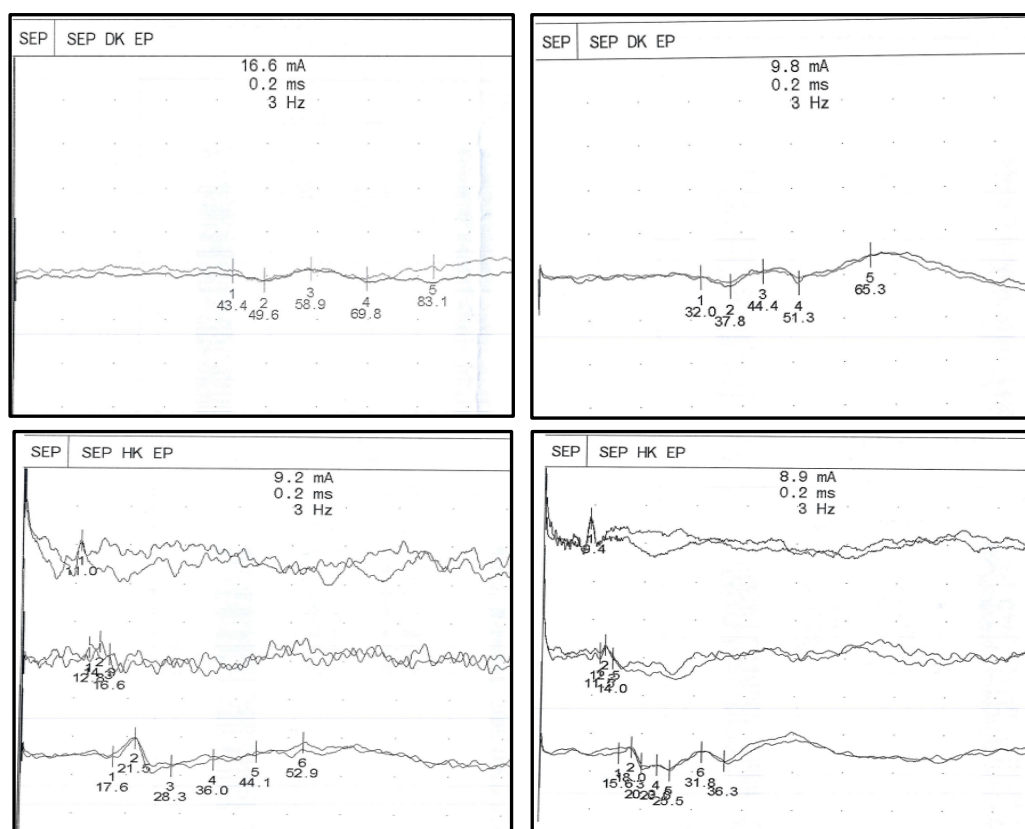


Obr. 5. Zrakové evokované potenciály (VEP), stimulace „pattern reversal“, snímání z registračních elektrod O1-Fz, Oz-Fz a O2-Fz (shora dolů). Vlevo je výrazně abnormální nález VEP při vyšetření levého oka s prodloužením latence vlny P 100 na 120,3 ms u pacienta s RS. Nález svědčí pro postižení zrakové dráhy vlevo v prechiasmatickém úseku. Vpravo je normální nález VEP při stimulaci pravého oka (latence P100 je 100,5 ms) u zdravé kontroly.

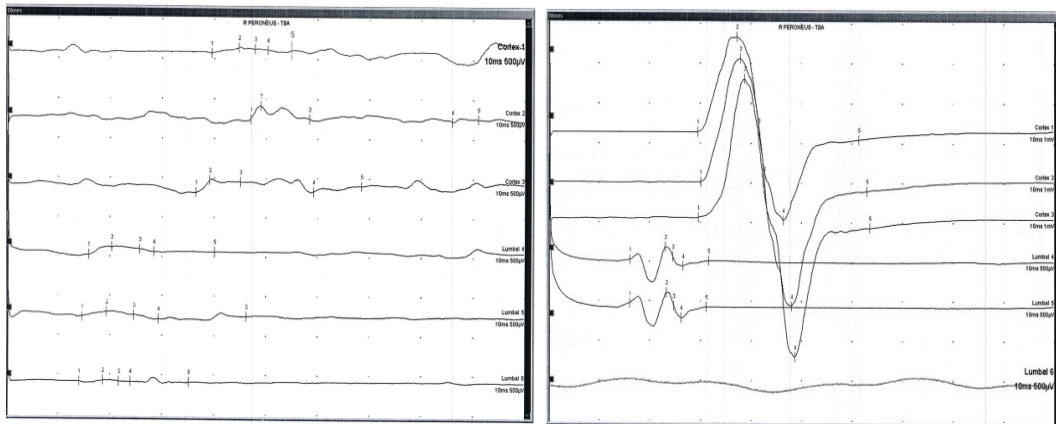
Kmenové sluchové evokované potenciály (BAEP) hodnotí vodivost signálu v mozgovém kmene. Diagnostikují léze mozkového kmene, ale v klinické praxi se již u roztroušené sklerózy využívají minimálně (Robinson et al., 1977).

Somatosenzorické evokované potenciály (SEP) hodnotí vodivost somatosenzorickými dráhami (obr. 6).

Motorické evokované potenciály (MEP) vyšetřují průchod signálu pyramidovými dráhami (obr. 7). Tyto modalitty pomáhají identifikovat a lokalizovat poškození výše zmíněných drah a sledovat jejich vývoj v čase (Baker et al., 1968; Hess et al., 1986).



Obr. 6. Somatosenzorické evokované potenciály (SEP), snímání z registračních elektrod Cz-Fz pro dolní končetiny i horní končetiny. Vlevo (horní obrázek) je výrazně abnormální nález SEP při vyšetření kortikální odpovědi při stimulaci n. tibialis s prodloužením latence vlny P 40 na 49,6 ms. Dolní obrázek ukazuje SEP n. medianus s prodloužením latence vlny N20 na 21,5 ms. Nález svědčí pro postižení somatosenzorické dráhy vlevo v centrálním úseku u pacienta s RS. Vpravo je normální nález SEP (latence P 40 je 37,8 ms, latence N 20 je 18,0 ms) u zdravé kontroly.



Obr. 7. Motorické evokované potenciály (MEP), snímání z m. tibialis anterior. Vlevo je výrazně abnormální nálezn MEP kortikální odpovědi při snímání z dolní končetiny s prodloužením latence na 46,4 ms (horní 3 křivky). Nález svědčí pro postižení pyramidové dráhy vlevo v centrálním úseku u pacienta s RS. Vpravo je normální nálezn MEP (latence kortikální odpovědi je 28,9 ms) u zdravé kontroly.

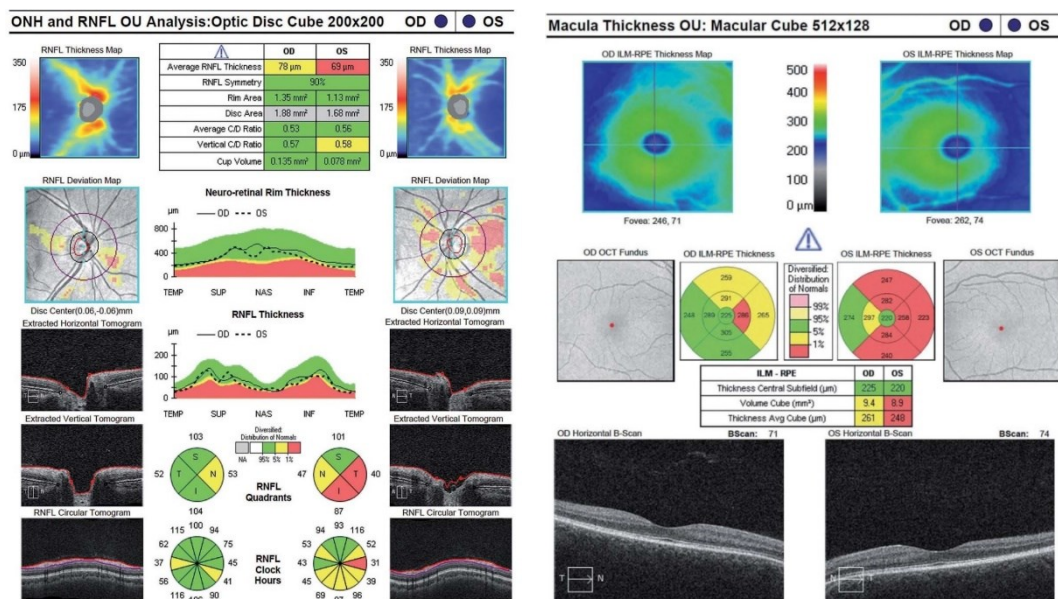
1.1.4.5 Optická koherentní tomografie

Optická koherentní tomografie (OCT) je neinvazivní diagnostická metoda, která umožňuje zobrazení tkání, jako například tkání sítnice, a jejich transverzálního průřezu ve vysokém rozlišení a tím zhodnotit jejich poškození. Tato metoda se běžně využívá v oboru oftalmologie (obr. 8).

U pacientů s roztroušenou sklerózou je důležitým sledovaným parametrem tloušťka vrstvy nervových vláken sítnice (retinal nerve fibre layer – RNFL). Po snímání je tloušťka RNFL převedena do formy linie na barevně kódovaném pozadí, které znázorňuje normu pro daný věk a pohlaví pacienta. Hodnocení je následně prováděno v jednotlivých segmentech (12 segmentů, každý po 15 stupních) nebo ve 4 základních kvadrantech kružnice (superior, nasal, inferior, temporal). Dalším důležitým parametrem je celkový objem makuly (Total Macular Volume – TMV). Jde o trojrozměrný obraz makuly tvořený sérií vertikálních nebo horizontálních

řezů, který nás nepřímo informuje o ztrátě gangliových buněk, případně i o ztrátě dalších vrstev sítnice.

OCT dokáže zobrazit následky zánětu optického nervu a také difuzní neurodegenerativní změny nervové tkáně typické pro roztroušenou sklerózu. OCT se pravidelně vyšetřuje u pacientů s optickou neuritidou, která je jednou z nejčastějších prvních příznaků roztroušené sklerózy, ale může se vyskytovat také u jiných demyelinizačních onemocnění jako například u onemocnění širšího spektra neuromyelitis optica (NMOSD). V posledních letech se OCT začala pravidelně využívat u roztroušené sklerózy k hodnocení difuzní neurodegenerace, protože retina představuje jediné místo, kde může být přímo neinvazivně zobrazená vrstva, která je tvořena pouze axony (Petzold et al., 2010).



Obr. 8. Optická koherentní tomografie (OCT) s vyšetřením tloušťky vrstvy nervových vláken sítnice (RNFL) (obrázek vpravo) a celkového objemu makuly (TMV) (obrázek vlevo) s patologickým nálezem na levém oku odpovídající retrobulbární neuritidě (Zdroj: Matušková et al., 2016)

1.1.5 Léčba roztroušené sklerózy

Roztroušená skleróza je nevléčitelná nemoc, ale pomocí specifické terapie lze ovlivnit její průběh. Léčba této nemoci je dlouhodobá a finančně velice

nákladná. V České republice ji po splnění stanovených podmínek plně hradí základní zdravotní pojištění. Současná léčba spočívá v několika základních strategiích. Jde o cílenou akutní léčbu relapsů, symptomatickou terapii a redukci aktivity nemoci pomocí léků modifikujících onemocnění, tzv. „disease-modifying drugs (DMD)“ (Hauser et al., 2020).

1.1.5.1 Akutní terapie atak

Pod pojmem „*ataka*“ (exacerbace, relaps) se u roztroušené sklerózy rozumí nově vzniklé neurologické příznaky nebo zhoršení stávajících neurologických příznaků, trvajících minimálně 24 hodin, bez přítomnosti infekce nebo febrilií. V případě, že ke zhoršení obtíží dochází při febriliích nebo při infekční nemoci, jedná se o tzv. pseudo-ataku/relaps (Berkovich et al., 2016). Před zahájením jakékoliv terapie je nutné se nejprve přesvědčit, zda se opravdu jedná o ataku a zda splňuje výše uvedené podmínky. Proto provádíme laboratorní vyšetření krve k vyloučení akutně probíhající infekce se stanovením CRP a hladiny leukocytů v krvi.

První volbou v léčbě akutních atak je podání vysokých dávek kortikoidů, které relativně rychle snižují závažnost a trvání ataky. Zahajuje se intravenózním podáním 1g methylprednisolonu denně v období 3 až 5 dnů (celkem 3-5 g) s následným postupně klesajícím taperem perorálního methylprednisolonu nebo prednisonu (Sellebjerg et al., 2005). Tato terapie je většinou doprovázená podáváním inhibitorů protonové pumpy a substitucí kaliumu jako prevence některých nežádoucích účinků kortikoidů.

Druhou linií léčby ataky, pokud nezabírá na terapii kortikoidů, tvoří série výměnných plazmaferéz nebo intravenózní podání imunoglobulinů G (IVIG). Plazmaferézy jsou prováděny ob den, většinou se podává 3 až 7 plazmaferéz (Llufriu et al., 2009). Intravenózní imunoglobuliny G se využívají hlavně u kortikorezistentních atak. Doporučená dávka je 0,4g/kg/den po dobu 5 dní nebo 1g/kg/den po dobu 2 dní (Sorensen et al., 2003).

1.1.5.2 Symptomatická terapie roztroušené sklerózy

Symptomatická terapie je velice variabilní a záleží na obtížích jednotlivých pacientů. Obecně se doporučuje u všech pacientů podporovat zdravý životní styl, zejména zdravé stravování, pravidelnou fyzickou aktivitu a péči i o své psychické zdraví, což zlepšuje celkový vývoj nemoci. Dobrým příkladem symptomatické terapie je substituce deficitu vitamínu D, který je považován za rizikový faktor rozvoje roztroušené sklerózy. Dalšími příklady symptomatické terapie jsou například léčba deprese, únavy, spasticity, neuropatické bolesti či dysestezií.

Deprese představují častou přidruženou nemoc pacientů s roztroušenou sklerózou. Její výskyt je u pacientů s roztroušenou sklerózou až 3x častější než v běžné populaci a její výskyt není vázán na jednotlivé ataky. Z terapeutického hlediska je důležité brzké zavedení antidepressivní medikace v kombinaci se psychoterapií. Za první volbu se považují antidepressiva ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), například citalopram a escitalopram.

Chronická únava představuje další velice častý doprovodný příznak u pacientů s roztroušenou sklerózou, který dokáže významně snížit kvalitu života. Její terapie je převážně režimová – úprava denních aktivit, plánování dostatečného odpočinku, aerobní aktivita a jiné. Z farmakologického hlediska se využívá pouze terapie amantadinem, avšak účinnost je poměrně nízká.

Spasticita je další doprovodný příznak pacientů s roztroušenou sklerózou obzvláště v pozdějších stádiích nemoci. Léčebné možnosti tohoto příznaku jsou značně rozsáhlé a závisejí na tíži spasticity. Terapeutické možnosti zahrnují režimová opatření a rehabilitaci, perorální baklofen, lokální aplikaci botulotoxinu až po léčbu intratekálním baklofenem.

Dalším významným příznakem roztroušené sklerózy jsou *neuropatické bolesti* s dysesteziemi a paresteziemi. V léčbě *muskuloskeletální bolesti* postačují neopioidní a opioidní analgetika nebo jejich kombinace. Pro terapii neuropatické bolesti se využívají léky ze skupiny protizáchvatových léčiv (gabapentin a pregabalin) (Štětkářová et al., 2021).

1.1.5.3 Chronická „DMD“ terapie roztroušené sklerózy

Dlouhodobá chronická terapie u roztroušené sklerózy je založená na „disease-modifying drugs“. DMD jsou léky modulující nebo suprimující imunitní procesy organismu. Celkově podporují protizánětlivé procesy a tím snižují počet relapsů, redukuje počet lézí na MR, stabilizují a oddalují disabilitu pacientů. Účinek jednotlivých léků je rozdílný. Často se také vyskytují různé nežádoucí účinky a jsou přítomné i různé kontraindikace, proto je využíván individuální přístup při rozhodování o terapii.

V České republice se DMD terapie dělí do dvou hlavních skupin – na léčbu 1. linie a 2. linie (eskalační léčbu) a doporučení pro jejich indikaci a volbu byly vydány v roce 2020 kolektivem autorů (Havrdová et al 2020). V současné době se připravuje další revize těchto doporučení. Mezi léky 1. linie řadíme skupinu interferonu beta 1A, glatiramer acetát, teriflunomid, dimethyl fumarát, ponesimod a ozanimod. K lékům 2. linie řadíme okrelizumab, natalizumab, ofatumumab, fingolimod, alemtuzumab, kladribin a další. Samostatnou skupinu představuje terapie progresivních fází roztroušené sklerózy – v léčbě primárně progresivní formy se využívá okrelizumab a v léčbě sekundárně progresivní formy se známky aktivity nemoci se využívá siponimod. Indikační kritéria k zahájení a změně terapie jsou stanovené Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL). Po splnění těchto kritérií je terapie pacientům plně hrazená. V České republice je tato léčba podávána ve vysoce specializovaných centrech pro roztroušenou sklerózu (Havrdová et al 2020).

1.1.5.3.1 Léky první linie

Interferon beta 1A je jeden z prvních léků schválených k terapii roztroušené sklerózy. Nadále zůstává relativně často využíván jako první lék v injekční formě. Výzkumy prokázaly, že interferon beta snižuje závažnost a množství relapsů přibližně o 30 % ve srovnání s placebem. Jedná se o tělu vlastní, buňkami produkovanou látku, která snižuje celkové množství aktivovaných lymfocytů. Proto klesá i průnik lymfocytů přes hemato-encefalickou bariéru do CNS, snižuje se tvorba toxických látek poškozujících myelin a axony a dochází k aktivaci protizánětlivých procesů v CNS. Hlavním nežádoucím účinkem terapie interferony

je tzv. „flu-like syndrom“. Jedná se o chřipkovité příznaky, febrilie/subfebrilie, zimnici/třesavku, bolesti hlavy/svalů/klobouků, únavu a další, které se rozvíjejí po aplikaci léku. Jejich intenzita se časem snižuje (Kieseier 2011).

Glatiramer acetát představuje další již dlouho zavedený a užívaný lék v injekční formě. Jedná se o acetátovou sůl směsi náhodných polypeptidů sestavených ze čtyř aminokyselin. Tyto aminokyseliny se často vyskytují v myelinu, proto se předpokládá, že glatiramer acetát působí jako náhradní molekula pro imunitní buňky, které se na ní navážou místo myelinu. Imunitní buňky s navázaným glatiramer acetátem ještě působí protizánětlivě a tím tlumí autoimunitní procesy v CNS. Jeho účinnost je podobná interferonu. Nejčastějším nežádoucím účinkem je kožní reakce v místě vpichu, která může přejít v atrofii podkoží nebo v nekrózu (Lalive et al., 2011).

Teriflunomid je často nasazovaným perorálním lékem. Jedná se aktivní metabolit leflunomidu, který se využívá v léčbě revmatoidní artritidy. Teriflunomid zasahuje do procesů tvorby leukocytů reverzibilní blokadou některých mitochondriálních enzymů. Tím dochází k snížení počtu lymfocytů se snížením jejich autoimunitních reakcí. K častým nežádoucím účinkům patří poškození jater. Teriflunomid i po vysazení přetrvává dlouhodobě v organismu, proto není vhodný pro ženy, které plánují těhotenství. S účinností je na tom velice podobně jako interferon a glatiramer acetát (O'Connor et al., 2011).

Dimethyl fumarát je původně odvozen od léku na jiné autoimunitní onemocnění – psoriázu. Tento lék vykazuje protizánětlivé a cytoprotektivní účinky prostřednictvím aktivace na nuclear factor – like 2 (Nrf2) závislých a nezávislých metabolických cest. Výzkumy prokázaly snížení relapsů při léčbě dimethyl fumarátem ve srovnání s placebem přibližně o 50 %. Hlavními nežádoucími účinky mohou být zažívací obtíže nebo návaly s pocity horka a zarudnutí (Gold et al., 2012). Dále je potřeba pravidelně sledovat počty lymfocytů v krvi vzhledem k tomu, že při jejich výrazném poklesu bylo popsáno několik případů progresivní multifokální leukoencefalopatie (blíže vysvětlená v následujícím textu) (Mills et al., 2018).

Ponesimod je další perorálně podávaný lék. Jde o vysoce selektivního funkčního antagonistu sfingosin-1-fosfátového (S1P) receptoru 1. Po vazbě na tyto

receptory způsobí zadržení lymfocytů v lymfatických uzlinách a tím zabrání jejich průniku hematoencefalickou bariérou do CNS. Vzhledem k tomu dochází k poklesu množství lymfocytů v periferní krvi, což představuje významný nežádoucí účinek této terapie (Dumitrescu et al., 2023).

Ozanimod je obdobně jako *ponesimod* perorálně podávaný lék. Rovněž patří do skupiny S1P receptor modulujících léků, avšak v případě *ozanimodu* se jedná o 2. generaci selektivních agonistů S1P receptoru 1 a 5, který působí jako funkční antagonist S1P receptoru 1. Jeho efekt je podobný jako v případě *ponesimodu*, avšak u *ponesimodu* zůstává částečně zachována aktivita S1P receptoru 5. Podobně jako u předešlého léku je lymfocytopenie závažný nežádoucí účinek této terapie, pro který musí být pacient monitorován (Dumitrescu et al., 2023).

1.1.5.3.2 Eskalační terapie

Fingolimod, lék ze skupiny eskalační terapie, je historicky první schválený perorální lék na roztroušenou sklerózu v České republice. *Fingolimod*, spolu s *ponesimodem* a *ozanimodem*, patří do skupiny modulátorů sfingosin-1-fosfátových (S1P) receptorů lymfocytů. *Fingolimod* je neselektivní funkční antagonist S1P receptorů, na rozdíl od výše zmíněných preparátů. Ve studiích bylo prokázáno, že *fingolimod* snižuje riziko relapsů přibližně o 50 % ve srovnání s placebem. Efekt terapie je velice podobný předešlým preparátům, avšak v případě *fingolimodu* je třeba počítat s rizikem tzv. „rebound fenoménu“, kdy po ukončení terapie dojde k náhlému vyplavení velkého množství lymfocytů z lymfatických uzlin do periferie a tím vzniká vysoké riziko rozvoje těžkých klinických relapsů u roztroušené sklerózy (Calabresi et al., 2014).

Natalizumab je dalším představitelem léčiv ze skupiny eskalační terapie. Tato humanizovaná monoklonální protilátka funguje jako inhibitor $\alpha 4\beta 1$ intergrinu. $\alpha 4\beta 1$ integrin je adhezivní molekula na povrchu lymfocytů, která se podílí na přestupu lymfocytů hemato-encefalickou bariérou do CNS. *Natalizumab* nezabraňuje uvolnění lymfocytů do periferie, ale brání pouze jejich přestupu do CNS (Yednock et al., 1992). *Natalizumab* je jeden z nejúčinnějších léků na roztroušenou sklerózu. Ve srovnání s placebem snižuje riziko relapsů o přibližně 60 %. Lék se podává intravenózně v infuzích a bývá velice dobře tolerován.

Existuje však jedna velice závažná komplikace této terapie. Jedná se o *progresivní multifokální leukoencefalopatii* (PML), rozsáhlé progresivní zánětlivé postižení bílé hmoty s výraznou disabilitou a 25 % rizikem úmrtí. PML je způsobená oportunní infekcí John Cunningham virem (JC virus). JC virus, pojmenovaný po pacientovi vyšetřovaném pro PML, u kterého byl virus poprvé prokázán, je lidský polyomavirus 2, který běžně přebývá v gastrointestinálním traktu, avšak může přecházet i přes hemato-encefalickou bariéru. U zdravých lidí tento virus nezpůsobuje zásadní obtíže, avšak u imunosuprimovaných pacientů, například pacientů léčených natalizumabem, může dojít k jeho reaktivaci a vyvolání PML (Ho et al., 2017). Proto se u pacientů na terapii natalizumabem pravidelně kontroluje titr protilátek proti JC viru v séru. V případě vyššího titru protilátek se prodlužují intervaly mezi podávanými dávkami z 1x za 4 týdny na 1x za 6 týdnů. V případě, že je nárůst titru významně rychlý nebo v případě kdy přesáhne určité hranice, je indikována změna terapie vzhledem k vysokému riziku rozvoje PML (Polman et al., 2006).

Okrelizumab je dalším lékem k léčbě roztroušené sklerózy. Bude blíže rozebrán v následující kapitole.

Ofatumumab je dalším představitelem ze skupiny eskalační terapie. Z hlediska efektivity, bezpečnostního profilu a způsobu účinku je ofatumumab velice podobný okrelizumabu. Jedná se plně humanizovanou monoklonální protilátkou proti CD20, která se na rozdíl od ocrelizumabu podává jednou měsíčně formou subkutánní injekce.

Alemtuzumab, v této době již méně často využívaný zástupce ze skupiny eskalační terapie, je monoklonální protilátka proti molekule CD52 nacházející se na povrchu lymfocytů. Po navázání se této protilátky na lymfocyt dochází k jeho zničení. Výzkumy prokázaly, že alemtuzumab snižuje počet relapsů přibližně o 50 % ve srovnání s interferonem beta. Tento lék se podává intravenózně infuzní formou. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří riziko infuzní reakce z rozpadu buněk (řeší se současným podáváním kortikoidů) a riziko rozvoje dalších autoimunitních nemocí (nejčastěji autoimunitní porucha funkce štítné žlázy nebo trombocytopenie) (Havrdova et al., 2015).

Posledním příkladem eskalační DMD terapie je *kladribin*, který se od ostatních léků liší svým specifickým účinkem a dávkovacím schématem. Efekt tohoto léku můžeme rozdělit do dvou fází. V první fázi dochází hlavně v lymfocytech k akumulaci aktivního metabolitu kladribinu, který narušuje metabolismus buněk, inhibuje syntézu a opravu DNA a vede buňky k apoptóze. To způsobí pokles celkového počtu lymfocytů. V druhé fázi dochází k obnovení lymfocytů, což vede k dlouhodobé kvalitativní změně imunitního systému. Kladribin se podává formou perorálních tablet ve dvou pulzech v prvním a druhém roce léčby. Účinnost následně přetrvává další dva roky, kdy pacient již nemusí kladribin užívat. Toto schéma podávání má své výhody u pacientek plánujících těhotenství. Vzhledem k poklesu celkového počtu lymfocytů je vyšší riziko výskytu infekce herpes zoster, což patří k nejčastějším nežádoucím účinkům této terapie (Giovannoni et al., 2010).

1.1.5.3.3 Léčba progresivních fází roztroušené sklerózy

Okrelizumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti CD20 a podává se intravenózně jednou za 6 měsíců. Humanizací protilátky se snížilo riziko nežádoucích účinků tím, že se jedná o tělu podobnou látku. Okrelizumab zasahuje do procesů specifické imunity tím, že se váže na specifické receptory B lymfocytů exprimujících CD20, čímž zahájí jejich proces sebedestrukce. Léčba tímto lékem vede k celkové depleci CD20+ B lymfocytů v organismu, což má za následek redukci prezentace antigenů pro T lymfocyty, modulaci prozánětlivých cytokinů tvořených B lymfocyty a redukci aktivace a diferenciaci plazmablastů. Jedná se o vysoce účinnou léčbu snižující riziko relapsů a progresi invalidity u relabujících-remitentní formy roztroušené sklerózy. Okrelizumab je však první lék, u kterého bylo prokázáno snížení progresivity invalidity i u primárně progresivní formy roztroušené sklerózy, proto představuje v této době první volbu léčby u pacientů s touto formou nemoci. Mezi nežádoucí účinky léku patří hlavně reakce spojené s podáváním infuze, například bolesti hlavy, febrilie, nauzea a zvracení a další. Tyto nežádoucí účinky lze účinně potlačit vhodnou preventivní medikací (antihistaminika, kortikoidy aj.) (Sorensen et al., 2016).

Siponimod je perorální lék ze skupiny léků modulujících S1P receptory. Jedná se o selektivního funkčního antagonistu S1P receptoru 1 a 5. Jeho efekt je podobný jako u ostatních představitelů této lékové skupiny. Navázáním se na specifické receptory na povrchu lymfocytů zabraňuje jejich vyplavení z lymfatických uzlin do periferní krve. Na rozdíl od ostatních preparátů byl u siponimodu prokázán efekt v léčbě sekundárně progresivní formy roztroušené sklerózy s relapsem nebo zánětlivou aktivitou na MR mozku (Kappos et al., 2018).

1.1.5.4 Cíle a strategie léčby roztroušené sklerózy

S narůstající dostupností velkého množství terapeutických možností se mění i dlouhodobé terapeutické cíle u roztroušené sklerózy. V klinické praxi se hlavně využívají tři parametry, které nám napovídají o aktivitě nemoci, a to nález aktivity na MR, množství relapsů a zhoršení disability u pacientů. Hodnocení, která kombinují tyto tři nálezy, byla zavedena za účelem lepšího a komplexnějšího zkoumání dlouhodobých účinků dostupné léčby. Pacienti, kteří v těchto třech doménách neprokazují žádnou aktivitu nemoci, jsou v posledních letech označováni jako pacienti, kteří dosáhli konceptu NEDA-3 („no evident disease activity“). Avšak koncept NEDA-3 neposkytuje úplný obraz aktivity roztroušené sklerózy, neboť nadále může probíhat progresse nemoci, kterou tímto konceptem nelze zachytit. Příkladem je kognitivní deteriorace u pacientů dosahujících NEDA-3. Jeden z návrhů na řešení tohoto nedostatku je k hodnocení tří výše zmíněných domén přidat i měření abnormální ztráty objemu mozku. Toto kombinované hodnocení bývá označováno jako koncept NEDA-4 (Giovannoni et al., 2017; Havrdová et al., 2017).

Z hlediska strategie léčby roztroušené sklerózy jsou aktuálně navržené dvě hlavní strategie. První strategie přistupuje k léčbě roztroušené sklerózy ve smyslu „*treat-to-target*“ nebo jinak řečeno stupňovitá eskalace léčby, která začíná na nižší počáteční účinnosti léčby – LITE („*lower initial treatment efficacy*“), a léky s vyšší účinností ponechává pro průlom v průběhu nemoci. LITE strategie zahajuje terapii pomocí například interferonů, glatiramer acetátu nebo terflunomidu. Následně sleduje odpověď pacienta na léčbu a vývoj jeho stavu a až v případě, kdy dojde k progresi nemoci, přistupuje k změně terapie na léky ze skupiny s vyšší účinností

(natalizumab, okrelizumab, alemtuzumab, fingolimod apod.). Druhá strategie se nazývá HEFT („*high efficacy frontline treatment*“) a přistupuje k léčbě tak, že již od začátku onemocnění indikuje terapii léky s vyšší účinností. V posledních dekádách byla preferována strategie LITE vzhledem k obavám z potenciálně závažných nežádoucích účinků léků ze skupiny preparátů s vyšší účinností, jako například rozvoj progresivní multifokální leukoencefalopatie u léčby natalizumabem, avšak v poslední době studie ukazují na lepší dlouhodobý terapeutický efekt strategie HEFT. Zatím není jasné, která z těchto strategií je pro pacienty z dlouhodobého hlediska výhodná, a to nadále zůstává otázkou i pro probíhající a budoucí klinické studie (Cree et al., 2022).

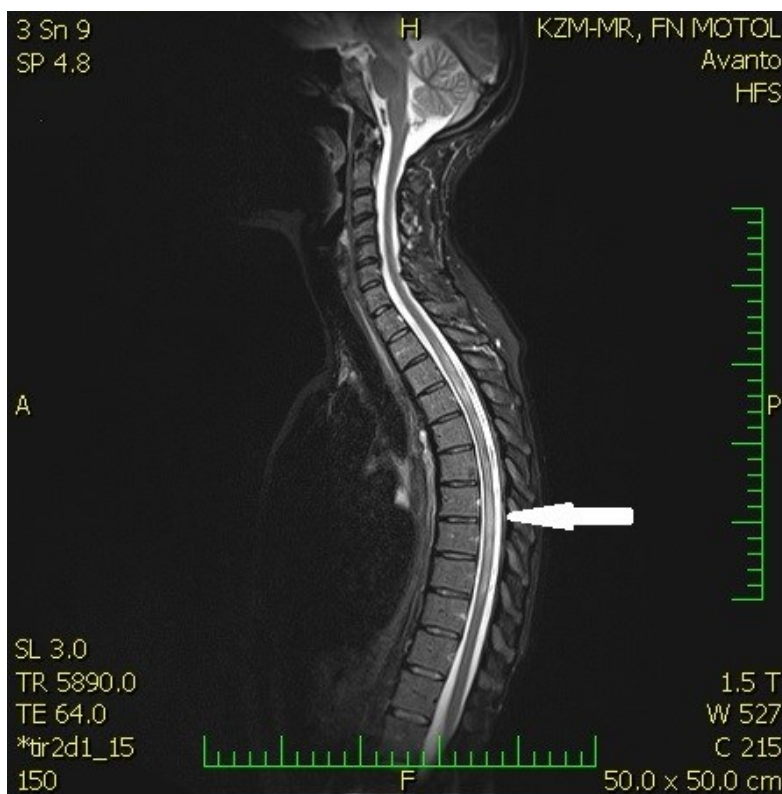
1.1.6 Diferenciální diagnóza demyelinizačních onemocnění CNS

Pod pojmem demyelinizační onemocnění CNS označujeme jakoukoliv nemoc nebo příčinu, která způsobuje poškození myelinové pochvy nervů CNS. V posledních dekádách bylo od roztroušené sklerózy vyčleněno několik samostatných onemocnění (například spektrum onemocnění neuromyelitis optica – NMOSD nebo onemocnění asociované s protilátkami proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu – MOGAD). Tyto nemoci jsou klinicky a někdy i laboratorně velice podobné roztroušené skleróze, avšak mají zcela rozdílnou patofyziologii a často nereagují na typickou „DMD“ terapii jako u roztroušené sklerózy. Proto je důležité tyto nemoci správně diagnostikovat a následně zahájit cílenou terapii.

1.1.6.1 Spektrum onemocnění neuromyelitis optica (NMOSD)

Spektrum onemocnění neuromyelitis optica (NMOSD) je vzácné autoimunitní demyelinizační onemocnění CNS. Pojem neuromyelitis optica byl poprvé popsán v roce 1894 Eugenem Devicem a Fernandem Gaultem (Jarius et al., 2013), avšak až v posledních letech se NMOSD vyčlenilo jako samostatné onemocnění. Na rozdíl od dalších demyelinizačních onemocnění se v případě NMOSD jedná *astrocytopatii*, pro kterou jsou typické protilátky proti aquaporin-4 vodnému kanálu (anti-AQP-4) nacházejícímu se na povrchu astrocytů. Diagnóza

tohoto onemocnění je založena na kombinaci klinického nálezu, nálezu na MR mozku a míchy a na biochemické analýze mozkomíšního moku a séra. Pro NMOSD je typický nález protilátek anti-AQP-4 v séru a v mozkomíšním moku, dále nález bilaterální optické neuritidy a „dlouhé“ myelitidy (longitudinal extensive transversal myelitis – LETM) na MR (obr. 9) (Štětkářová et al., 2024). DMD terapie je v případě NMOSD málo účinná, proto je rozlišení těchto nemocí důležité. K léčbě se využívají kortikoidy, plazmaferéza, azathioprin nebo rituximab. V posledních letech se začínají objevovat nové léčivé přípravky cílené pro léčbu NMOSD (Huda et al., 2019), mezi něž patří ekulizumab, satralizumab a inebilizumab, které jsou již v ČR registrované.



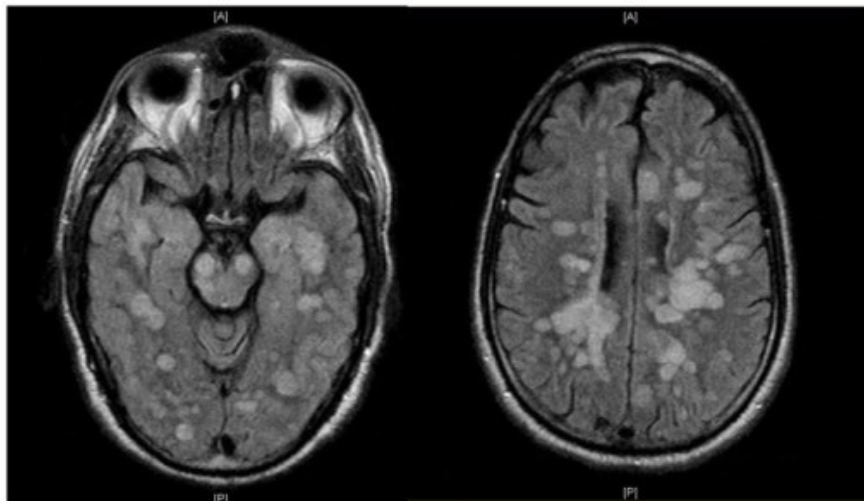
Obr. 9: MR vyšetření krční a hrudní míchy s T2 hypersignálními ložisky odpovídající tranverzální myelitidě v rámci diagnózy NMOSD

1.1.6.2 Nemoc asociovaná s protilátkami proti myelinovovému oligodendrocytárnímu proteinu (MOGAD)

Nemoc asociovaná s protilátkami proti myelinovovému oligodendrocytárnímu proteinu (MOGAD) je nedávno rozpoznané vzácné autoimunitní demyelinizační onemocnění CNS. Léze CNS mají u MOGAD charakter zánětlivé demyelinizace, podobně jako u roztroušené sklerózy, avšak na rozdíl od roztroušené sklerózy je pro MOGAD typická infiltrace makrofágy s MOG a CD4+ T lymfocyty. Klinický obraz MOGAD je podobný jako u NMOSD. Nejčastějšími prvními příznaky tohoto onemocnění jsou bilaterální optická neuritida nebo transversální myelitida. Diagnostika MOGAD je rovněž založená na kombinaci klinického nálezu, nálezu na MR mozku a míchy a na biochemické analýze mozkomíšního moku a séra. Důležitá je přítomnost protilátek proti myelinovému oligodendrocytárnímu proteinu (anti-MOG) v séru a v mozkomíšním moku. Z terapeutického hlediska je současná DMD terapie v případě MOGAD neúčinná. Cílená léčba tohoto onemocnění zatím není dostupná. V léčbě MOGAD se používá běžná imunosupresivní terapie jako například kortikoidy, plazmaferéza, azathioprin nebo rituximab (Marignier et al., 2022).

1.1.6.3 Akutní diseminovaná encefalomyelitida (ADEM)

Akutní diseminovaná encefalomyelitida je autoimunitní zánětlivé onemocnění postihující CNS prostřednictvím rozsáhlé demyelinizace bílé hmoty mozku a míchy. Na rozdíl od ostatních výše zmíněných demyelinizačních onemocnění ADEM postihuje převážně děti a mladistvé a jeho průběh je převážně monofázický, tj. po jedné atace onemocnění odezní, avšak jsou známy i případy rekurentního průběhu této nemoci. Pro ADEM neexistují specifické biomarkery, proto je jeho diagnóza založená na kombinaci klinického a radiologického nálezu (MR mozku a míchy). Na MR mozku můžeme typicky nalézt četné rozsáhlé T2 vážené asymetrické léze bílé hmoty (obr. 10). Typický klinický nálezu u ADEM je kombinací akutní encefalopatie a multifokálních neurologických příznaků. Terapie ADEM spočívá v nespecifické imunosupresivní terapii pomocí kortikoidů nebo plazmaferézou (Tenembaum et al. 2007).



Obr. 10: MR vyšetření mozku s rozsáhlými T2 hypersignálními ložisky odpovídající onemocnění ADEM (zdroj: Rodríguez-Porcel et al., 2006)

1.2 Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok (likvor), je čirá tekutina, nacházející se v CNS. Likvor je tvořen částečně aktivní sekrecí buňkami plexus choroideus a buňkami ependymu mozkových komor (kolem 50 – 70 %) a částečně ultrafiltraci plazmy kapilárami plexus choroideus. Po vytvoření likvor cirkuluje z postranních mozkových komor, přes třetí a čtvrtou komoru do subarachnoidálního prostoru, přesněji mezi obaly mozku, mezi pia mater a arachnoidea mater. Část likvoru také obtéká míchu. Resorpce likvoru probíhá v Pacchioniho granulacích arachnoidálních klků, kde dochází k přestupu mozkomíšního moku do nitrolebečních venózních sinů, čímž vstupuje zpět do cévního systému. Celkový objem likvoru u průměrného dospělého člověka je přibližně 120 až 180 ml a je produkován rychlostí přibližně 500 až 600 ml za 24 h. Celkový objem likvoru se za jeden den vystřídá přibližně celkem tři až čtyřikrát. Rovnováha mezi sekrecí, cirkulací a resorpcí je nesmírně důležitá a v případě její poruchy může dojít až k nevratnému poškození CNS.

1.2.1 Funkce mozkomíšního moku

Mozkomíšní mok sehrává několik důležitých funkcí. Na prvním místě jde o funkci mechanickou. Likvor, obklopující mozek a míchu, chrání před potenciálním

poškozením otřesem, změnami tlaku nebo změnami teploty. Obzvláště důležitá je funkce mozkomíšního moku při změnách tlaku, protože objem intrakraniálního prostoru, tvořený mozkovou tkání, krví a likvorem, je konstantní (Kellie 1824; Mokri 2001). V případě změny intrakraniálního tlaku představuje mozkomíšní mok jakousi první linii obrany, kdy kompenzuje změnu objemu dalších intrakraniálních komponent. Další z funkcí je funkce ochranná, kdy se kromě výše zmíněných mechanismů mozkomíšní mok podílí na ochraně CNS před patogeny prostřednictvím imunitního systému. Dále se podílí na homeostáze udržováním stálého pH, osmolarity a složení iontů. Je zachováno vhodné prostředí pro buňky a jejich správné fungování. Poslední je funkce metabolická, při které mozkomíšní mok zajišťuje buňkám přísun potřebných látek a odvádí odpadové produkty katabolismu.

1.2.2 Laboratorní využití mozkomíšního moku

Mozkomíšní mok složením kvalitativně připomíná plazmu. Část je tvořená ultrafiltrátem plazmy, avšak zásadní rozdíly jsou v kvantitě jednotlivých složek. Důležitou roli ve složení mozkomíšního moku hraje stav hemato-likvorové bariery, která je tvořená epiteliálními buňkami choroidálního plexu, bazální membránou a vrstvou endotelu kapilár pia mater. Jejím hlavním úkolem je omezovat přestup látek z krve do mozkomíšního moku. Při jejím porušení dochází k většímu přestupu zejména proteinů do mozkomíšního moku, ale může taky dojít k přestupu látek z mozkomíšního moku do krve. Ve složení mozkomíšního moku se taky odrážejí zánětlivé procesy CNS. Likvor má významnou roli nejen v diagnostickém procesu roztroušené sklerózy, ale i v diagnostice dalších zánětlivých onemocnění CNS (využití likvoru v diagnostice roztroušené sklerózy je uvedeno v podkapitole 1.1.4.3). Likvor představuje médium k identifikaci potenciálních biomarkerů roztroušené sklerózy, neboť obsahuje méně rozličných proteinů a molekul. Nevyžaduje důslednou úpravu, hlavně precipitace proteinu, jak je tomu například u plazmy. Jeho odběr se provádí lumbální punkcí, což je invazivní výkon, výjimečně zatížený komplikacemi.

1.3 Biomarkery roztroušené sklerózy

V současné době je třeba nalézat nové biomarkery, které by pomohly lépe diagnostikovat roztroušenou sklerózu, předvídat její průběh a účinek léčby. V minulosti byly zkoumané mnohé látky jako potenciální biomarkery roztroušené sklerózy, ale jen několik z nich našlo reálné využití v klinické nebo výzkumné praxi.

Biomarkery můžeme rozdělit do několika skupin. Může se jednat o biomarkery axonálního poškození (lehké řetězce neurofilament, tau protein), biomarkery neuronálního poškození (neuron specifická enoláza), biomarkery gliální dysfunkce (gliální fibrilární acidický protein, oxid dusný), biomarkery demyelinizace (chitináza-3-like-1 prekurzor, myelinový oligodendrocytový protein) a biomarkery imunomodulace a zánětu (imunitní mediátory a cytokiny). Zdrojem nových biomarkerů může být metabolomika (bude rozebrána v další kapitole), mikro-RNA molekuly a střevní mikrobiom.

1.3.1 Lehké řetězce neurofilament

Lehké řetězce neurofilament (NfL) jsou důležité proteinové komponenty neurocytoskeletálních struktur, přítomné zejména v axonech, ale i v ostatních částech neuronů. Při poškození axonů dochází k uvolnění většího množství NfL do mozkomíšního moku, ale malá část (kolem 2 %) přechází i do krevního oběhu (Disanto et al., 2017). Výzkum NfL probíhá již delší dobu a studie již opakovaně prokázaly, že neurofilamenta odrážejí zánětem indukovanou neurodegeneraci u roztroušené sklerózy, ale dokážou i předvídat vývoj onemocnění v následujících letech. Velikou výhodou je, že hladina NfL v mozkomíšním moku přímo koreluje s hladinou NfL v periferní krvi. To je výhodné v klinické praxi, protože odběr krve představuje jen minimálně invazivní výkon na rozdíl od lumbální punkce (Novakova et al., 2017). Nevýhodou NfL je jeho malá specifita, protože zvýšené hladiny NfL neodrážejí jen neurodegeneraci u roztroušené sklerózy, ale neurodegeneraci jakékoliv etiologie. Hladiny NfL nám nepomohou odlišit jednotlivé nemoci. Tím je jejich využití jako prognostického markeru u polymorbidních pacientů limitováno. V současné době probíhá mnoho studií, které zkoumají využití hladin NfL u roztroušené sklerózy (Bittner et al., 2021).

1.3.2 Neuron specifická enoláza

Neuron specifická enoláza (NSE) je glykolytický enzym nacházející se běžně v neuronech a axonech. Při poškození neuronů různé etiologie (traumatické, ischemické, autoimunitní a podobně) byly detekovány zvýšené hladiny tohoto enzymu nejen v mozkomíšním moku, ale i v séru (Nygaard et al., 1998). Dostupné studie však neprokázaly žádnou korelaci nebo ukázaly negativní korelaci mezi hladinami neuron specifické enolázy v plazmě s EDSS či Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (Koch et al., 2007).

1.3.3 Gliální fibrilární acidický protein

Gliální fibrilární acidický protein (GFAP) je protein intermediárních filament, nacházející se běžně v různých buňkách CNS, především v astrocytech. Jeho zvýšené hladiny v likvoru a v plazmě ukazují na poškození astrocytů. V plakách u roztroušené sklerózy byly nalezeny zvýšené hladiny GFAP v mozkomíšním moku (Lucchinetti et al., 1996). Dále byla u RS prokázána asociace vyšších hladin GFAP s větší disabilitou a množstvím relapsů (Petzold et al., 2002).

1.3.4 Myelinový oligodendrocytární protein

Myelinový oligodendrocytární protein (MOG) je glykoprotein, u kterého se předpokládá, že jde protein, nezbytný pro myelinovou pochvu. Plní funkci jakési adhezivní molekuly a tím udržuje integritu myelinové pochvy. Jeho zvýšené hladiny jsou spojené s poškozením myelinu. U onemocnění MOGAD je diagnóza založena právě na přítomnosti protilátek proti MOG.

1.3.5 Prekurzor chitinázy-3-like-1

Prekurzor chitinázy-3-like-1 (CHI3L1) je prekurzor glykoproteinu, tvořeného různými buňkami, který se podílí na aktivaci řady procesů, například na aktivaci vrozené imunity, extracelulární matrix nebo angiogeneze. Zvýšené

hladiny CHI3L1 byly nalezeny v mozkomíšním moku pacientů se zánětlivými onemocněními CNS. Jejich vyšší hladina v séru a v mozkomíšním mozku pozitivně korelovala s délkou trvání nemoci a s vyšším rizikem přechodu pacientů s klinicky izolovaným syndromem do definitivní roztroušené sklerózy (Hinsinger et al., 2015).

1.3.6 Střevo a roztroušená skleróza

V posledních letech několik studií publikovalo data o potenciální roli narušené střevní bariery a střevního mikrobiomu v patofyziologii roztroušené sklerózy. Uvažuje se o možném spouštěči nebo se hovoří o následcích roztroušené sklerózy (Parodi et al., 2021). Otázkou je, zda existuje nějaký biomarker, který by poukázal na bližší vztah mezi narušenou střevní bariérou a možným rozvojem roztroušené sklerózy. V naší nedávné pilotní studii jsme publikovali, že sérové hladiny claudin-3 (CLDN3) – transmembránového proteinu přítomného v těsných buněčných spojeních ve střevní tkáni, byly u pacientů s roztroušenou sklerózou dysregulované a tím by mohly sehrát roli indikátoru poškození střevní permeability. Hodnoty CLDN3 by mohly pomoci určit pacienty s roztroušenou sklerózou, kteří by profitovali z léků modifikujících střevní permeabilitu a mikrofloru (probiotika, prebiotika, synbiotika) (Fialová et al., 2023).

1.4 Metabolomika

Metabolomika je systematická studie, která využívá přístup analytické chemie k profilaci endogenně malých molekul metabolitů přítomných ve zkoumaném preparátu. Metabolomika umožňuje sledovat množství různých metabolitů, které se podílejí na rozdílných buněčných procesech. Metabolity reprezentují konečné produkty metabolických procesů (Patti et al., 2012). Srovnání metabolomických profilů nemocných a zdravých kontrol představuje významnou strategii k pochopení patofyziologie nemoci na molekulární úrovni. Lze tak identifikovat molekuly, které jiné metody přehlédnou. Některé z nich lze použít jako biomarkery účinku léčby a prognózy nemoci. Jsou také prostředkem k pochopení daných patofyziologických procesů.

Metabolomické studie využívají různé analytické strategie. Důležité je, zda se jedná o cílený nebo necílený přístup a jaké nástroje jsou dostupné (Rabinowitz et al., 2011). Cílený přístup znamená zaměření na konkrétní metabolit nebo skupinu metabolitů. Při necíleném přístupu zkoumáme celé dostupné spektrum metabolomu v preparátu. Mezi nejčastěji využívané metody patří metody založené na podkladě nukleární magnetické rezonance a metody využívající hmotnostní spektrometrii (tekutinovou nebo plynovou chromatografií). Využití hmotnostní spektrometrie je v poslední době stále častější. V cíleném přístupu je kvantitativní a s dobrou specificitou a senzitivitou. U necíleného přístupu na podkladě nukleární magnetické rezonance je poskytnuto širší pokrytí celého metabolomu. Následně je nutné provést důslednou validaci ve srovnání se známými analytickými standardy, abychom jasně potvrdili, že jsme necílenou analýzou detekovali právě tyto metabolity.

Pro obě z výše uvedených metod a pro interpretaci jejich výsledků je důležitá analytická reproduktibilita. Schopnost reprodukovat výsledky na větším množství vzorků je pro in vitro studie nezbytné. Dalším důležitým a nezbytným prvkem je důsledná statistická analýza kvality dat, obzvláště v případech analýz velkého množství vzorků. Všechny výše uvedené prvky významně podporují věrohodnost získaných výsledků (Manchester et al., 2017).

1.5 Současný stav zkoumaného problému

V posledních letech se několik autorů zabývalo metabolikou mozkomíšního moku u pacientů roztroušenou sklerózou. Jejich výsledky ukazují statisticky signifikantní rozdíly v množství a složení metabolitů mezi mozkomíšním mokem pacientů s roztroušenou sklerózou v různých stádiích nemoci ve srovnání se zdravými kontrolami. Nejčastější nález a nejvíce signifikantní rozdíly byly v hladinách různých aminokyselin a skupin lipidů. Někteří autoři zjistili významně snížené hladiny aminokyselin tyrozinu, leucinu, argininu a fenylalaninu u RS ve srovnání se zdravými kontrolami v mozkomíšním moku (Reinke et al., 2014; Park et al., 2016; Kasakin et al., 2019; Sylvestre et al., 2019; Nogueras et al., 2019; Murgia et al., 2020; Carlsson et al., 2020; Fitzgerald et al., 2021; Yan et al., 2021) a v séru (Signoriello et al., 2020). Jiní autoři zase popsali značné rozdíly v hladinách mastných kyselin v mozkomíšním moku u roztroušené sklerózy (Gonzalo et al., 2012; Park et al., 2016; Nogueras et al., 2019; Oliveira et al., 2019).

Nejpozoruhodnějším nálezem u roztroušené sklerózy byla zvýšená hladina glutamátu v mozkomíšním moku pacientů s aktivní lézí (Sinclair et al., 2003; Pieragostino et al., 2015; Murgia et al., 2020). Zvýšené hladiny glutamátu u roztroušené sklerózy byly prokázány také v séru (Sarchielli et al., 2003; Poddighe et al., 2017). U myoinositolu a cholinu byly dostupné výsledky rozporuplné. Někteří autoři popisují zvýšené hladiny cholinu a myoinositolu v mozkomíšním moku u roztroušené sklerózy (Srinivasan et al., 2005; Reinke et al., 2014; Cocco et al., 2016), ale jiní autoři našli tyto hladiny snížené (Podlecka-Pietowska et al., 2013). Zajímavé výsledky poskytla taky nedávná studie zabývající se metabolickými změnami u pacientů léčených fingolimodem. Výsledky této studie naznačují, že fingolimod ovlivňuje metabolismus aminokyselin a některé z těchto metabolitů mohou představovat i biomarker účinnosti léčby fingolimodem (Murgia et al., 2023).

2. Cíl dizertační práce

Hlavním cílem této dizertace bylo stanovit statisticky signifikantní rozdíly v metabolomu mozkomíšního moku pacientů v počátečním stádiu roztroušené sklerózy (zatím bez specifické DMD terapie) v porovnání s mozkomíšním mokem kontrolní skupiny. Dále jsme si vytyčili vytvořit seznam signifikantně změřených metabolitů a zároveň jsme se pokusili z patofyziologického hlediska tyto změny odůvodnit. Dalším cílem bylo zhodnotit korelaci mezi koncentracemi jednotlivých statisticky signifikantně rozdílných metabolitů mozkomíšního moku a klinickým stavem pacientů v podobě hodnot EDSS v době odběru mozkomíšního moku a s odstupem času (po 1 roce a po 2 letech) a dále korelaci mezi koncentracemi metabolitů od projevu prvních příznaků do odběru vzorku mozkomíšního moku. Následně jsme v rámci dalších analýz hodnotili i jiné potenciální biomarkery roztroušené sklerózy. U částí pacientů, u kterých bylo provedeno dodatečné měření hladin NfL a GFAP v séru a v mozkomíšním moku, jsme hodnotili korelaci mezi hodnotami EDSS a hladinami NfL a GFAP. U další části pacientů, kteří v období odběru mozkomíšního moku absolvovali vyšetření evokovanými potenciály, jsme korelovali nálezy EDSS s výsledky dostupných evokovaných potenciálů převedených do formy „EP score“ (Schlaeger et al., 2014). V rámci těchto korelací jsme zhodnotili i prognostický potenciál výše zmíněných markerů u pacientů v počátečních stádiích roztroušenou sklerózy.

2.1 Hypotézy

1. Složení mozkomíšního moku u pacientů s roztroušenou sklerózou je ve srovnání s kontrolami z hlediska metabolomiky signifikantně rozdílné.
2. Metabolomika mozkomíšního moku představuje potenciální zdroj nových biomarkerů pro roztroušenou sklerózu.
3. Evokované potenciály jsou schopné odrážet aktuální klinický stav pacienta a dokážou plnit i roli prognostického markeru u roztroušené sklerózy.
4. Hladiny NfL a GFAP odrážejí aktuální klinický stav pacienta s roztroušenou sklerózou.

3. Metodika dizertace

Hlavním předmětem této dizertační práce bylo zhodnotit potenciál metabolomiky jako zdroj nových biomarkerů mozkomíšního moku roztroušené sklerózy ve srovnání s kontrolami, které by se mohly v budoucnosti uplatnit jako diagnostické markery, prognostické markery nebo markery účinnosti léčby.

3.1 Strategie dizertace

Prvním důležitým krokem bylo stanovení jasných kritérií pro začlenění pacientů do studie. Byly stanoveny dvě hlavní skupiny: 1) skupina pacientů s roztroušenou sklerózou a 2) kontrolní skupina. Dalším postupem bylo sestavení informovaného souhlasu pro pacienty a získání schválení pro tuto studii od Etické komise (EK) Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Po schválení EK jsme začali s náborem pacientů, kterým jsme studii podrobně vysvětlili. Po podepsání informovaného souhlasu jsme začali s odběrem biologických vzorků. Většina pacientů byla následně monitorována v rámci Centra demyelinizačních onemocnění 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (3. LF UK a FNKV) po dobu 2 let, kdy docházelo k pravidelným klinickým kontrolám a dalším paraklinickým vyšetřením. V dalším kroku proběhla necílená metabolická analýza odebraných vzorků mozkomíšního moku pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií a s ustanovením základních rozdílů mezi nálezy u skupiny pacientů s roztroušenou sklerózou a kontrolní skupinou. Poté proběhla cílená analýza pomocí analytických standardů metabolitů a byly vybrány analyty, u kterých byly nalezeny signifikantní rozdíly. Dále byla provedená statistická analýza laboratorních a klinických dat následovaná korelační analýzou mezi jednotlivými složkami. V závěru byly všechny dostupné výsledky zhodnocené a byly vyvozené závěry, o kterých se následně diskutovalo.

3.2 Popis a charakteristika zkoumaného souboru

Rekrutace pacientů probíhala za využití databáze Centra demyelinizačních onemocnění Neurologické kliniky 3. LF UK a FNKV. Celkem bylo do studie

zařazeno 73 pacientů ve věku mezi 18 až 55 lety, kteří byli rozděleni do dvou skupin. Základními podmínkami pro subjekty v obou skupinách byla absence jiných neurologických autoimunitních onemocnění, neužívání léků ze skupiny psychofarmak (například antidepresiva nebo antipsychotika), které by mohly ovlivnit složení mozkomíšního moku a koncentrace jednotlivých metabolitů.

Do první skupiny byli zařazeni pacienti v počátečních stádiích roztroušené sklerózy. Šlo o pacienty po první atace klinických symptomů splňujících revidovaná McDonaldova kritéria z roku 2017 (Thompson et al., 2018) s nálezem na MR mozku a míchy a s nálezem v mozkomíšním moku odpovídajícím demyelinizačnímu onemocnění typu roztroušené sklerózy. Mozkomíšní mok a sérum těchto pacientů bylo bez průkazu protilátek proti aquaporinu-4 a protilátek proti MOG, které by mohly naznačovat na přítomnost jiného typu demyelinizačního onemocnění CNS, než je roztroušená skleróza. Pacienti v době odběru mozkomíšního moku byli bez specifické DMD terapie. Tato skupina zahrnovala celkem 40 pacientů, z toho 31 žen a 9 mužů. Odběry jejich mozkomíšního moku byly prováděny v průměru 53 dní od vzniku klinických symptomů (s výjimkou 4 subjektů, kterých mozkomíšní mok byl odebrán v rozsahu 2 až 5 let od vzniku klinických symptomů a dalších 3 subjektů, u kterých tato informace nebyla dostupná).

Druhá skupina neboli kontrolní skupina, byla sestavená na podkladě definice takzvaných „symptomatických kontrol“ dle publikace z roku 2013 (Teunissen et al., 2013). Jedná se o pacienty, kteří trpí různými subjektivními obtížemi. Nejčastěji se jedná nespecifické poruchy cití ve smyslu parestezie nebo dysestezie, nespecifické závratě, nespecifické bolesti hlavy nebo jiné polymorfní stesky, avšak s normálním klinickým i paraklinickým nálezem, který neodpovídá žádnému jasnému neurologickému onemocnění. Tato skupina zahrnovala celkem 33 pacientů, z toho 26 žen a 7 mužů.

Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas po detailním vysvětlení charakteru studie. Dále všichni účastníci podstoupili kompletní klinické neurologické vyšetření, zobrazení mozku a míchy pomocí magnetické rezonance a základní laboratorní vyšetření mozkomíšního moku a séra. U části pacientů bylo

provedeno vyšetření evokovanými potenciály v období 6 měsíců před odběrem biologických vzorků nebo 6 měsíců po odběru těchto vzorků.

3.3 Odběr a zpracování biologického materiálu

Mozkomíšní mok byl odebrán za sterilních kautel pomocí atraumatické jehly z meziobratlového prostoru mezi čtvrtým a pátým lumbálním obratlem do polypropylénových zkumavek. Po odběru byla provedená základní biochemická a cytologická analýza. Vzorky s arteficiální příměsí krve nad 600 erytrocytů v mikrolitru, dále vzorky s významnou pleiocytózou, nad 50 v mikrolitru, a také vzorky s významnou proteinorhachií nad 0,5 g/l mozkomíšního moku byly ze studie vyloučené a nebyly dále zpracované. Vhodné vzorky byly dále centrifugovány při otáčkách 3500/min po dobu 4 min a zamrazené v teplotě -80 °C, při které byly i skladované a převezené k dalšímu laboratornímu zpracování do laboratoře Národního ústavu duševního zdraví (NÚDZ) Klecany a laboratoře Topelex.

Příprava analytických vzorků pro necílenou metabolickou analýzu a cílenou analýzu vybraných malých molekulárních metabolitů (50 – 300 Da) probíhala následovně: 100 µl likvoru bylo převedeno do předchlazené zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml), následně bylo přidáno 400 µl ledové směsi ACN:MeOH (1:1, v/v) s vnitřním standardem (standardní směs deuterovaných aminokyselin, Sigma Aldrich). Vzorky byly vortexované po dobu 30 s a následně inkubované po dobu 1 h při teplotě -20 °C. Po inkubaci následovala 10 minutová centrifugace při 13 000 rpm při teplotě 4 °C. Supernatant byl následně převeden do zkumavky typu Eppendorf (0,5ml) a vysušen pomocí „speedvac“-koncentrátoru. Suchý extrakt byl pak rekonstituován v 100µl H₂O:MeOH (1:1, v/v) a sonikován v chladné koupeli po dobu 20 min. Supernatant byl následně převeden do zkumavky a přímo analyzován.

Vzorky pro analýzu mastných kyselin byly rozmrazeny na ledu, vortexované po dobu 15 s a před umístěním do ultrazvukové lázně na 10 min bylo přidáno 100 µl likvoru do 400 µl propan-2olu (=IPOH) s dalším vnitřním standardem. Extrakce probíhala po dobu 30 min při teplotě 4 °C, následována centrifugací při 4 000 rpm po dobu 10 min při teplotě 4 °C. Supernatant (450 µl)

byl extrahován a vysušen pod dusíkovým proudem. Vzorky byly rekonstituovány se 100 μ l etanolu (=EtOH), vortexovány po dobu 10 s a sonikovány po dobu 10 min před převodem do zkumavek vybavených vložkami.

3.4 Laboratorní zpracování metabolomiky mozkomíšního moku

Laboratorní analýza metabolomiky mozkomíšního moku subjektů s roztroušenou sklerózou a subjektů kontrolní skupiny byla provedena v laboratoři NÚDZ.

3.4.1 Laboratorní analýza vzorků

Všechny analýzy byly provedené na Thermo Ultimate 3000 párovaném s AB Sciex TripleTOF 5600 hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením. Pro necílenou metabolomickou analýzu byly všechny vzorky spolu s kontrolami kvality a prázdnými vzorky vstříknuté v pozitivním i negativním (ESI+, ESI-) modu pomocí metody SWATH. Vzorky byly separované na koloně (Kinetex C18, 2,6 μ m x150 x 3 mm kolona; Phenomenex). Teplota kolony byla udržovaná na 30 °C. Mobilní fáze byla sestavena následovně: A = 0,1 % kyselina mravenčí a B = 0,1% kyselina mravenčí v MeOH. Pro pozitivní i negativní mód byl použit lineární eluční gradient od 5 % B (0 - 2 min) do 100 % B (18 – 23 min) a posledních 5 min metody HPLC (25 - 30 minut) bylo použito pro udržení počátečních podmínek. Průtoky byly 220 μ l.min⁻¹ a nástřikový objem vzorku byl 5 μ l. Vzorky byly udržovány v autosampleru při teplotě 4 °C a každý vzorek byl injikován dvakrát ve dvou aplikacích s hmotnostním oknem pro rozsah hmotnost/náboj (m/z) (50-600 Da, 500-1200 Da). Podmínky zdroje ESI byly nastaveny následovně: iontový zdroj plynu 1 (GS1) 40 psi, iontový zdroj plynu 2 (GS2) 40 psi, clonový plyn (CUR) 35 psi, iontové rozprašovací napětí 5 500 V pro ESI+, -4500 V pro ESI- a teplota zdroje byla nastavena pro oba režimy na 400 °C.

Modifikovaná metoda byla použita pro cílenou analýzu pro rozlišení malomolekulárních metabolitů. Separace byla dosažena na kolonách (Kinetex C18, 2,6 μ m x150 x 3 mm; Phenomenex) s následovným eluentním systémem: A = 0,1 % HCOOH, 2,5 mM formiátu amonného, a B = 0,1 % HCOOH v MeOH. Byl použit

lineární gradient (5 – 100 % B) 2 – 12 min s konstantním průtokem 0,22 ml.min⁻¹. Objem nástřiku byl nastaven na 5 µl. Vzorky byly udržovány v autosampleru při 4 °C a každý vzorek byl injikován dvakrát pro rozsah m/z 50-500 Da. Podmínky zdroje ESI byly nastaveny následovně: iont GS1 40 psi, iont GS2 40 psi, CUR 35 psi, napětí iontového spreje 5 500 V a teplota zdroje 400 °C.

Separace mastných kyselin byla provedena na koloně Kinetex C8, 2,6 µm, 100 x 2,1 mm při teplotě 45 °C. Analytická kolona byla vybavena patronou SecurityGuard Ultra C8 jako předkolona (vnitřní průměr 2,1 mm). Mobilní fáze A sestávala z 0,1 % kyseliny octové a mobilní fáze B sestávala z acetonitrilu/metanolu/vody (80:15:5; v:v:v) s 0,1 % kyseliny octové, s injekčním objemem 5 µl. Byl aplikován následující gradient: 1 min – 25 % B; 3 min – lineární gradient 25-70 % B; 8 min – lineární gradient 70-90 % B; 11 min – lineární gradient od 90-100 % B; 15 min – 100 % B; 17 min – 25 % B; 20 min – 25 % B; s konstantním průtokem 300 µl/min. Ionizace byla provedena v režimu negativní elektrosprejové ionizace (ESI⁻) s následujícím nastavením zdroje: Gas1 – 40 psi, Gas2 – 40 psi, Curtain Gas – 35 psi, napětí iontového spreje -4500 V, teplota 500°C.

3.4.2 Zpracování laboratorních dat

Data kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) byla zpracována pomocí softvéru Sciex OS (verze 1.3, AB SCIEX, Canada). Softvér MarkerView (verze 1.3.1, AB SCIEX, Canada) byl použit v druhém kroku zpracování „syrových“ LC-HRMS dat (detekce píku, srovnání, filtrování dat a stanovení poměru m/z, RT a plochy píku iontů pro každý vzorek). Dolování dat bylo provedeno programovým algoritmem – mezní hodnota maximální intenzity byla nastavena na 100 cps. Nastavení píku bylo dosaženo pomocí retenčního času (=RT) a hmotnosti k nabití (= m/z) s tolerancemi 0,1 min a 0,005 Da, v daném pořadí. Samotné monoizotopické píky byly považovány za snížení množství hmoty a posílení výběru skutečného molekulárního znaku. Nakonec byly identifikovány hmotnostní signály odlišně vyjádřené kontrolními vzorky a vzorky z případové studie (roztřesená skleróza) s použitím dodatečného filtračního postupu s násobnou změnou (<1,5) a t-testem (p>0,05). Tento postup je nezbytný pro eliminaci pozadí a kontaminantů a zachování signálů skutečné

biologické hmotnosti z dat LC-HRMS. Následující kroky byly provedeny pomocí webového serveru MetaboAnalyst 5.0. Získaná a filtrovaná data z MetaboAnalyst 5.0 byla v následujícím kroku ověřena s dříve získanými daty z cílených analýz (analýzy ~80 standardů zahrnují aminokyseliny, mastné kyseliny a další malé metabolity, které jsou již zasazeny do spektrální knihovny pomocí softwaru Sciex OS).

3.5 Zpracování klinických a paraklinických dat

Dostupná klinická a paraklinická data, týkající se pacientů s roztroušenou sklerózou a skupiny kontrol, byla extrahovaná z databáze Neurologické kliniky 3. LF UK a FNKV. Po extrakci byla tato data anonymizována a kódována za účelem ochrany osobních údajů a identity subjektů zavzatých do studie.

3.5.1 Extrakce klinických dat

Jednalo se převážně o informace o klinickém stavu pacientů (objektivní neurologický klinický nález). Dále byla extrahovaná osobní anamnéza a farmakologická anamnéza pacientů, za účelem případného vyloučení subjektů ze studie. U skupiny subjektů s roztroušenou sklerózou se jednalo i o hodnoty EDSS v době odběru mozkomíšního moku a v případě subjektů, dispenzarizovaných v rámci Centra demyelinizačních onemocnění Neurologické kliniky 3. LF UK a FNKV, i o hodnoty EDSS po půl roce, po roce a po dvou letech od odběru mozkomíšního moku ke zhodnocení vývoje jejich klinického stavu.

3.5.2 Extrakce paraklinických dat

Z výše zmíněné databáze jsme dále extrahovali paraklinická data všech subjektů studie, zejména skupiny subjektů s roztroušenou sklerózou. Jednalo se především o výsledky základní cytologické a biochemické analýzy likvoru a nálezy na MR mozku a míchy. Nálezy těchto vyšetření představují zahrnující nebo vylučující kritéria pro obě skupiny. Také tato extrahovaná data byla anonymizována a kódována za účelem ochrany osobních údajů pacienta.

3.5.2.1 Evokované potenciály a EP skóre

U některých subjektů skupiny s roztroušenou sklerózou bylo také provedeno vyšetření evokovaných potenciálů (SEP, VEP a MEP). Vyšetření multimodálními evokovanými potenciály bylo provedeno v souladu s doporučením Mezinárodní federace klinické neurofyzologie.

Odpovědi MEP jsme získali pomocí přístroje Magstim Bipolar, pro horní končetinu z m. abduktor digiti minimi (ADM) a pro dolní končetinu z m. tibialis anterior (TA). Cívka magnetického stimulátoru byla umístěna přesně nad oblast motorického kortexu pro horní končetiny a poté pro dolní končetiny. Pro spinální odpovědi byla cívka přiložená nad oblast sedmého krčního a pátého lumbálního obratle. Celkově byly u každé končetiny provedeny tři stimule pro kortikální a tři pro spinální komponentu. Pro pravé končetiny byla stimulace cívkou provedená v protisměru hodinových ručiček a pro levé končetiny ve směru hodinových ručiček. Pro hodnocení nálezu byly použity nejkratší latence svalové odpovědi kortikální stimulace (CxM – „cortico-muscular latency“) a spinální stimulace (SpM – „spino-muscular latency“). Následně se vypočetl centrální motorický kondukční čas (CMCT – „central motor conduction time“), který jsme získali odečtením nejkratší spinální latence od nejkratší kortikální latence pro každou končetinu samostatně.

Odpovědi VEP pro každé oko samostatně jsme získali pomocí přístroje Keypoint při snímání z aktivní elektrody Oz (nepárová okcipitální elektroda systému 10-20) a referenční elektrody Fz (nepárová frontální elektroda systému 10-20). Stimulovali jsme reverzním šachovnicovým vzorcem v plném poli. Frekvence stimulace byla 0,5 Hz, vzdálenost oka od obrazovky byla 150 cm. Vyšetření VEP pro každé oko trvalo 30 minut. Nejvýznamnějším parametrem hodnocení byla latence vrcholu vlny P100.

Odpovědi SEP jsme analyzovali opět pomocí přístroje Keypoint po stimulaci n. medianus pro horní končetinu a n. tibialis pro dolní končetinu. Frekvence stimulace byla 3 Hz. Intenzita stimulace přesahovala 3 – 4x senzitivní práh, tj. práh vnímání podráždění elektrickým proudem na kůži. Odpovědi SEP n. medianus byly snímány pomocí povrchových elektrod umístěných v Erbově bodě,

mezi šestým a sedmým krčním obratlem, 7 cm laterálně a 2 cm posteriorně od Cz (nepárová centrální elektroda systému 10-20). Referenční elektroda byla umístěná na Fz (nepárová frontální elektroda systému 10-20). Odpovědi SEP n. tibialis jsme získali při snímání z povrchových elektrod, umístěných 3 cm posteriorně od Cz s referenční elektrodou na Fz a v oblasti spina iliaca anterior superior. Důležitým hodnoceným parametrem byla kortikální odpověď (vlna N20) a cervikální odpověď (vlna N13) pro horní končetiny. Pro dolní končetiny byla nejdůležitějším hodnoceným parametrem kortikální odpověď (vlna P40). Dále byl pro horní končetiny vypočten centrální kondukční čas (CCT – „central conduction time“), který jsme získali odečtením cervikální latence od spinální latence.

V práci jsme se zaměřili na využití latencí jednotlivých odpovědí evokovaných potenciálů, amplitudy hodnoceny nebyly. Všechny extrahované výsledky, tj. hodnoty MEP, SEP a VEP, byly následně převedeny na z-skóre na základě normativních hodnot používaných v rámci naší laboratoře. Z-skóre představuje ve statistice počet standardních odchylek, o něž je hodnota konkrétního pozorování vyšší nebo nižší než průměrná hodnota toho, co je měřeno. V případě výsledků MEP (CxM a CMCT pro horní i dolní končetiny) a SEP (vlna P40) byla tato data ještě dodatečně upravena vzhledem k výšce jednotlivých subjektů. Z těchto z-transformovaných výsledků bylo následně vypočteno EP skóre. Jednalo se o výpočet EP skóre pro jednotlivé modalit – qVEP (vypočteno z vln P100 bilaterálně), qSEP (vypočteno z vln N20 a P40 bilaterálně) a qMEP (vypočteno z CxM horních a dolních končetin bilaterálně). Z těchto EP skóre pro jednotlivé modalit byly následně vypočteny komplexnější EP skóre - kvantitativní EP skóre (qEPs) a kvantitativní 3 EP skóre (q3EPs). qEPs se vypočte součtem z latencí P100, CMCT horních i dolních končetin, CCT horních končetin a latencí P40, který je následně vydělen celkovým počtem sečtených modalit (Schlaeger et al., 2014). q3EPs se vypočte součtem latencí P100, CMCT horních i dolních končetin a latencí P40 obou stran, který je následně vydělen celkovým počtem sečtených modalit (Hardmeier et al., 2019). EP skóre nemá specifickou jednotku, protože je vypočten z jednotlivých z-skóre. EP skóre 0 znamená, že je stejný jako normální průměr. EP skóre 1 znamená, že se odchyluje od normálního průměru o 1 jednotku. EP skóre nad 2 je považováno za patologické. Čím vyšší hodnota EP skóre je, tím závažnější je abnormalita.

3.6 Analýza hladin NfL a GFAP

Měření hladin lehkých řetězců neurofilament a gliálního fibrilárního acidického proteinu z mozkomíšního moku u pacientů s roztroušenou sklerózou bylo provedeno ve spolupráci s laboratoří Topelex za použití „Single Molecule Array (SIMOA)“, ultrasenzitivní metody vyvinuté Quanterix TM. Měření prostřednictvím SIMOA bylo založené na principu zachycení jedné „kuličky“ potažené protilátkou v jamkách o velikosti ve femtolitrech, aby bylo možné digitálně změřit jednotlivé kuličky na přítomnost analytu v sendvičové immunoassay. Tyto odpovědi, respektive přítomnost analytu, byly následně enzymaticky amplifikované za účelem zvýšení citlivosti daného testu. Biomarkerové testy prováděné na této platformě vykazují citlivost v nízkém až středním rozsahu fg/ml.

3.7 Statistická a korelační analýza

Na závěr byla provedená základní deskriptivní statistická analýza s návaznou korelační analýzou klinických, paraklinických a laboratorních výsledků pomocí volně dostupného softvéru „R“ (R core team 2021). Ke zhodnocení statistické významnosti metabolomiky pacientů po prvních klinických příznacích RS a u kontrolní skupiny byl použit Studentův t-test, přesněji dvoustranná varianta Welchova t-testu. V dalším kroku byla aplikovaná korekce typu FDR (the Benjamini-Hochberg false-discovery rate) pro vícečetné srovnání za účelem minimalizace falešně pozitivních výsledků. V případě korelací byl vyhodnocen korelační koeficient, jehož významnost byla opětovně ověřena pomocí Studentova *t*-testu. Ve všech případech jsme použili *p*-value s cílovou hodnotou nižší než 0,05, v ideálním případě nižší než 0,01.

4. Výsledky

Do studie jsme zařadili celkem 73 pacientů (57 žen a 16 mužů) s průměrným věkem 34 let (v rozsahu 18 až 54 let). Pacienti obou skupin neměli v době odběru mozkomíšního moku anamnézu jiných autoimunitních onemocnění nebo jiných neurologických onemocnění, které by mohly ovlivnit složení mozkomíšního moku. Neužívali žádná psychofarmaka (antipsychotika, antidepresiva aj.), která by také mohla pozměnit složení likvoru. Ze skupiny pacientů s RS (tab. 1) užívalo šest pacientek (č. 5, 11, 13, 14, 21, 34) hormonální antikoncepci, dalších pět pacientů (č. 6, 10, 12, 27, 38) užívalo denně levothyroxinum a další dva pacienti (č. 12, 36) užívali denně antihypertenzní medikaci.

Do skupiny pacientů s RS jsme zařadili celkem 40 pacientů (31 žen a 9 mužů) po první atace klinických symptomů s nálezem na MR mozku a míchy a s nálezem v mozkomíšním moku, odpovídajícím demyelinizačnímu onemocnění typu RS dle revidovaných McDonaldových kritérií z roku 2017 (Thompson et al., 2018), kteří zatím neměli specifickou DMD léčbu. U všech pacientů této skupiny byly v likvoru naměřené proteinorhachie v mezích normy, průměrně 0,32 g/l (v rozmezí 0,11 g/l - 0,49 g/l), glykorhachie v mezích normy, průměrně 3,3 mmol/l (v rozmezí 2,94 mmol/l - 5,5 mmol/l) a množství mononukleárů v 1 μ l v akceptovatelných hodnotách, průměrně 12/ μ l (v rozmezí 1 – 43/ μ l). Dále měli všichni pacienti s RS v mozkomíšním moku pozitivní nález oligoklonálních páسů (OCB), v průměru 7 IgG OCB (v rozmezí 0 - 18), 6 IgA OCB (v rozmezí 0 - 14), 6 IgM OCB (v rozmezí 0 až 22), 3 lehkých řetězců kappa OCB (v rozmezí 0 - 16) a 2 lehkých řetězců lambda OCB (v rozmezí 0 - 12). Dodatečně měli pacienti s RS stanovené protilátky proti aquaporinu 4 a proti MOG v mozkomíšním moku i v séru, které byly negativní. Detaily základních cytologických a biochemických výsledků mozkomíšního moku pacientů s RS jsou uvedeny v tabulce 1. Odběry mozkomíšního moku byly provedeny v průměru 53 dní od vzniku klinických symptomů (s výjimkou pacientů č. 10, 19, 21 a 25, u kterých byl mozkomíšní mok odebrán v rozsahu 2 až 5 let od vzniku klinických symptomů a u pacientů č. 7 a 32, u kterých nešlo z dostupných dat tuto informaci zjistit).

Pacienti s RS (31 osob) byli klinicky sledováni v Centru demyelinizačních onemocnění Neurologické kliniky 3. LF UK a FNKV po dobu 1 roku. Dvacet jedna

nemocných bylo sledováno dále 2 roky po odběru mozkomíšního moku. V tomto období měli pravidelně stanovené hodnoty EDSS. První hodnoty EDSS byly vyhodnocené v období odběru mozkomíšního moku u všech 40 pacientů. Průměrná hodnota EDSS byla 1,8 (rozsah 0,5 - 3,5). Dále byly vyhodnocené hodnoty EDSS po 1 roce u 31 pacientů s průměrnými hodnotami EDSS 2,0 (rozsah 0,5 - 4) a po 2 letech u 21 pacientů s průměrnými hodnotami EDSS 1,9 (rozsah 0,5 - 3). Detaily klinických informací jsou uvedeny v tabulce 2.

Kontrolní skupinu tvořilo 33 osob (26 žen a 7 mužů), které trpěly nespecifickými subjektivními obtížemi typu poruchy čítí nebo bolesti hlavy či závrativé stavy a u kterých byly klinické i paraklinické nálezy v mezích normy a neodpovídaly žádnému jasnému neurologickému onemocnění (označeny jako symptomatické kontroly dle publikace Teunissen et al., 2013). Detaily základních cytologických a biochemických výsledků mozkomíšního moku pacientů kontrolní skupiny a popis jejich subjektivních obtíží jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 1. Nálezů v likvoru pacientů s roztroušenou sklerózou

ID	Liquor					Protein (g/l)	Glc (mmol/l)	Mononucl (μ l)	Čas od vzniku obtíží k odběru CSF (měsíce)
	IEF IgG	IEF IgA	IEF IgM	IEF Kappa	IEF Lambda				
1	5	3	4	2	1	0,31	5,5	19	0,3
2	7	10	9	8	5	0,32	3,85	4	0,7
3	7	11	21	10	2	0,26	3,31	40	0,2
4	9	9	9	8	7	0,25	3,12	12	1
5	1	1	1	0	0	0,27	3,10	2	1,5
6	13	11	9	15	12	0,26	3,44	30	1
7	17	11	22	16	11	0,32	3,41	4	N/A
8	3	10	8	10	8	0,15	3,35	8	3
9	2	2	0	6	1	0,43	3,31	27	1
10	14	12	5	12	0	0,25	3,36	2	60
11	9	8	8	7	8	0,41	3,04	13	0,5
12	6	8	8	8	0	0,43	3,11	34	6
13	10	7	5	9	10	0,45	2,94	42	1,5
14	10	9	4	4	8	0,19	3,85	2	0,1
15	16	14	13	16	6	0,40	3,72	22	0,7
16	12	4	7	2	0	0,20	3,27	30	0,7
17	15	0	8	6	0	0,33	2,75	5	1
18	9	14	14	11	10	0,37	3,21	2	3
19	2	1	3	3	6	0,21	3,47	3	24
20	8	9	6	3	12	0,46	3,31	20	4
21	5	9	6	5	4	0,18	3,03	1	24
22	9	14	10	2	2	0,23	3,92	22	0,7
23	0	0	0	3	1	0,15	3,69	1	0,5
24	4	3	2	2	3	0,21	3,36	3	0,3
25	0	0	0	0	2	0,25	3,32	2	48
26	2	0	0	4	4	0,46	5,62	8	4
27	5	2	8	12	4	0,11	2,96	4	2
28	7	4	3	3	1	0,15	3,62	10	2
29	7	9	7	5	3	0,4	3,58	13	N/A
30	5	5	1	6	7	0,36	3,79	6	1
31	2	0	0	0	0	0,31	3,04	3	0,3
32	0	0	1	1	1	0,37	3,24	5	N/A
33	6	0	1	0	0	0,32	3,1	2	3
34	18	12	9	10	6	0,27	3,27	3	4
35	7	3	0	1	0	0,27	3,31	2	3,3
36	10	10	7	9	6	0,49	3,85	13	0,3
37	3	0	1	0	3	0,22	3,26	6	1,7
38	15	16	0	1	9	0,38	3,01	12	0,7
39	19	15	10	1	13	0,28	3,29	20	1,5
40	13	0	4	2	13	0,16	3,12	4	0,2

Poznámka: ID = identifikační číslo; IEF = izoelektrická fokusace; Glc = glukóza;

Mononucl = množství mononukleárů; N/A = nedostupné

Tab. 2. Klinická data pacientů s roztroušenou sklerózou

ID	Věk	Pohlaví	Datum odběru	Osobní Anamnéza	Farmakologická anamnéza	EDSS			
						0	1/2 rok	1 rok	2 roky
1	38	M	27.02.2017	-	-	1,5	1,5	1	1,5
2	26	Ž	28.03.2017	-	-	1	1	1	1
3	36	Ž	26.06.2018	atopický ekzém	-	2,5	3	2,5	2
4	27	Ž	04.10.2018	-	-	2,5	1,5	1	2
5	43	Ž	17.10.2018	st.p. appendektomii, cholecystektomii	hormonální antikoncepce	2	1,5	1,5	1,5
6	32	Ž	09.01.2019	hypothyreóza	levothyroxinum 50 µg denně	2,5	2	2	2
7	28	M	23.01.2019	-	-	1	N/A	N/A	N/A
8	27	Ž	13.03.2019	WPW syndrom	-	1	1,5	1,5	2
9	33	Ž	02.07.2019	NS porucha zraku	-	1,5	N/A	N/A	N/A
10	40	Ž	13.11.2019	hypertyreóza	levothyroxinum 50 µg denně	1,5	1,5	1,5	1,5
11	31	Ž	04.12.2019	-	hormonální antikoncepce	1,5	1,5	1,5	1,5
12	54	Ž	04.12.2019	arteriální hypertenze, obezita, hypothyreóza	levothyroxinum 137 mg, omeprazolom 20 mg, hydrochlorothiazidum 25 mg, allopurinolum 300 mg denně	2	2,5	2,5	2,5
13	18	Ž	30.12.2019	asthma bronchiale, deprese*	hormonální antikoncepce	2,5	2	2	2,5
14	25	Ž	27.02.2020	-	hormonální antikoncepce	1,5	2	1,5	2
15	43	M	10.02.2020	-	-	1	N/A	N/A	N/A
16	25	Ž	29.04.2020	-	-	2,0	2	2	2
17	33	Ž	06.05.2020	-	-	1,5	N/A	N/A	N/A
18	40	Ž	24.08.2020	-	-	2	N/A	N/A	N/A
19	49	Ž	09.02.2021	st.p. appendektomii	-	2,5	2,5	2,5	3
20	33	Ž	30.03.2021	-	-	1	1,5	1,5	1,5
21	43	Ž	06.04.2021	gastroezofageální reflux	hormonální antikoncepce, omeprazolom 20 mg denně	3,5	5,5	5,5	N/A
22	27	M	06.04.2021	-	-	1,5	2,0	2,0	2
23	28	Ž	13.04.2021	-	-	3,5	2,5	2	2
24	36	Ž	04.05.2021	-	-	2	2	2	2
25	27	M	05.05.2021	-	-	2,5	2,5	2,5	2,5
26	50	M	14.07.2021	-	-	1,5	1,5	1,5	1,5
27	26	Ž	05.10.2021	hypothyreóza	levothyroxinum 50 µg denně	1	1	1	1
28	29	Ž	11.10.2021	-	-	2	2	2	N/A
29	21	Ž	09.11.2021	-	-	0,5	0,5	0,5	N/A
30	41	Ž	01.12.2021	gastroezofageální reflux	omeprazolom 20 mg denně	1	N/A	N/A	N/A
31	39	Ž	12.06.2022	leidenská mutace heterozygot	-	2	2	2	N/A
32	30	M	18.06.2022	-	-	1	N/A	N/A	N/A
33	42	Ž	16.08.2022	-	-	2	2	2	N/A
34	39	Ž	10.10.2022	-	hormonální antikoncepce	1,5	1,5	1,5	N/A
35	49	M	25.10.2023	st.p. RT seminomu	-	3,5	3,5	3,5	N/A
36	39	M	03.11.2022	arteriální hypertenze	telmisartanum 40 mg, amlodipini besilas 10 mg, bisoprololi fumaras 10 mg denně	2	2	N/A	N/A
37	23	Ž	15.11.2022	-	-	0,5	0,5	N/A	N/A
38	29	Ž	13.12.2021	hypothyreóza	levothyroxinum 132 µg denně	3,5	4,0	4,0	N/A
39	19	Ž	21.12.2021	asthma bronchiale	salbutamol sulfas 5 mg/ml dle potřeby	1,5	1,5	2	N/A
40	24	Ž	12.01.2022	st.p. exstirpaci benigního fibromu mammy l.sin	-	1	1	1,5	N/A

Poznámka: ID = identifikační číslo; M = muž; Ž = žena; St.p. = Status post; WPW = Wolf-Parkinson-White; NS = nespecifická; N/A = nedostupné; l.sin = lateris sinistri, RT = radioterapie

* deprese u tohoto pacienta byla bez cílené farmakoterapie

Tab. 3. Popisované subjektivní obtíže a základní výsledky rozboru likvoru osob kontrolní skupiny

ID	Charakter obtíží, pro které byla LP indikována	P (g/l)	Likvor		OCB
			Glc (mmol/l)	Mononucl (v ul)	
1	nespecifická cefalea	0,32	3,45	1	neg.
2	intermitentní dvojité vidění	0,23	3,47	1	neg.
3	nespecifické závratě	0,25	3,33	1	neg.
4	bolesti hlavy a dysestezie tváře	0,32	2,04	0	neg.
5	intermitentní parestezie HKK i DKK	0,34	3,75	2	neg.
6	nekonstantní nespecifické závratě	0,21	3,45	2	neg.
7	parestezie PHK a L tváře	0,38	2,81	2	neg.
8	bolest za okem	0,33	2,58	2	neg.
9	rozostření vizu a parestezie PHK	0,27	3,66	3	neg.
10	parestezie HKK a bolest hlavy	0,21	2,92	2	neg.
11	subjektivní zmatenost	0,2	3,3	1	neg.
12	levostranné parestezie	0,32	3,08	2	neg.
13	bolesti hlavy při fyzické aktivitě	0,24	3,69	0	neg.
14	kvadruparestezie	0,3	3,1	3	neg.
15	migrující parestezie končetin	0,23	3,33	1	neg.
16	třes a levostranné parestezie	0,15	2,74	0	neg.
17	cefalea a bolest za P okem	0,24	3,16	2	neg.
18	tinnitus, dysestezie kolem L ucha	0,21	3,13	1	neg.
19	bolest hlavy a P oka	0,27	3,63	4	neg.
20	bolesti hlavy	0,21	4,28	2	neg.
21	přechodná nespecifická porucha zraku	0,42	3,24	1	neg.
22	kvadruparestezie	0,47	3,88	1	neg.
23	parestezie PDK	0,38	2,89	1	neg.
24	bolest hlavy	0,29	3,19	1	neg.
25	nespecifické závratě	0,22	3,59	1	neg.
26	intermitentní pocit neobratnosti PHK	0,41	3,17	0	neg.
27	subjektivní slabost LHK	0,28	2,97	1	neg.
28	parestezie tváře	0,34	3,34	1	neg.
29	pravostranné parestezie	0,19	3,53	3	neg.
30	intermitentní levostranné parestezie	0,17	3,31	0	neg.
31	kvadruparestezie	0,18	3,03	4	neg.
32	cefalea	0,24	3,23	1	neg.
33	přechodná nespecifická porucha zraku	0,35	2,89	1	neg.

Poznámka: ID = identifikační číslo; LP = lumbální punkce; P = proteinorhachie; Glc = glukorhachie; Mononucl = množství mononukleárů; OCB = oligoklonální pásy; Neg. = negativní

4.1 Výsledky metabolomické analýzy

Prostřednictvím necílené metabolomické analýzy jsme v mozkomíšním moku pozorovali kolem 60 různých analytů. Nejvýznamnější rozdíly jsme zjistili u aminokyselin a mastných kyselin v mozkomíšním moku u pacientů s RS. Statisticky signifikantní rozdíly byly pozorovány celkem u 12 metabolitů (argininu, histidinu, cholinu, serinu, glutamátu, spermidinu, metioninu, tyrozinu, kyseliny homovanilové, kyseliny linoleové, kyseliny olejové, kyseliny stearové). Z těchto metabolitů se nám povedlo pomocí analytických standardů určit přesné koncentrace v 10 případech. Detaily koncentrací těchto 10 metabolitů jsou uvedené v tabulce 4 a detaily zbylých 2 statisticky signifikantních a 18 nesignifikantních metabolitů jsou uvedené v tabulce 5. Kompletní deskriptivní statistické detaily jsou uvedené v tabulkách 6 a 7. Výsledky metabolomické analýzy byly publikované v listopadu roku 2023 (Židó et al., 2023).

Tab. 4. Metabolomické výsledky vybraných metabolitů (koncentrace v $\mu\text{g/ml}$)

Metabolity	Průměr (\pm SD) RS ($\mu\text{g/ml}$)	Průměr (\pm SD) C ($\mu\text{g/ml}$)	<i>p</i> -value
Arginin	3,9708 (\pm 1,4863)	5,2351 (\pm 1,9583)	0,0037
Histidin	7,0202 (\pm 1,6554)	8,1648 (\pm 1,7159)	0,0058
Spermidin	0,0367 (\pm 0,01111)	0,0313 (\pm 0,0059)	0,0124
Glutamat	1,8883 (\pm 0,3890)	2,1190 (\pm 0,3840)	0,0145
Cholin	1,0436 (\pm 0,2841)	1,2276 (\pm 0,3691)	0,0233
Tyrosin	1,1032 (\pm 0,2936)	1,2527 (\pm 0,2786)	0,0313
Serin	2,2714 (\pm 0,7321)	2,5920 (\pm 0,6051)	0,0473
Kys. linoleová	3,1304 (\pm 0,277)	3,3933 (\pm 0,228)	0,001
Kys. olejová	8,797 (\pm 0,824)	8,393 (\pm 0,523)	0,015
Kys. stearová	2,7739 (\pm 0,825)	3,1582 (\pm 0,623)	0,029

Poznámka: RS = skupina pacientů s roztroušenou sklerózou; C = kontrolní skupina; SD = směrodatná odchylka; Kys. = kyselina

Tab. 5. Metabolomické výsledky jiných metabolitů (srovnání oblastí piků)

Metabolity	Průměr (± SD) RS	Průměr (± SD) C	p-value
Metionin	8 504,86 (± 2 293,06)	6 256,73 (± 896,85)	<0,001
Kys. homovanilová	25 611,18 (± 6 850,19)	29 774,24 (± 8 085,84)	0,024
Treonin	8 363,92 (± 2 797,24)	9 587,38 (± 2 447,98)	0,053
Uridin	54 333,68 (± 37 916,23)	73 550,91 (± 46 254,03)	0,063
Kys. oxoglutarová	3 671,48 (± 585,98)	3 466,02 (± 400,76)	0,086
Serotonin	72 399,12 (± 103 619,34)	36 146,67 (± 70 506,17)	0,086
Biotin	18 633,25 (± 10 638,00)	23 614,50 (± 14 333,83)	0,106
Kys. palmitolejová	16 785,92 (± 2 676,63)	15 807,12 (± 2 426,12)	0,111
Dopamin	7 914,79 (± 2 566,33)	8 832,67 (± 2 475,26)	0,130
Kys. adipová	93 639,30 (± 19 305,67)	98 516,06 (± 10 593,10)	0,185
Kreatin	414 855,54 (± 100 129,74)	444 733,33 (± 98 329,90)	0,210
Tryptofan	75 840,66 (± 12 870,37)	71 938,48 (± 1 3716,55)	0,223
Iso-/leucin	46 331,37 (± 16 522,71)	50 641,21 (± 12 977,94)	0,223
Adenin	208 212,43 (± 44 745,61)	219 853,18 (± 36 331,27)	0,231
Alanin	9 162,12 (± 2 287,16)	9 821,76 (± 2 585,61)	0,262
Kys. močová	18 416,67 (± 11 654,81)	16 896,35 (± 8 212,53)	0,523
Cystin	13 257,83 (± 969,36)	13 426,36 (± 1 277,90)	0,539
Aspartat	5 438,97 (± 918,10)	5 558,92 (± 726,05)	0,541
Kys. palmitová	53 262,32 (± 20 906,23)	54 647,30 (± 8 844,53)	0,712
Kys. myristová	4 917,08 (± 2 478,17)	5 009,62 (± 1 479,14)	0,847

Poznámka: RS = skupina pacientů s roztroušenou sklerózou; C = kontrolní skupina;

SD = směrodatná odchylka; Kys. = kyselina

Tab. 6. Deskriptivní statistika srovnání koncentrací metabolitů u pacientů po první atace klinických symptomů RS ve srovnání s kontrolami

Metabolity	Arginin	Histidin	Cholin	Serin	Tyrosin	Spermidin	Glutamát	Kys. Olejová	Kys. Stearová	Kys. Linoleová
Průměr RS	3,971	7,020	1,044	2,271	1,103	0,037	1,888	8,797	2,774	3,130
Průměr K	5,235	8,165	1,228	2,592	1,253	0,031	2,119	8,394	3,158	3,393
Medián RS	3,688	7,040	1,023	2,369	1,038	0,038	1,900	8,742	2,971	3,094
Medián K	4,654	8,108	1,189	2,671	1,249	0,031	2,102	8,403	3,137	3,331
Směr. Od. RS	1,486	1,655	0,284	0,732	0,294	0,011	0,389	0,824	0,825	0,277
Směr. Od. K	1,958	1,716	0,369	0,605	0,279	0,006	0,384	0,523	0,623	0,228
Min. RS	0,561	2,493	0,304	0,922	0,540	0,005	0,941	7,224	1,079	2,587
Min. K	3,172	4,202	0,467	1,018	0,801	0,016	1,382	7,440	1,559	2,888
Max. RS	7,184	10,389	1,482	4,072	1,919	0,054	2,775	10,944	4,209	4,116
Max. K	10,531	12,289	1,928	3,822	1,783	0,045	3,431	9,441	4,623	3,792
T-value	-3,028	-2,850	-2,327	-2,02	-2,199	2,582	-2,509	2,493	-2,231	-4,384
P-value	0,004	0,006	0,023	0,047	0,031	0,012	0,014	0,015	0,029	0,001

Poznámka: RS = skupina pacientů s roztroušenou sklerózou; K = kontrolní skupina;

Směr. Od. = směrodatná odchylka; Min. = minimum; Max. = maximum; Kys. = kyselina

Tab. 7. Deskriptivní statistika ostatních metabolitů bez vypočtených koncentrací

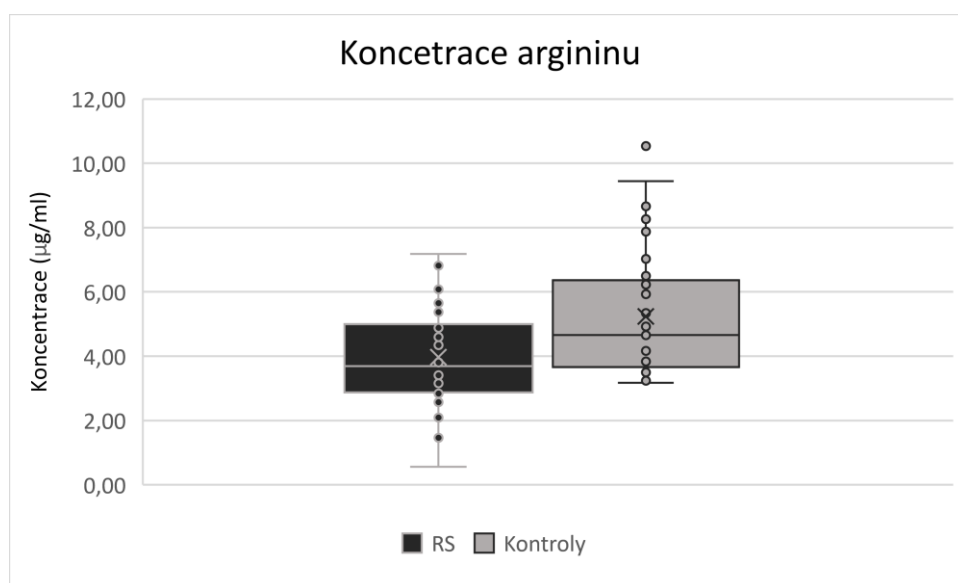
Metabolity	Průměr RS	Průměr K	Median RS	Median K	Směr od. RS	Směr od. K	Min. RS	Min. K	Max. RS	Max. K	T-value	P-value
Metionin	8504,86	6256,73	8300,5	6154,5	2293,06	896,85	5145,5	4811	13385	8451,5	5,573	<0,001
Homovanilová kys.	25611,18	29774,24	23860	28980	6850,19	8085,84	14365	16870	45280	48850	-2,321	0,024
Treonin	8363,92	9587,38	8235,25	9566,5	2797,24	2447,98	2823,5	3712	14440	15205	-1,965	0,053
Uridin	54333,68	73550,91	38017,5	57450	37916,23	46254,03	22045	25920	198700	205550	-1,897	0,063
Oxoglutarátová kys.	3671,48	3466,02	3723,25	3501	585,98	400,76	2146,5	2367,5	4895	4596,5	1,743	0,086
Serotonin	72399,12	36146,67	9551,25	8743	103619,34	70506,17	1712,5	2520	320850	257100	1,742	0,086
Biotin	18633,25	23614,50	16048,5	21000	10638,00	14333,83	6746,5	8544,5	55730	64085	-1,642	0,106
Palmitolejová kys.	16785,92	15807,12	16475	15215	2676,63	2426,12	13145	11885	26565	23495	1,616	0,111
Dopamin	7914,79	8832,67	7763	8593,5	2566,33	2475,26	2953,2	3885,5	14010	13225	-1,532	0,130
Adipová kys.	93639,30	98516,06	94880	100850	19305,67	10593,10	34793	75585	125400	115300	-1,342	0,185
Kreatin	414855,54	444733,33	408050	410100	100129,75	98329,90	137681	276200	599150	643850	-1,266	0,210
Tryptofan	75840,66	71938,48	73152,5	71055	12870,37	13716,55	44765	50455	108150	125350	1,230	0,223
Iso-/leucin	46331,37	50641,21	43487,5	48665	16522,71	12977,94	18580,5	24640	103235	83070	-1,229	0,223
Adenin	208212,43	219853,18	209750	227400	44745,61	36331,27	69291	111710	274900	294500	-1,209	0,231
Alanin	9162,12	9821,76	9099,5	9458	2287,16	2585,61	3653,2	6084	12945	15245	-1,131	0,262
Močová kys.	18416,67	16896,35	1890,66	1429,62	11654,81	8212,53	5335	4962,5	55645	43035	0,641	0,523
Cystin	13257,83	13426,36	13175	13210	969,36	1277,90	11430	11495	15665	17615	-0,619	0,539
Aspartat	5438,97	5558,92	5458,5	5516	918,10	726,05	2998,1	3500,5	7197,5	6946,5	-0,614	0,541
Palmitová kys.	53262,32	54647,30	60227,5	55413	20906,23	8844,53	10852	29667	78285	76128	-0,372	0,712
Myristová kys.	4917,08	5009,62	4617,75	4904	2478,17	1479,14	2557,5	2871,5	17821	8930,5	-0,194	0,847

Poznámka: RS = skupina pacientů s roztroušenou sklerózou; K = kontrolní skupina; Směr. Od. = směrodatná odchylka; Min. = minimum; Max. = maximum; Kys. = kyselina

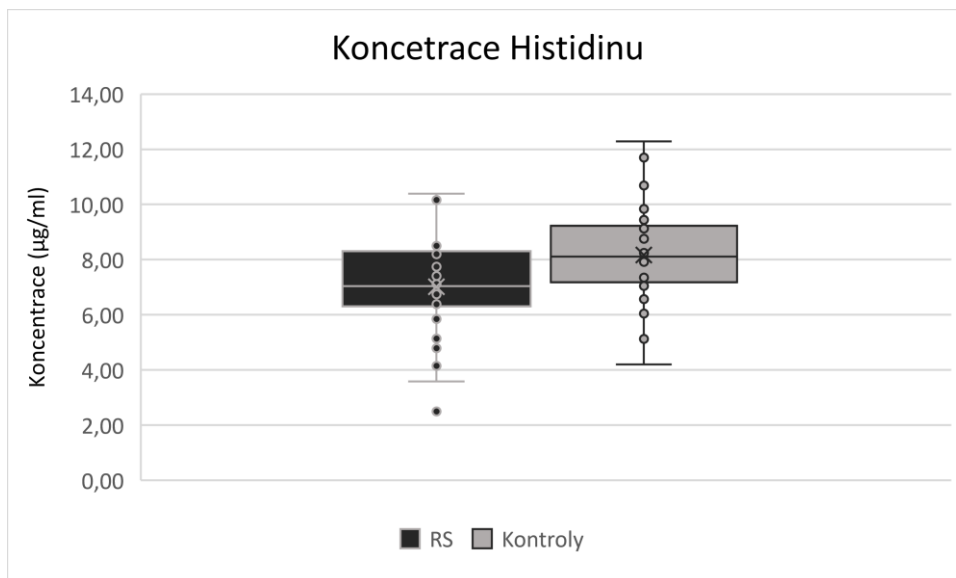
U pacientů s RS jsme pozorovali statisticky významný pokles různých metabolitů, vyjma jednoho s významným zvýšením koncentrace (spermidin). U argininu (p -value: 0,003), byly jeho koncentrace významně sníženy u osob s RS (průměrná koncentrace: 3,97 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 1). Histidin (p -value: 0,005) byl rovněž snížen u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 7,02 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 2). Glutamát (p -value: 0,015) byl také snížen u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 1,89 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 3). Stejně tak i cholin (p -value: 0,023) byl snížen u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 1,04 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolní skupinou

(graf 4). Další signifikantní změny byly pozorovány v případě tyrosinu (p -value: 0,031), kterého koncentrace byly snižené u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 1,10 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 5) a v případě serinu (p -value: 0,047), kterého koncentrace byly rovněž snižené u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 2,27 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 6). Jenom koncentrace spermidinu (p -value: 0,012) byly signifikantně zvýšené u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 0,04 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 7).

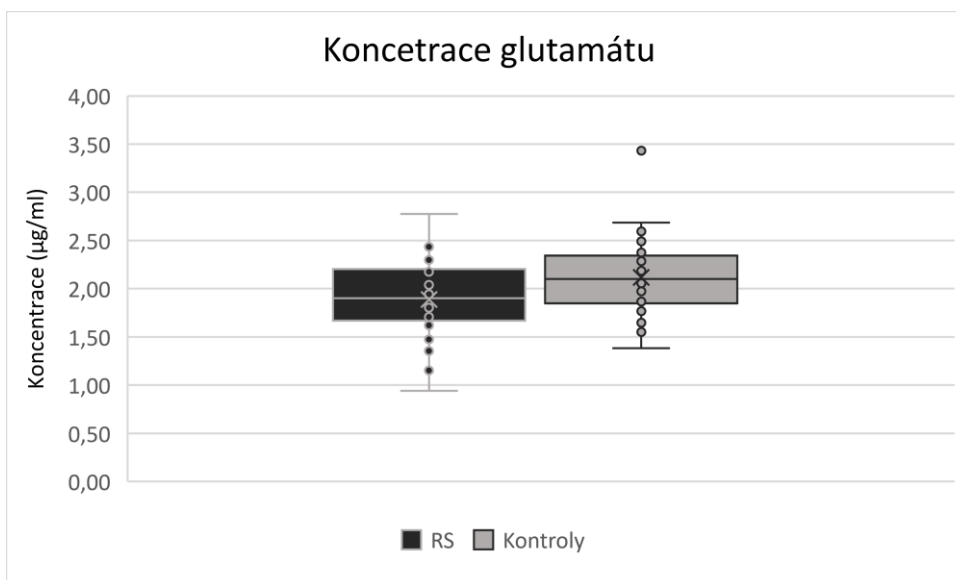
Signifikantní změny byly nalezeny u kyseliny linoleové (p -value: 0,001), jejíž koncentrace byly snižené u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 3,13 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 8) a v případě kyseliny stearové (p -value: 0,029), jejíž koncentrace byly taky snižené u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 2,77 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 9). V případě kyseliny olejové (p -value: 0,015) byly její koncentrace zvýšené u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 8,79 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání s kontrolami (graf 10).



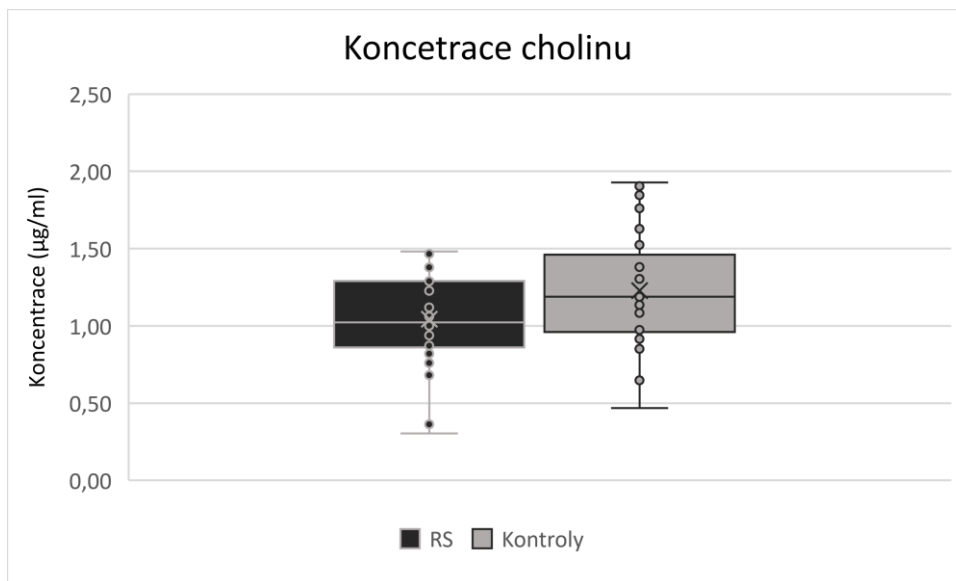
Graf 1. Srovnání koncentrací argininu u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou



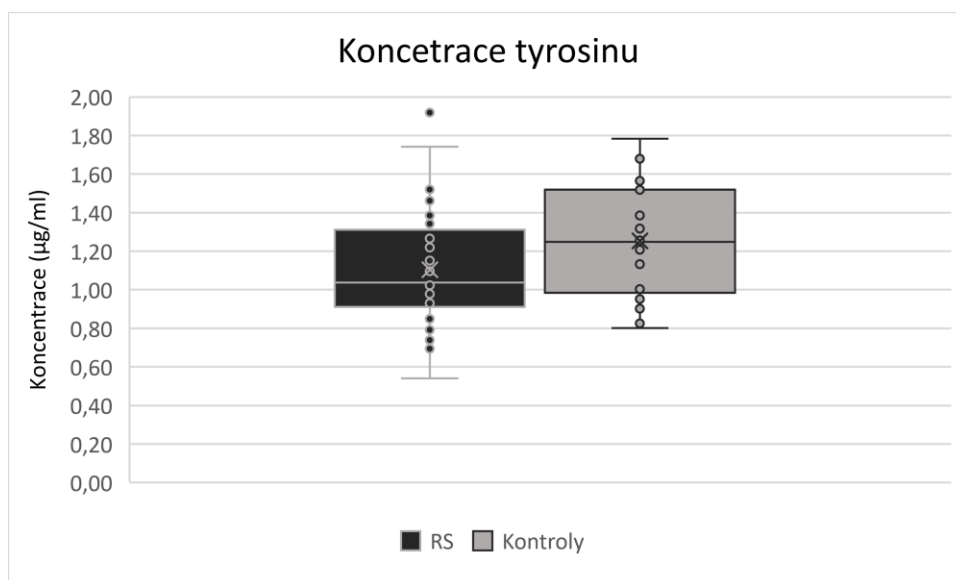
Graf 2. Srovnání koncentrací histidinu u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou



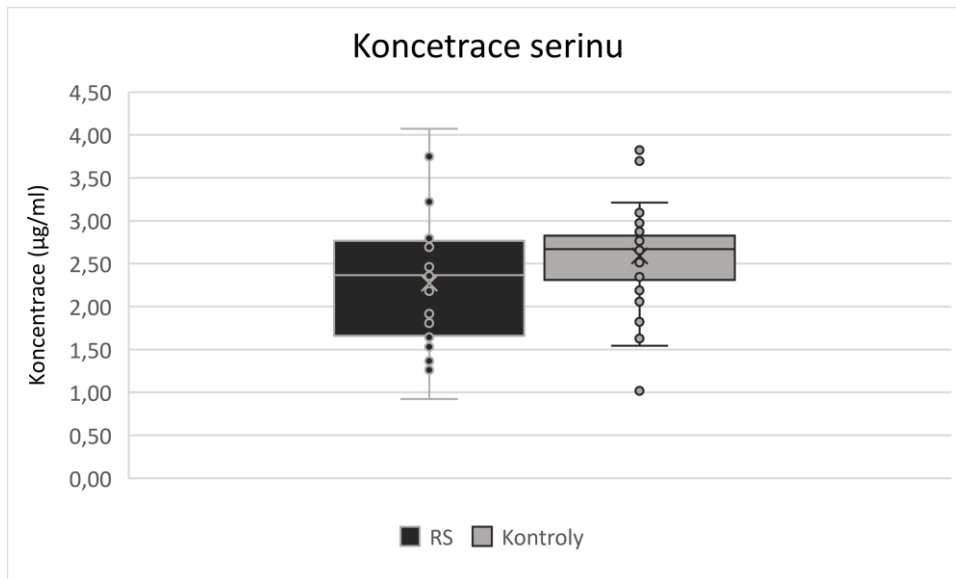
Graf 3. Srovnání koncentrací glutamátu u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou



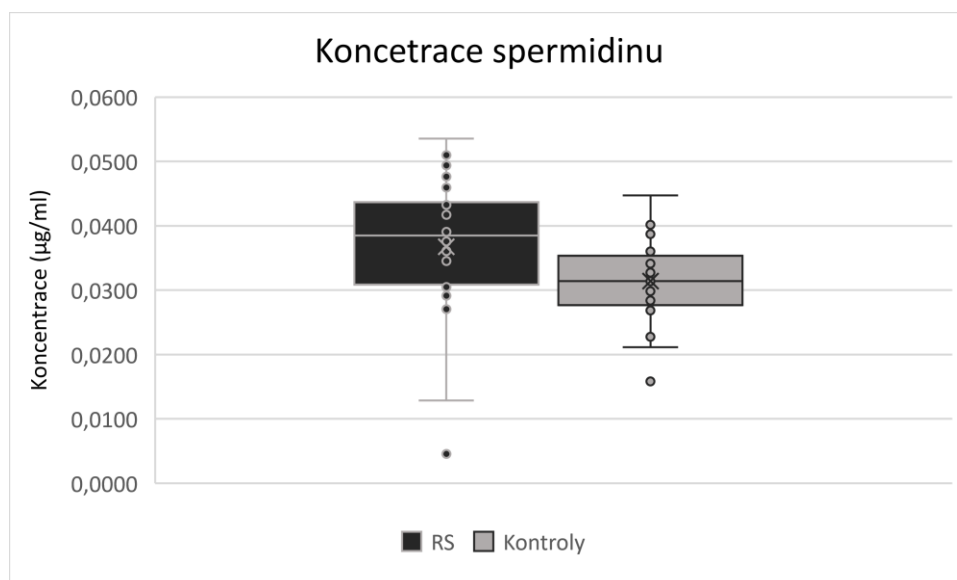
Graf 4. Srovnání koncentrací cholinu u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou



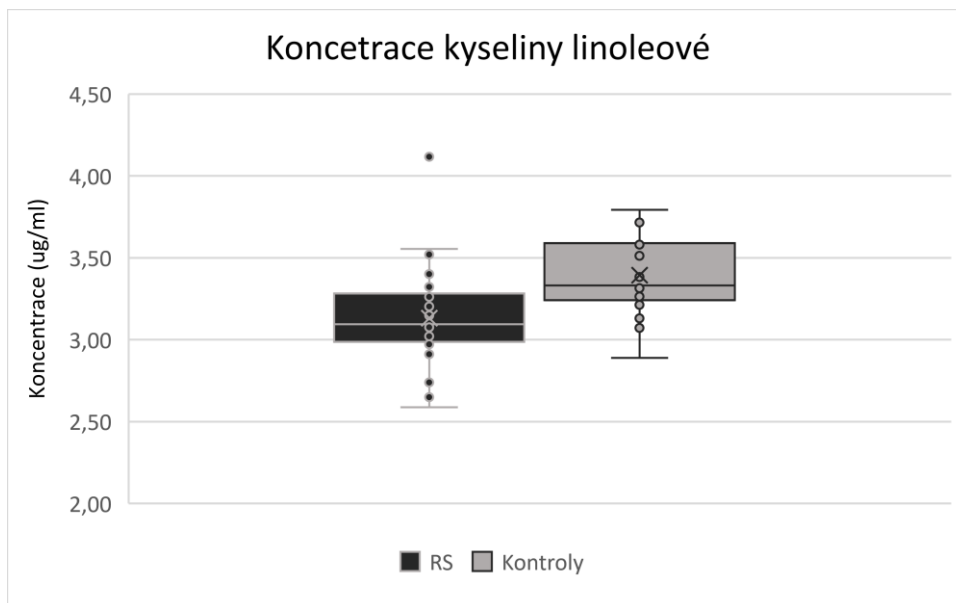
Graf 5. Srovnání koncentrací tyrosinu u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou



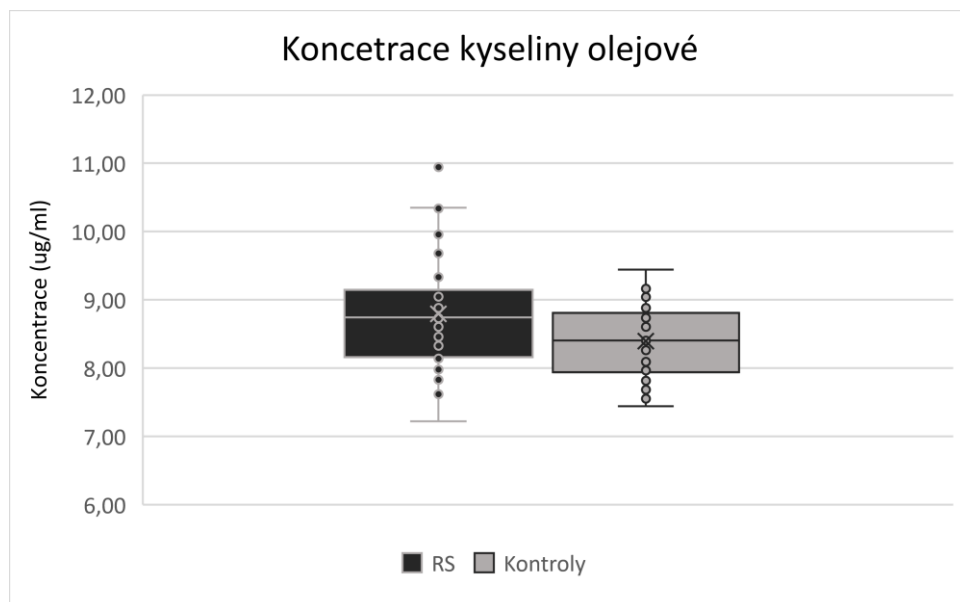
Graf 6. Srovnání koncentrací serinu u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou



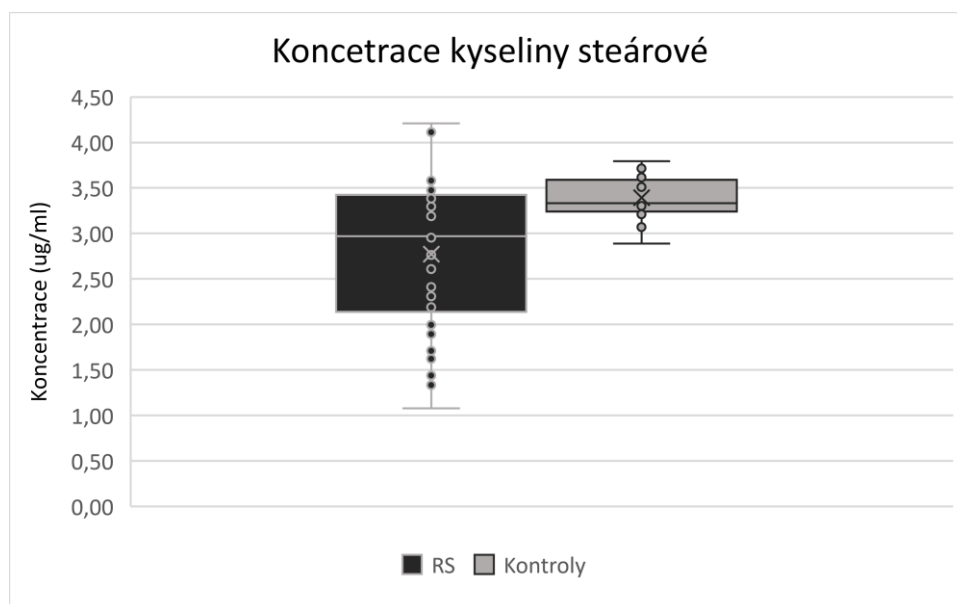
Graf 7. Srovnání koncentrací spermidinu u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou



Graf 8. Srovnání koncentrací kyseliny linoleové u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou



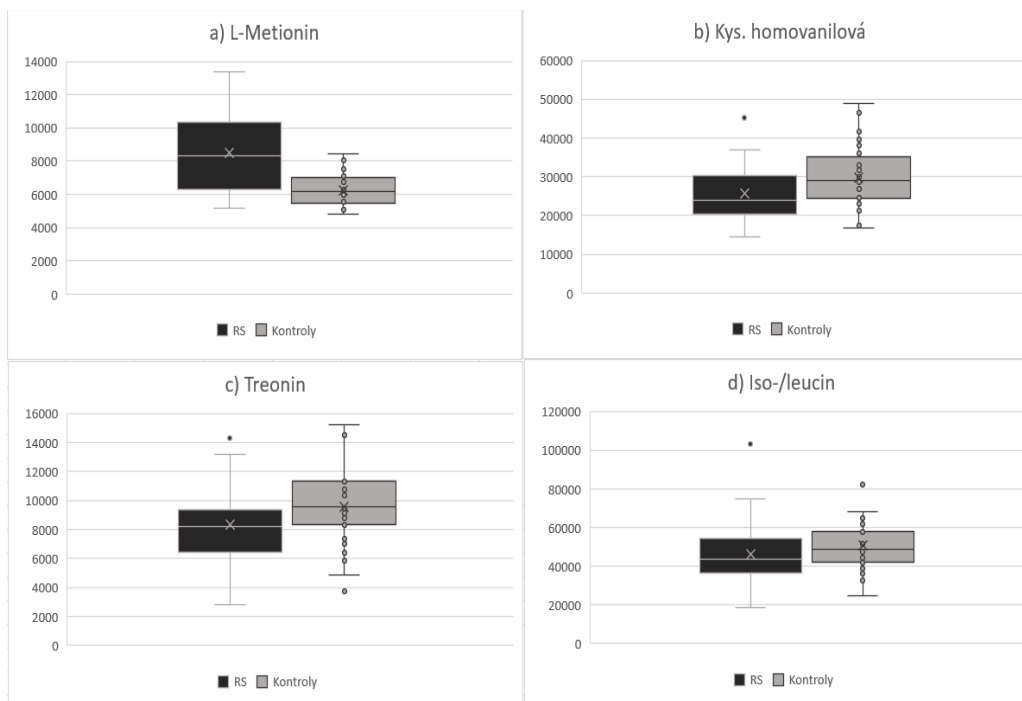
Graf 9. Srovnání koncentrací kyseliny stearové u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou



Graf 10. Srovnání koncentrací kyseliny olejové u pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy s kontrolní skupinou

V následujících případech jsme nebyli schopni vypočítat přesné koncentrace, ale i vzhledem k tomu jsme u následujících 2 metabolitů pozorovali statisticky signifikantní rozdíly. V případě metioninu (p -value: $<0,001$) jsme pozorovali statisticky významně zvýšené hladiny u pacientů s RS (průměrná odpověď: 8 504,86 (oblast píku)) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 11, A) a v případě kyseliny homovanilové (p -value: 0,023) jsme pozorovali statisticky významně snížené hladiny u pacientů s RS (průměrná odpověď: 25 611,18 (oblast píku)) ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 11, B).

Rozdíly hladin jiných aminokyselin jako treonin (p -value: 0,053; Graf 11, C)), leucin/izoleucin (p -value: 0,223; graf 11, D)), alanin (p -value: 0,262) nebo aspartát (p -value: 0,541) již nebyly statisticky signifikantní u skupiny pacientů s RS ve srovnání s kontrolní skupinou. Na rozdíl od našich pilotních výsledků (Židó et al., 2022) jsme tentokrát nepozorovali statisticky signifikantní změny v případě kyseliny palmitové (p -value: 0,711).

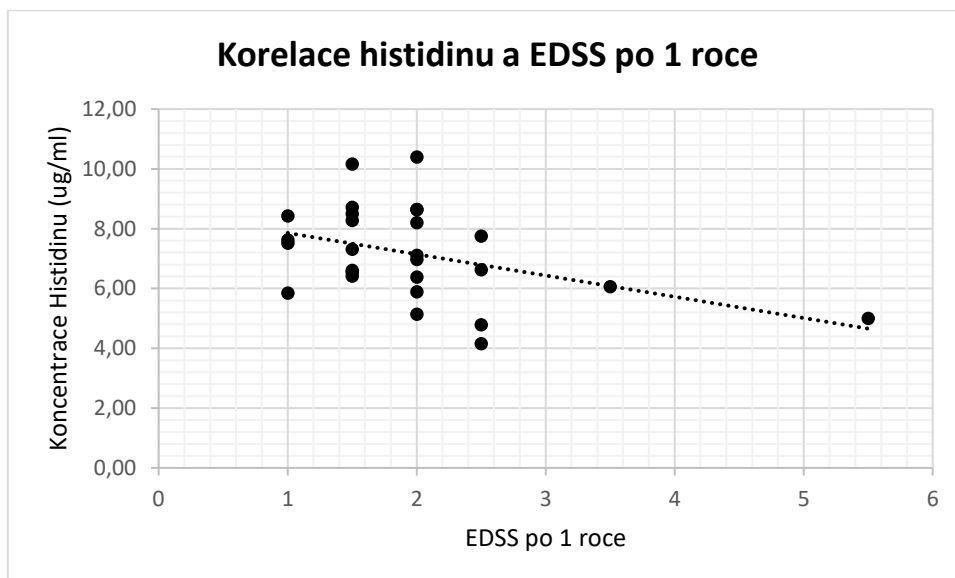


Graf 11. Srovnání nálezů jednotlivých metabolitů u pacientů po první atace roztroušené sklerózy s kontrolami. A) u metioninu; B) u kyseliny homovanilové; C) u treoninu; D) u iso-/leucinu

4.1.1 Korelace metabolické analýzy s hodnotami EDSS

Výsledky metabolické analýzy jsme následně korelovali s hodnotami EDSS pacientů po první atace klinických symptomů roztroušené sklerózy v době odběru mozkomíšního moku (v případech 40 pacientů), po 1 roce (v případech 31 pacientů) a po 2 letech (v případech 21 pacientů).

V případě histidinu jsme nepozorovali signifikantní korelaci mezi jeho koncentracemi a hodnotami EDSS v době odběru mozkomíšního moku (korelační koeficient: 0,05; p -value: 0,74), avšak v případě hodnot EDSS po 1 roce jsme již pozorovali středně silnou, statisticky signifikantní negativní korelaci (korelační koeficient: -0,42; p -value: 0,03) (graf 12). Ve srovnání s hodnotami EDSS po 2 letech přetrvává středně silná, statisticky signifikantní, negativní korelace s koncentracemi histidinu (korelační koeficient: -0,43; p -value: 0,048).



Graf 12. Korelace mezi hladinami histidinu v mozkomíšním moku pacientů skupiny s roztroušenou sklerózou a hodnotami EDSS po 1 roce

V případech argininu, spermidinu, glutamátu, cholinu, tyrosinu, serinu, kyseliny olejové, kyseliny stearové a kyseliny linoleové jsme nepozorovali statisticky signifikantní korelace s hodnotami EDSS v době odběru mozkomíšního moku, ani s hodnotami EDSS po 1 roce, ani s hodnotami EDSS po 2 letech. Detaily statistické korelační analýzy jednotlivých metabolitů jsou uvedeny v tabulce 8.

Tab. 8. Korelační statistická analýza koncentrací metabolitů s hodnotami EDSS

Metabolit	<i>r</i> EDSS	<i>p</i> -v EDSS	<i>r</i> EDSS	<i>p</i> -v EDSS	<i>r</i> EDSS	<i>p</i> -v EDSS
	0	0	1	1	2	2
Histidin	0,043	0,744	-0,415	0,031	-0,437	0,048
Arginin	-0,003	0,577	-0,104	0,604	-0,023	0,920
Spermidin	-0,163	0,329	-0,324	0,087	0,005	0,982
Glutamát	-0,212	0,202	-0,066	0,736	0,099	0,670
Cholin	-0,161	0,168	-0,288	0,130	0,080	0,729
Tyrozín	-0,177	0,288	-0,125	0,519	0,034	0,883
Serin	-0,150	0,375	-0,066	0,733	0,042	0,857
Kys. Olejová	-0,056	0,740	-0,202	0,292	-0,036	0,877
Kys. Stearová	-0,202	0,224	-0,051	0,792	0,369	0,100
Kys. Linoleová	-0,016	0,925	0,057	0,771	0,091	0,695

Poznámka: *r* = korelační koeficient; *p*-v = *p*-value; kys. = kyselina

4.1.2 Korelace metabolické analýzy s časem odběru likvoru od vzniku klinický obtíží

Výsledky metabolické analýzy jsme také korelovali s délkou rozvoje klinických obtíží do doby odběru mozkomíšního moku po první atace klinických symptomů RS. Tyto informace byly dostupné u celkem 38 pacientů.

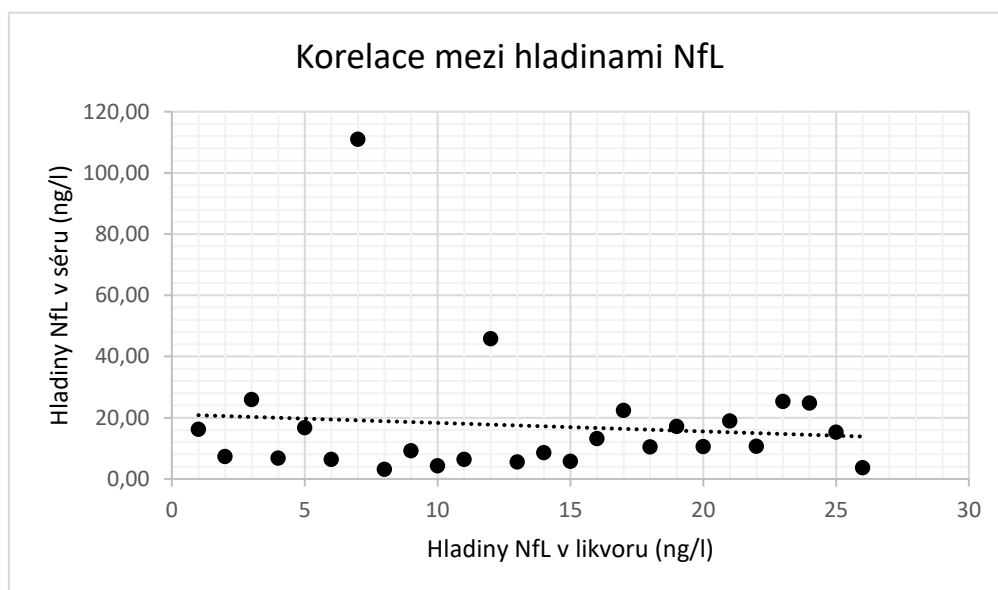
V případech argininu (korelační koeficient: 0,07; *p*-value: 0,70), histidinu (korelační koeficient: 0,03; *p*-value: 0,84), sperimidinu (korelační koeficient: 0,19; *p*-value: 0,27), glutamátu (korelační koeficient: 0,01; *p*-value: 0,94), cholinu (korelační koeficient: 0,20; *p*-value: 0,25), tyrosinu (korelační koeficient: -0,20; *p*-value: 0,23), serinu (korelační koeficient: 0,06; *p*-value: 0,75), kyseliny linoleové (*r*: 0,11; *p*-value: 0,54), kyseliny stearové (*r*: 0,13; *p*-value: 0,47) a kyseliny olejové (*r*: -0,14; *p*-value: 0,42) jsme neprokázali statisticky významnou korelaci mezi koncentracemi a dobou rozvoje klinických obtíží po odběru mozkomíšního mok.

4.2 Výsledky analýzy NfL a GFAP

Celkem 26 pacientů s RS podstoupilo dodatečně i vyšetření hladin NfL a GFAP v mozkomíšním moku a v séru. Průměrná hladina NfL byla v mozkomíšním moku 1 333,2 ng/l (rozsah 60 - 7240 ng/l) a v séru 17,33 ng/l (rozsah 3,12 - 111 ng/l). Průměrná hladina GFAP byla v mozkomíšním moku 6 636,66 ng/l (rozsah 511,2 – 15 992 ng/l) a v séru 77,73 ng/l (rozsah 36,09 - 231,7 ng/l).

4.2.1 Korelace hladin NfL a GFAP s hodnotami EDSS

Hladiny NfL v mozkomíšním moku pozitivně korelovaly s nálezy v séru (korelačním koeficientem 0,91; graf 13). U GFAP nebyla korelace mezi hladinami v mozkomíšním moku a v séru statisticky významná (korelační koeficient 0,32).

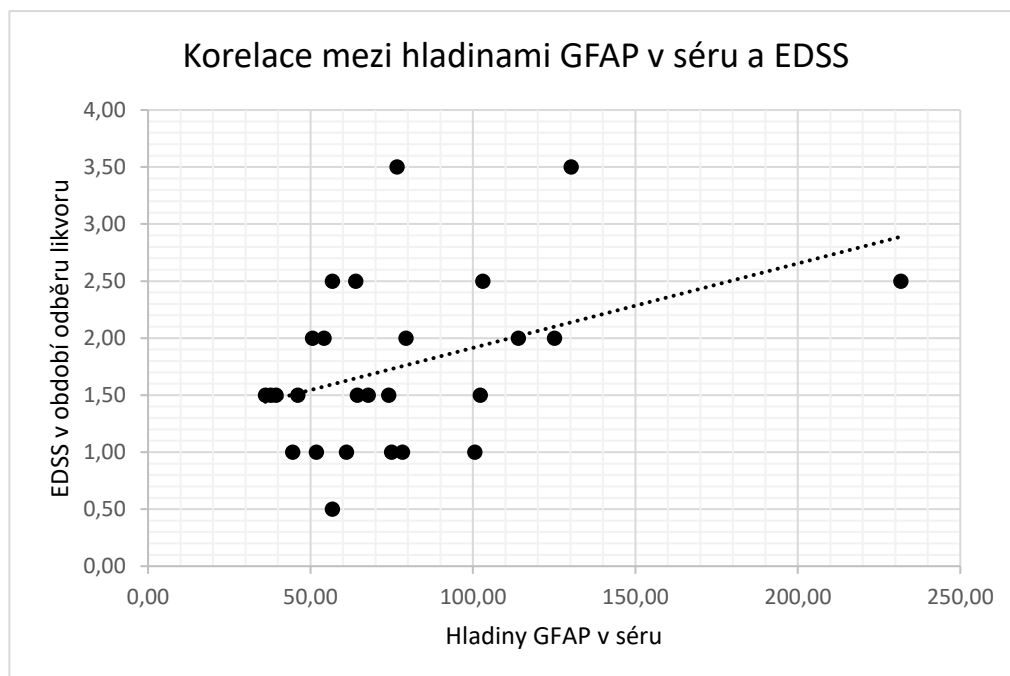


Graf 13. Korelace mezi hladinami NfL v mozkomíšním moku a v séru pacientů skupiny s roztroušenou sklerózou

Dále jsme koncentrace NfL a GFAP korelovali s hodnotami EDSS v době odběru mozkomíšního moku a po 1 roce. Pozorovali jsme pouze slabou pozitivní korelaci mezi hladinami NfL a GFAP v mozkomíšním moku a v séru s hodnotami EDSS v období odběru mozkomíšního moku. Nejsilnější pozitivní korelaci z této skupiny měla hladina GFAP v séru (korelační koeficient 0,40; p -value: 0,04) (graf 14), GFAP v mozkomíšním moku (korelační koeficient 0,36; p -value: 0,07), NfL v mozkomíšním moku (korelační koeficient 0,26; p -value: 0,20) a nejslabší pozitivní korelaci vykazovala hladina NfL v séru (korelační koeficient 0,24; p -value: 0,23). Pouze korelace s GFAP v séru je možno považovat za statisticky signifikantní korelaci vzhledem k hodnotě p -value pod 0,05.

V případě korelace jednotlivých hladin NfL a GFAP s hodnotami EDSS po 1 roce od odběru mozkomíšního moku jsme pozorovali pokles intenzity pozitivní korelace. Jedinou výjimkou byl případ hladin GFAP v mozkomíšním moku, který měl i nadále slabou pozitivní korelaci (korelační koeficient 0,30; p -value: 0,19). Tyto korelace s hodnotami EDSS po 1 roce vzhledem k hodnotám p -value nelze považovat za statisticky signifikantní. Detailní výsledky základní statistické

analýzy hladin NfL a GFAP pacientů skupiny s roztroušenou sklerózou jsou uvedeny v tabulce 9.



Graf 14. Korelace mezi hladinami GFAP v séru a hodnotami EDSS z období odběr mozkomíšního moku

Tab.9. Výsledky hladin NfL a GFAP pacientů skupiny s roztroušenou sklerózou

	Průměr	Medián	SD	Min	Max	r-EDSS-0	t-value	P-value	r-EDSS-1	t-value	P-value
NfL CSF	1333,20	776,0	1698,19	60,00	7240	0,258	1,306	0,204	-0,004	-0,018	0,986
NfL sérum	17,34	10,55	20,94	3,12	111,00	0,243	1,227	0,232	-0,065	-0,286	0,778
GFAP CSF	6636,66	5936,0	3309,72	511,2	15992	0,358	1,880	0,072	0,301	1,374	0,185
GfAP sérum	77,73	66,04	40,34	36,09	231,7	0,405	2,169	0,040	0,143	0,629	0,537

Poznámka: CSF = mozkomíšní mok; SD = směrodatná odchylka; Min = minimum; Max = maximum; r-EDSS-0 = korelační koeficient EDSS v době odběru likvoru; r-EDSS-1 = korelační koeficient EDSS po 1 roce od odběru likvoru

4.3 Výsledky evokovaných potenciálů a EP skóre

Celkem 31 pacientů s RS s průměrnou výškou 172 cm (rozsah 160 – 187 cm) absolvovalo vyšetření alespoň jednou modalitou evokovaných potenciálů. Vyšetření VEP bylo provedeno u 31 pacientů, SEP u 25 pacientů a vyšetření MEP u 14 pacientů. Všechny modalitty evokovaných potenciálů absolvovalo celkem 14 pacientů. Detaily jednotlivých výsledků evokovaných potenciálů u pacientů s RS jsou uvedeny v tabulce 10.

Tab. 10. Výsledky evokovaných potenciálů pacientů s roztroušenou sklerózou

ID	SEP-R (ms)			SEP-L (ms)			MEP-HKR (ms)		MEP-HKL (ms)		MEP-DKR (ms)		MEP-DKL (ms)		VEP (ms)	
	N20	CCT	P40	N20	CCT	P40	CxM	CMCT	CxM	CMCT	CxM	CMCT	CxM	CMCT	P100-R	P100-L
1	19,8	5,7	40,3	20,6	6,8	41,5	-	-	-	-	-	-	-	-	95,5	113,3
2	17,1	5,2	36	17,1	5,2	38,3	-	-	-	-	-	-	-	-	112	124
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,3	162,3
4	17,9	5,8	41,3	17,5	5,2	41,6	-	-	-	-	-	-	-	-	115,5	94,5
5	18,5	5,4	47,3	18,9	5,9	43,5	-	-	-	-	-	-	-	-	103,5	103,8
6	18,5	4,1	55	19,6	5,5	50,9	19,7	10,2	21,5	12,3	48,7	29,4	45,6	26,4	133,8	137,3
7	25,9	11,9	49,1	22,3	7,2	52,8	-	-	-	-	-	-	-	-	133,5	128,3
8	18,5	5,7	42,5	18,8	5,8	43,1	18,2	8	18,2	8	40,2	15,2	38,8	15,4	110	110
9	19,1	3,7	44,8	20	6,2	42,4	-	-	-	-	-	-	-	-	133	127
10	19,8	7,4	39,1	22	9,1	47	-	-	-	-	-	-	-	-	117,3	147
11	18,6	5,6	37,5	18,6	6,6	38,5	17,5	8,6	15,9	6,7	34,5	12,9	35,8	13,3	106,8	103,8
12	21,3	6,9	47,5	20,1	5,7	47,8	-	-	-	-	-	-	-	-	106	105,3
13	19,3	5,4	38,9	19	5	38,4	20,1	9,5	20,9	9,1	36,2	17	40	20,5	97,5	139,5
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	138,8	131,3
17	18,3	5,3	40,6	17,8	4,5	43	15,1	6,9	15,5	6,7	38	17,4	38,2	18,2	101,3	99,8
19	19,2	-	49,1	21,5	-	51,3	18,5	6,4	18,3	7,5	37,4	13,6	38,2	15,8	108	115
20	6,3	18,3	38	6,3	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	105	107,3
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	114	126
23	17,5	5,5	40,6	17,4	5,6	40,8	16,6	7,4	16,8	7,5	33,8	14,5	35,4	17,2	100,8	102
25	19,4	5,9	43,9	19,1	5,6	44,8	-	-	-	-	-	-	-	-	117,3	127,8
26	22,3	6	56,1	25,1	9,6	54,5	18,8	6,3	19,8	5,6	45,9	14,5	13,5	13,5	105	107
27	21,9	8,9	49,5	18,5	5,9	48,6	24,3	12,9	23,3	11,5	35,1	22	34,3	17,6	102	112,8
28	20,4	6,9	41,5	20,6	7	37,8	21,2	9,4	19,8	7,7	39,8	18,2	39,6	17,8	119,3	118,5
29	18,6	5,1	39,1	19	6,9	39,8	21,5	8,1	21,5	8,5	27	15,1	27,6	14,7	99,3	99,3
31	18,6	5,1	41,5	17,9	4,8	41,3	20,4	8	21,75	9,25	28,45	15,8	29,55	15	106	107,3
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	108,3	115,5
35	20,6	7,3	59,6	22,3	6,5	52	23,7	13	23,3	12,1	46,4	23,6	50,9	30,2	113,5	113,5
36	20	5,4	48,1	20	6,5	42,8	-	-	-	-	-	-	-	-	141,8	110,5
37	17,9	5,4	39,3	17,6	5,2	41,2	-	-	-	-	-	-	-	-	128,3	132,8
38	20,3	6,3	52,4	20,5	7	47,4	23,8	14,6	21,1	10,9	49,8	27,1	50,1	26,9	122,5	126,3
40	20,8	6,9	42,3	20,5	8	42,4	21	8,4	22,5	9,5	29,5	13,6	28,9	15,7	100,5	120,3

Poznámka: ID = identifikační číslo; R = pravý; L = levý; HKR = pravá horní končetina; HKL = levá horní končetina; DKR = pravá dolní končetina; DKL = levá dolní končetina

Po extrakci latencí jednotlivých odpovědí byly tyto hodnoty transformované s ohledem na normativní hodnoty naší laboratoře. V případě SEP a MEP byly výsledky upravené s ohledem na výšku jednotlivých pacientů. Po získání

jednotlivých z-skór byly nejprve vypočteny EP skóre jednotlivých modalit (qVEP, qSEP, qMEP). Průměrná hodnota qVEP byla 1,52 (rozsah -3,90 až 8,18) u 31 vyšetřených osob. Průměrná hodnota qSEP byla 1,23 (rozsah -2,07 až 6,13) u 25 vyšetřených osob. Průměrná hodnota qMEP byla 3,07 (rozsah 0,55 až 7,08) u 14 vyšetřených osob. Následně byly vypočteny EP skóre qEPS a q3EPS. U 14 osob byla průměrná hodnota qEPS byla 1,14 (rozsah -1,08 až 5,46) a průměrná hodnota q3EPS byla 3,27 (rozsah 0,78 až 3,27). Detaily jednotlivých EP skór pacientů s RS jsou uvedeny v tabulce 11.

Tab. 11. Celkové EP skóre pacientů s roztroušenou sklerózou

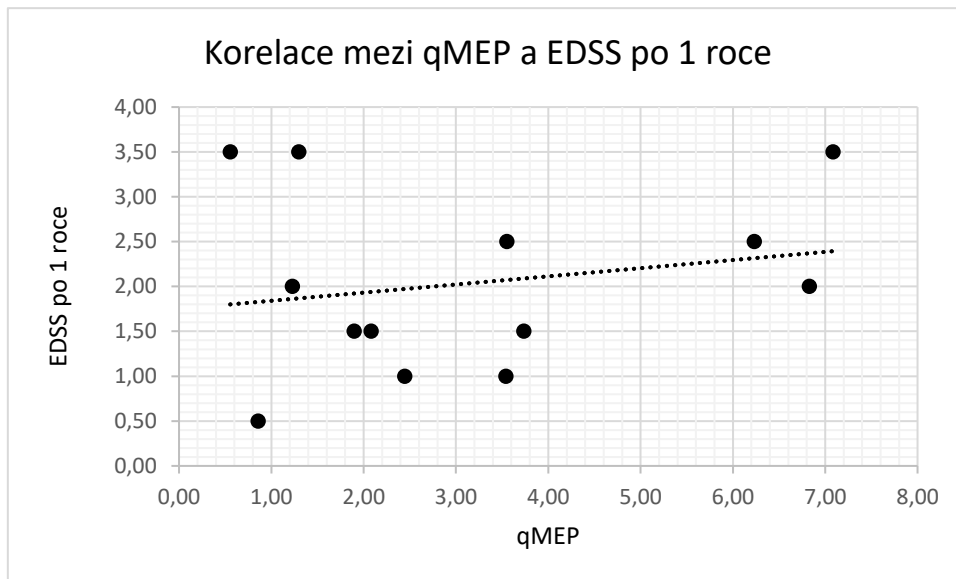
ID	qVEP	qSEP	qMEP	qEPS	q3EPS
1	-2,20	-0,09	-	-	-
2	2,33	-2,07	-	-	-
3	6,60	-	-	-	-
4	-2,00	-0,29	-	-	-
5	-2,45	1,12	-	-	-
6	8,18	4,25	6,23	5,46	7,39
7	6,63	4,25	-	-	-
8	-0,33	0,04	2,44	-0,33	2,17
9	6,33	0,60	-	-	-
10	7,05	1,93	-	-	-
11	-1,90	-0,67	1,89	-1,00	1,35
12	-1,78	2,66	-	-	-
13	2,50	-0,55	3,55	0,66	2,38
14	8,02	-	-	-	-
17	-3,48	-0,09	1,64	-1,03	1,72
19	0,17	-	-	-	-
20	-1,62	-	-	-	-
22	3,00	-	-	-	-
23	-3,20	-0,06	2,08	-0,61	2,20
25	3,85	0,71	-	-	-
26	-1,67	6,13	0,55	1,00	3,56
27	-1,20	3,01	3,74	2,74	4,58
28	2,63	0,02	3,54	0,91	2,37
29	-3,90	-0,51	1,23	-1,08	0,95
31	-1,45	-0,63	0,85	-0,87	0,78
33	0,30	-	-	-	-
35	0,83	5,52	6,83	4,83	7,97
36	5,05	1,43	-	-	-
37	6,52	-0,26	-	-	-
38	4,47	3,49	7,08	4,96	7,08
40	-0,20	0,80	1,30	0,39	1,35

Poznámka: ID = identifikační číslo

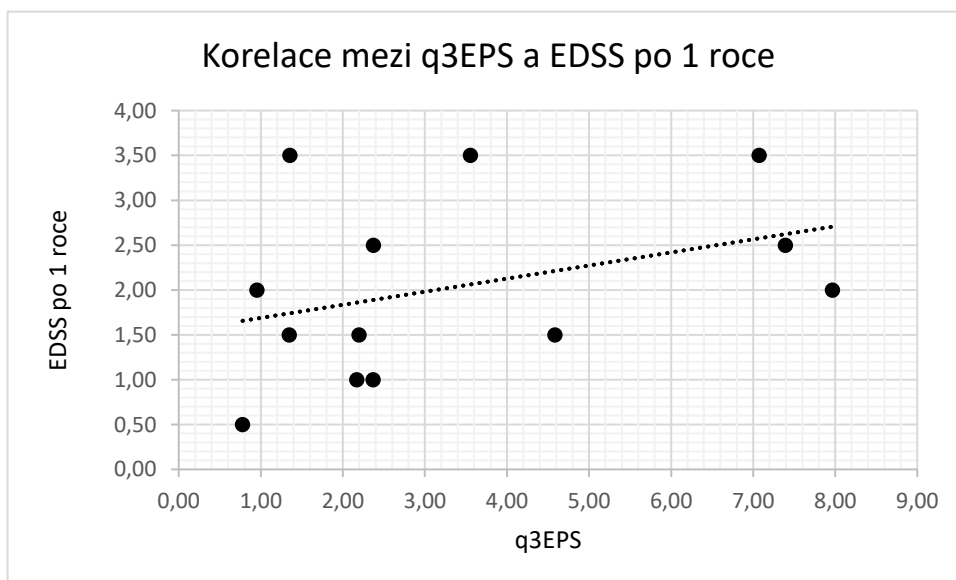
4.3.1 Korelace mezi evokovanými potenciály a hodnotami EDSS

Při korelaci jednotlivých EP skór s hodnotami EDSS z odběru mozkomíšního moku pacientů s RS jsme objevili střední pozitivní korelaci v případě qMEP, q3EPS a qEPS a slabou až nevýznamnou pozitivní korelaci v případech qSEP a qVEP. Nejlépe s hodnotami EDSS korelovaly qMEP s korelačním koeficientem 0,66 (p -value: 0,01) a q3EPS s korelačním koeficientem 0,60 (p -value: 0,02). O něco méně korelovaly s hodnotami EDSS qEPS s korelačním koeficientem 0,54 (p -value: 0,05), dále pak qSEP s korelačním koeficientem 0,28 (p -value: 0,18) a nejslaběji s hodnotami EDSS korelovaly qVEP s korelačním koeficientem 0,04 (p -value: 0,81). Korelace qMEP a q3EPS s hodnotami EDSS v období odběru mozkomíšního moku lze, vzhledem k hodnotám p -value, považovat za statisticky signifikantní.

Při korelaci jednotlivých EP skór s hodnotami EDSS po 1 roce od odběru mozkomíšního moku pacientů s RS jsme objevili významnější korelaci. V případě qMEP a q3EPS se jedná o silnou pozitivní korelaci. Nejvíce s hodnotami EDSS po 1 roce korelovaly qMEP s korelačním koeficientem 0,75 (p -value: 0,003) (graf 15) a q3EPS s korelačním koeficientem 0,68 (p -value: 0,011) (graf 16). qEPS korelovalo s hodnotami EDSS po 1 roce s korelačním koeficientem 0,65 (p -value: 0,017), méně koreloval qSEP s korelačním koeficientem 0,48 (p -value: 0,031) a nejslaběji koreloval s hodnotami EDSS po 1 roce qVEP s korelačním koeficientem 0,34 (p -value: 0,08). Korelace qMEP, q3EPS, qEPS a qSEP s hodnotami EDSS po 1 roce lze vzhledem k hodnotám p -value považovat za statisticky signifikantní.



Graf 15. Korelace mezi hodnotami qMEP a EDSS po 1 roce u skupiny pacientů s roztroušenou sklerózou



Graf 16. Korelace mezi hodnotami q3EPS a EDSS po 1 roce u skupiny pacientů s roztroušenou sklerózou

Korelaci jednotlivých EP skór s EDSS hodnotami po 2 letech od odběru mozkomíšního moku pacientů s RS nelze validně provést vzhledem k malému množství pacientů, kteří absolvovali vyšetření evokovanými potenciály a zůstali minimálně 2 roky v dispenzarizaci specializovaného centra pro RS.

Detailní výsledky základní statistické analýzy EP skór pacientů s RS jsou uvedeny v tabulce 12.

Tab. 12. Základní statistická analýza EP skóre a korelace s EDSS

	Průměr	Medián	SD	Min	Max	r- EDSS- 0	t- value	P- value	r- EDSS- 1	t- value	P- value
qVEP	1,519	0,300	3,753	-3,900	8,180	0,043	0,234	0,816	0,350	1,830	0,080
qSEP	1,229	0,601	2,090	-2,070	6,130	0,277	1,382	0,180	0,482	2,333	0,031
qMEP	3,068	2,261	2,133	0,550	7,080	0,656	3,011	0,011	0,747	3,728	0,003
qEPS	1,144	0,526	2,296	-1,080	5,460	0,536	2,197	0,048	0,648	2,818	0,017
q3EPS	3,274	2,284	2,401	0,780	3,270	0,598	2,583	0,024	0,675	3,038	0,011

Poznámka: SD = směrodatná odchylka; Min = minimum; Max = maximum; r-EDSS-0 = korelační koeficient EDSS v době odběru likvoru; r-EDSS-1 = korelační koeficient EDSS po 1 roce od odběru likvoru

5. Diskuze

Hlavním cílem této práce bylo nalézt rozdíly v koncentracích metabolitů v mozkomíšním moku u pacientů v počátečních stádiích RS ve srovnání se zdravými kontrolami. Tyto rozdíly jsme následně objasnili také z patofyziologického hlediska. Dalším cílem této práce bylo zhodnotit význam hladin GFAP, NfL a nálezů evokovaných potenciálu u pacientů v počátečních stádiích RS. Provedli jsme také korelace mezi výsledky jednotlivých analýz a hodnotami EDSS v době odběru mozkomíšního moku, po 1 roce a po 2 letech.

Mozkomíšní mok je jedním z nejdůležitějších biologických materiálů, které nám mohou pomoci v pochopení patofyziologie RS. Lze ho využít pro měření rozpustných analytů, jako jsou například aminokyseliny, mastné kyseliny či neurotransmitery, nebo populací buněk, nejčastěji ze skupiny leukocytů. Mozkomíšní mok se taky považuje i za jakýsi „zlatý standard“ matrix v diagnóze RS (Deisenhammer et al., 2019), vzhledem k tomu, že odráží aktuální stav CNS při zánětlivých procesech. Vzhledem k malému množství proteinů tento materiál nevyžaduje speciální preparaci před laboratorní analýzou. Značnou nevýhodou tohoto materiálu však nadále zůstává fakt, že jeho odběr je invazivní, a proto se opakované nebo kontrolní odběry provádějí zřídka.

Při náborů pacientů do této studie jsme pozorovali nepoměr mezi množstvím mužů a žen. Této studie se účastnilo celkem 57 žen a jen 16 mužů. Tento nepoměr může být vysvětlen několika faktory. Roztroušená skleróza se vyskytuje až 2-3x častěji u žen než u mužů (Harbo et al., 2013). Dalším faktorem je také ochota vyhledat lékařskou pomoc a absolvovat různá vyšetření. V poslední řadě se ženy také častěji podílejí na těchto studiích než muži.

Několik autorů v posledních letech prezentovalo nálezy metabolomiky mozkomíšního moku u pacientů s roztroušenou sklerózou (Murgia et al., 2023; Yan et al., 2021; Fitzgerald et al., 2021; Sylvestre et al., 2020; Podlecka-Piętowska et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Kasakin et al., 2019; Park et al., 2016; Cocco et al., 2015; Reinke et al., 2014; Gonzalo et al., 2012; Sinclair et al., 2010; Srinivasan et al., 2005), avšak jejich výsledky byly vyvozené ze vzorků nehomogenních skupin pacientů. Jednalo se o pacienty s RS v různých stádiích nemoci (často již v

pozdějších stádiích), s rozdílnou DMD terapií a různou farmakologickou či osobní anamnézou. To vše mohlo ovlivnit složení mozkomíšního moku těchto pacientů. V této práci jsme se snažili vytvořit homogenní skupinu pacientů s RS a homogenní kontrolní skupinu. Zaměřili jsme se na pacienty v počátečních stádiích RS, přesněji po první atace klinických symptomů splňujících revidovaná McDonaldova kritéria z roku 2017 (Thompson et al., 2018). Pacienti neužívali psychofarmaka ani DMD terapii nebo vysoké dávky kortikosteroidů v době odběru mozkomíšního moku. Někteří autoři zavzali do kontrolních skupin pacienty s různými neurologickými nemocemi, v některých případech i nemocné se zánětlivými onemocněními CNS, jako například s meningoencefalitidou, která může významně ovlivnit složení mozkomíšního moku. V této práci jsme kontrolní skupinu sestavili na podkladě definice symptomatických kontrol dle publikace z roku 2013 (Teunissen et al., 2013). Jednalo se o pacienty s nespecifickými subjektivními obtížemi (poruchy čítí, bolesti hlavy a závratě s negativním klinickým i paraklinickým nálezem), neodpovídající žádnému známému neurologickému onemocnění. Za silnou stránku této práce považujeme naši snahu o vytvoření striktně homogenní skupiny pacientů v počátečních stádiích RS a kontrolní skupinu bez interferujících faktorů.

Někteří autoři hodnotili i metabolomiku séra (Fitzgerald et al., 2021; Levi et al., 2021; Signoriello et al., 2020) a objevili snížené hladiny aminokyselin u pacientů s RS. Část autorů popisovala snížené hladiny fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu (Fitzgerald et al., 2021; Signoriello et al., 2020) a jiní autoři zas asparaginu a karnitinu (Levi et al., 2021). V této práci jsme se zaměřili pouze na mozkomíšní mok, proto tyto výsledky nemůžeme relevantně zhodnotit nebo srovnat.

V rámci hlavního cíle této práce jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíly v metabolomice mozkomíšního moku u pacientů s RS ve srovnání s kontrolní skupinou. Nejvýznamnější rozdíly byly nalezeny ve skupině aminokyselin a mastných kyselin, přesněji v případech argininu, histidinu, spermidinu, glutamátu, cholinu, tyrosinu, serinu, metioninu, kyseliny homovanilové, kyseliny stearové, kyseliny olejové a kyseliny linoleové. Tyto metabolity by se mohly stát novými biomarkery v počátečních stádiích RS.

Jednu z nejsignifikantnějších změn jsme pozorovali v případě l-argininu. Aminokyselina l-arginin je prekurzor oxidu dusnatého (NO), důležitého neurotransmiteru, který hraje roli v různých metabolických procesech (Tapiero et al., 2002). Předpokládá se, že oxid dusnatý hraje roli i v patogenezi RS (Smith et al., 2002). Za běžných podmínek je tento neurotransmiter syntetizován z l-argininu pomocí endoteliální NO syntázy (eNOS) nebo neuronální NO syntázy (nNOS). Tyto formy enzymu produkují nízké koncentrace oxidu dusnatého cestou závislou na koncentracích kalcia. V místech zánětu (akutní/ aktivní léze u roztroušené sklerózy) však dochází k aktivaci jiné formy enzymu, takzvané inducibilní NO syntázy (iNOS). Tato forma enzymu produkuje vysoké koncentrace oxidu dusnatého nezávisle na koncentracích kalcia (Alderton et al., 200; Koprowski et al., 1993). U roztroušené sklerózy byly nalezeny zvýšené koncentrace oxidu dusnatého hlavně v oblastech aktivních lézí (Smith et al., 2002; Encinas et al., 2005). V důsledku toho mohou snížené hladiny l-argininu odpovídat zvýšené depleci prekurzoru u akutně probíhajícího zánětu, kde dochází k tvorbě vysokých koncentrací oxidu dusnatého pomocí inducibilní NO syntázy. V naší práci jsme necíleným přístupem objevili signifikantně snížené hladiny l-argininu u pacientů s RS. Tento nálezn je ve shodě s ostatními publikovanými nálezy (Reine et al., 2014; Park et al., 2016; Kasakin et al., 2019; Sylvestre et al., 2019). Můžeme spekulovat o tom, že l-arginin je vhodný biomarker aktivity onemocnění v počátečních stádiích RS, kdy v patogeneze nemoci dominuje zánětlivá složka, která má za následek zvýšenou spotřebu l-argininu k tvorbě oxidu dusnatého. Bylo by zajímavé srovnat tento nálezn s nálezy u jiných typů zánětu CNS, například u autoimunitní nebo infekční encefalidity.

Aminokyselina histidin je prekurzorem neurotransmiteru histaminu. Histamin je běžně syntetizován v histaminergních neuronech tuberomamilárního jádra v zadní třetině hypotalamu. Hraje důležitou roli v zánětlivých procesech a tím i v patogenezi RS, avšak tato role ještě nebyla blíže určena (Jadidi-Niaragh et al., 2010). Na základě animálních modelů se předpokládá, že zvýšené hladiny histaminu jsou spojeny se zvýšenou syntézou prozánětlivých cytokinů, TNF a interferonu gamma (Mussio et al., 2006). Existuje také hypotéza, že histamin a histidin jsou podstatným faktorem v rozvoji únavy u pacientů s RS (Loy et al., 2016). Jedna studie objevila snížené hladiny histidinu v séru pacientek s RS, které trpěly únavou

ve srovnání s pacientkami bez únavy (Loy et al., 2019). Několik studií našlo zvýšené hladiny histaminu v mozkomíšním moku pacientů s RS (Molnár et al., 1966; Tuomisto et al., 1983; Kallweit et al., 2013), co může podpořit vysvětlení snížené hladiny histidinu zvýšenou spotřebou prekurzoru pro syntézu histaminu. V této práci jsme našli snížené hladiny histidinu u pacientů v počátečních stádiích RS, což bylo ve shodě s výsledky jiných autorů (Sylvestre et al., 2020; Kasakin et al., 2019; Park et al., 2016; Reinke et al., 2014). Dále jsme pozorovali i střední negativní korelaci mezi koncentracemi histidinu a hodnotami EDSS po 1 roce a 2 letech od odběru mozkomíšního moku. S ohledem na to můžeme spekulovat o prognostickém potenciálu histidinu v počátečních stádiích RS, přesněji řečeno o jeho schopnosti predikovat hodnoty EDSS a tím i klinický stav pacienta v následujícím roce až 2 letech této nemoci. Nižší koncentrace histidinu mohou být indikátorem horšího průběhu nemoci s výraznější deteriorací stavu a horším únavovým syndromem a mohou tak vést k zahájení účinnější terapie již v počátečních stádiích nemoci.

Přírodní polyamin spermidin je nutný pro proliferaci, diferenciaci a přežití buněk (Igarashi et al., 2009). Ve spojitosti s roztroušenou sklerózou byl zatím popsán pouze v experimentálních zvířecích modelech (Yang et al., 2016). Hladiny spermidinu v mozkomíšním moku pacientů s RS zatím nebyly publikovány. V naší práci jsme objevili významně zvýšené hladiny spermidinu u pacientů s RS ve srovnání s kontrolami. Spermidin inhibuje syntézu prozánětlivých cytokinů a jeho zvýšené hladiny mohou být obrannou reakcí organismu proti autoimunitnímu zánětu. Vztah spermidinu a autoimunitních nemocí však ještě nebyl plně objasněn.

Glutamátová excitotoxicita je jedním z patofyziologických procesů řady neurologických onemocnění, včetně roztroušené sklerózy, který se podílí na poškozování axonů (Stojanovic et al., 2014). S ohledem na to můžeme spekulovat, že hladina glutamátu představuje marker axonální degenerace u roztroušené sklerózy. V několika studiích byla publikována zvýšená hladina glutamátu v mozkomíšním moku pacientů s RS (Oliveria et al., 2019; Pieragostino et al., 2015). V naší práci jsme naopak našli významně snížené hladiny glutamátu v mozkomíšním moku pacientů s RS. Tento rozdíl může být způsoben tím, že naše skupina pacientů s RS byla v počátečních stádiích nemoci, kdy demyelinizace často

převažuje nad axonální degenerací. Jiní autoři se zaměřili na pozdější stadia nemoci, kdy je proces axonální degenerace více vyjádřený (Oliveria et al., 2019; Pieragostino et al., 2015). V průběhu axonální degenerace dochází k poškozování a destrukci axonů, což vede k uvolnění glutamátu do extracelulárního prostoru a tím i do mozkomíšního moku (Hinzman et al., 2010), proto zvýšené hladiny glutamátu se budou objevovat spíše v pozdějších stadiích RS anebo budou typické pro případy, kde již od začátku převládá proces axonální degenerace.

Cholin je další aminokyselina, které koncentrace jsme pozorovali snížené v mozkomíšním moku u pacientů s RS. Naše nálezy se na jedné straně shodovaly s některými autory (Podlecka-Pietowska et al., 2013), avšak na druhé straně jiní autoři popisovali zcela opačné nálezy (Srinivasan et al., 2005; Reinke et al., 2014; Cocco et al., 2016). Aminokyselina cholin slouží jako prekurzor CDP-cholinu (citicholin, cytidin 5'-difosfocholin), který se podílí na tvorbě fosfatidylcholinu. CDP-cholinu se v posledních letech přisuzují neuroprotektivní a regenerační funkce (Skripuletz et al., 2015). U roztroušené sklerózy se spekuluje, že CDP-cholin je schopný podporovat proces remyelinizace (Gudi et al., 2023). Vzhledem k tomu hladina cholinu může teoreticky odrážet schopnost remyelinizace u jednotlivých pacientů s RS, co taky může vysvětlit rozdílné výsledky mezi jednotlivými výše zmíněnými publikacemi. Efekt podávání CDP-cholinů pacientům s RS jako způsob podpory procesu remyelinizace byl zatím testován pouze na zvířecích modelech, avšak se slibnými výsledky (Skripuletz et al., 2015).

Aminokyseliny serin a tyrosin mají neuroprotektivní funkci a byly nalezené ve snížených koncentracích v mozkomíšním moku u RS (Sylvestre et al., 2020). U RS se serin podílí na regulaci cytokinů s protizánětlivým účinkem a tím ochraňuje myelin a podporuje remyelinizaci (Ye et al., 2021). Tyrozin hraje důležitou roli v proliferaci, růstu a regeneraci neuronů (Lau et al., 1999). Snížené hladiny serinu mohou ukazovat na větší náchylnost k poškození myelinu. U tyrozinu tyto nízké hladiny naznačují oslabení schopnosti reparace a regenerace poškozených neuronů. V naší práci jsme také pozorovali snížené hladiny serinu a tyrosinu u pacientů s RS.

Leucin/izoleucin a větvené aminokyseliny byly další analyty, které měly sníženou hladinu u pacientů s RS (Sylvestre et al., 2020; Kasakin et al., 2019; Park et al., 2016; Reinke et al., 2014). Leucin/izoleucin má důležitou roli v syntéze

proteinů a v růstu a proliferaci buněk jako klíčový dárce dusíku. V průběhu zánětu dochází ke zvýšení syntézy řady rozdílných proteinů a také ke zvýšení tvorby imunitních buněk, což znamená zvýšenou poptávku po větvených aminokyselinách. Tato zvýšená poptávka vede k snížení jejich hladin. V naší práci jsme rovněž pozorovali lehce snížené hladiny leucinu/izoleucinu u pacientů s RS, avšak tyto nálezy nebyly statisticky signifikantní.

Myelinová pochva je nezbytná struktura pro správnou a rychlou neuronální transmissi signálů ve formě akčních potenciálů (Morrel et al., 1999). Myelin je tvořen převážně lipidy, proteiny a mastnými kyselinami. U RS dochází různými patofyziologickými procesy k demyelinizaci, k poškození a rozkladu myelinu na jeho základní komponenty. Demyelinizace může vést k zvýšení hladin mastných kyselin v extracelulárním prostoru a tím i v mozkomíšním moku. V průběhu procesu remyelinizace očekáváme pokles hladin mastných kyselin v extracelulárním prostoru a mozkomíšním moku vzhledem k jejich spotřebě oligodendrocyty při pokusu o reparaci a znovu vytvoření myelinové pochvy (Mathieu et al., 2019). Na základě toho lze spekulovat o tom, že hladiny mastných kyselin v mozkomíšním moku odrážejí proces demyelinizace a remyelinizace u pacientů s RS. Zvýšené hladiny mastných kyselin naznačují převládající demyelinizaci, snížené hladiny mastných kyselin poukazují na převládající proces remyelinizace (Morrel et al., 1999). Někteří autoři popisují zvýšené hladiny kyseliny olejové, linoleové a stearové v mozkomíšním moku pacientů s RS (Park et al., 2016; Oliveira et al., 2019). Jiní autoři naopak pozorovali u pacientů s RS snížené hladiny těchto mastných kyselin (Gonzalo et al., 2012). Rozdílné výsledky a lze vyvětlit heterogenitou pacientů s RS v časných a pozdních stádiích nemoci s různým zastoupením procesů demyelinizace a remyelinizace. V naší práci jsme se zaměřili výhradně na pacienty v časných stádiích RS bez specifické terapie, kdy může převládat proces remyelinizace, který vede k poklesu hladin mastných kyselin v mozkomíšním moku.

V rámci jedné z provedených analýz jsme korelovali koncentrace jednotlivých metabolitů s hodnotami EDSS v době odběru mozkomíšního moku, po 1 roce a po 2 letech u skupiny pacientů s RS. Statisticky významnou korelaci jsme pozorovali pouze v případě histidinu. V případě dalších metabolitů jsme

statisticky významné korelace s hodnotami EDSS nepozorovali. Rovněž jsme korelovali koncentrace jednotlivých metabolitů v čase od rozvoje symptomů po odběr mozkomíšního moku u pacientů s RS, ale u žádného z metabolitů jsme statisticky signifikantní nenalezli.

U části pacientů s RS jsme hodnotili výsledky vyšetření multimodálními evokovanými potenciály a zaměřili se na jejich vztah k hodnotám EDSS s jejich potenciální schopností předvídat vývoj klinického stavu v následujících letech. Ke zjednodušení hodnocení vztahů mezi výsledky EP a hodnotami EDSS byly nejprve tyto výsledky převedeny do formy kvantitativních EP skóre (Schlaeger et al., 2014). V případech SEP a MEP byly výsledky i dodatečně upravené vzhledem k výškám jednotlivých pacientů. Již několik autorů zkoumalo a potvrdilo prognostický potenciál evokovaných potenciálů u pacientů s RS (Hardmeier et al., 2022; Dziadkowiak et al., 2022, Alsharidah et al., 2022; Hardmeier et al., 2021; Iodice et al., 2016; Ramanathan et al., 2013). Z výsledků naší korelační analýzy jsme zjistili, že vyšetření MEP a kvantitativní 3 EP skóre (q3EPS) nejlépe reflektují aktuální hodnoty EDSS a tím i aktuální klinický stav pacienta. Vyšetření VEP dle našich výsledků odráží hodnoty EDSS nejhůře, což může být vysvětleno vyšetřením jen velice malé části CNS. V případě MEP, q3EPS a qEPS jsme pozorovali statisticky signifikantní pozitivní korelaci s hodnotami EDSS po 1 roce od odběru mozkomíšního moku. Naše nálezy jsou ve shodě s výsledky dříve uvedených autorů. Tyto výsledky ukazují, že vyšetření MEP a q3EPS (sestaveno z výsledků vyšetření MEP pro horní a dolní končetiny a výsledků vyšetření SEP pro dolní končetiny) odrážejí aktuální hodnoty EDSS a mají i určitý prognostický potenciál, resp. mohou předvídat vývoj klinického stavu v následujících letech. K potvrzení této hypotézy bude třeba vyšetřit větší vzorek pacientů v delším časovém rozpětí.

U části pacientů s RS jsme se zabývali hodnocením vztahu hladin lehkých řetězců neurofilament a gliálního fibrilárního acidického proteinu v séru a mozkomíšním moku s hodnotami EDSS. Pozorovali jsme pouze hraničně signifikantní lehkou pozitivní korelaci mezi koncentracemi GFAP v séru a hodnotami EDSS v době odběru mozkomíšního moku. U NfL v séru a v likvoru a GFAP v likvoru jsme nepotvrdili žádnou statisticky významnou korelaci s hodnotami EDSS. V případě srovnání s hodnotami EDSS po 1 roce od odběru

biologického materiálu jsme neprokázali statisticky významnou korelaci ani s NfL ani s GFAP v likvoru či séru. Publikované výsledky jiných autorů zabývajících se NfL a GFAP jsou rozporuplné. Někteří autoři obhajují významný prognostický potenciál NfL (Thebault et al., 2020) a GFAP (Axelssib et al., 2011) u RS, jiní prognostický potenciál NfL u RS neprokázali (Axelssib et al., 2011). Tyto rozdíly lze vysvětlit patofyziologickými procesy roztroušené sklerózy. NfL (jde o cytoskeletální strukturu axonů) odráží proces axonální neurodegenerace a GFAP (jde o cytoskeletální strukturu astrocytů) ukazují na poškození astrocytů.

6. Závěr dizertační práce

Metabolomika jako část multi-omických studií představuje slibný zdroj nových biomarkerů. U roztroušené sklerózy nám tyto nové biomarkery pomáhají lépe porozumět patofyziologii nemoci, předvídat průběh nemoci i efektivitu léčby. Předpokládáme, že hladiny argininu odrážejí akutní zánětlivé procesy u RS. U histidinu uvažujeme o prognostickém potenciálu v časných stádiích RS se schopností předvídat další rozvoj klinického stavu v následujících letech. Glutamát ukazuje na proces neurodegenerace u RS a cholin poukazuje na remyelinizační schopnost. Mastné kyseliny reprezentují různé zastoupení procesů demyelinizace a remyelinizace. Spermidin, ještě nepopsán ve spojitosti s RS, může poukazovat na protizánětlivé možnosti organismu, hlavně ve spojitosti s autoimunitním zánětem.

Neurofyziologické metody, přesněji multimodální evokované potenciály, i když již nesehrávají v diagnostickém procesu RS tak důležitou roli jakou měly v minulosti, mají u RS stále svůj význam. V naší práci jsme ukázali, že motorické a somatosenzorické evokované potenciály ukazují aktuální hodnoty EDSS a tím i daný klinický stav pacienta. Mají určitý prognostický potenciál a schopnost předvídat vývoj disability RS v následujících letech.

Lehké řetězce neurofilament lze považovat za marker neuronálního poškození, gliální fibrilární acidický protein je ukazatelem poškození astrocytů. Oba jsou v poslední době v popředí zájmu ve výzkumu biomarkerů roztroušené sklerózy, ale v naší práci jsme neprokázali jejich významnou spojitost s hodnotami EDSS ani jejich prognostický potenciál v počátečních stádiích RS.

Všechny naše nálezy bude třeba ověřit na větší skupině pacientů s RS a porovnat výsledky s nálezy u jiných neurologických onemocnění, abychom mohli zhodnotit jejich specifický přínos pro RS.

6.1 Zhodnocení cílů a hypotéz dizertace

1. Složení mozkomíšního moku u pacientů v počátečních stádiích RS je ve srovnání s kontrolami z hlediska hladin aminokyselin signifikantně rozdílné.

2. Signifikantní rozdíly v mozkomíšním moku pacientů v počátečních stádiích RS jsou v hladinách argininu, histidinu, spermidinu, glutamátu, cholinu, kyseliny olejové, kyseliny stearové, kyseliny linoleové, serinu a tyrosinu.

3. Histidin prokazoval signifikantní středně silnou negativní korelaci při korelaci koncentrací metabolitů s hodnotami EDSS po 1 a 2 letech.

4. Evokované potenciály odrážejí aktuální klinický stav pacienta s RS v podobě hodnot EDSS a představují určitý prognostický marker.

7. Souhrn

V práci ukazujeme, že metabolické studie a multimodální evokované potenciály mohou představovat validní zdroj nových laboratorních a funkčních biomarkerů v počátečních stádiích roztroušené sklerózy (RS). S jejich pomocí lépe porozumíme patofyziologii a průběhu této nemoci, pochopíme reparační a regenerační kapacitu organismu a budeme schopni předvídat vývoj nemoci.

Arginin, který patří mezi laboratorní biomarkery, může reflektovat zánětlivé procesy u RS. Glutamát poukazuje na proces neurodegenerace. Cholin odráží remyelizační schopnosti organismu. Snížené hladiny serinu mohou signalizovat větší náchylnost k poškození myelinu. U tyrozinu tyto nízké hladiny naznačují oslabení schopnosti reparace a regenerace poškozených neuronů. Mastné kyseliny reprezentují různé zastoupení v procesech demyelinizace a remyelinizace.

Z hlediska funkčních laboratorních biomarkerů jsou důležité multimodální evokované potenciály, zejména motorické a somatosenzorické evokované potenciály, které odrážejí aktuální klinický stav pacienta s RS.

Nejlepší prognostický potenciál mají hladiny histidinu a motorické evokované potenciály, které mohou předvídat vývoj klinického stavu pacientů s RS i v následujících letech. Na základě těchto informací bude možné ovlivnit další léčbu včetně nasazení agresivnější terapie.

8. Summary

In this work, we show that metabolomic studies and multimodal evoked potentials can represent a valid source of new laboratory and functional biomarkers in the initial stages of multiple sclerosis (MS). With their help, we will better understand the pathophysiology and course of this disease, we will understand the reparative and regenerative capacity of the organism and we will be able to predict the development of the disease.

Arginine, which is among the laboratory biomarkers, can reflect inflammatory processes in MS. Glutamate points to the process of neurodegeneration. Choline reflects the body's remyelinating abilities. Reduced serine levels may signal greater susceptibility to myelin damage. For tyrosine, these low levels indicate a weakening of the ability to repair and regenerate damaged neurons. Fatty acids represent different representations in the processes of demyelination and remyelination.

From the point of view of functional laboratory biomarkers, multimodal evoked potentials are important, especially motor and somatosensory evoked potentials, which reflect the current clinical condition of a patient with MS.

Histidine levels and motor evoked potentials have the best prognostic potential, which can predict the development of the clinical condition of MS patients even in the following years. Based on this information, it will be possible to influence further treatment, including the deployment of more aggressive therapy.

9. Použitá literatura

- 1) Ahlgren C, Odén A, Lycke J. High nationwide prevalence of multiple sclerosis in Sweden. *Mult Scler.* 2011 Aug;17(8):901-8.
- 2) Al Jumah M, Kojan S, Al Khathaami A, Al Abdulkareem I, Al Blawi M, Jawhary A. Familial multiple sclerosis: does consanguinity have a role? *Mult Scler.* 2011 Apr;17(4):487-9.
- 3) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.
- 4) Alsharidah MM, Uzair M, Alseneidi SS, Alkharan AA, Bunyan RF, Bashir S. The Role of Transcranial Magnetic Stimulation as a Surrogate Marker of Disease Activity in Patients with Multiple Sclerosis: A Literature Review. *Innov Clin Neurosci.* 2022 Jan-Mar;19(1-3):8-14.
- 5) Andersen SL, Briggs FBS, Winnike JH, Natanzon Y, Maichle S, Knagge KJ, Newby LK, Gregory SG. Metabolome-based signature of disease pathology in MS. *Mult Scler Relat Disord.* 2019 Jun;31:12-21.
- 6) Axelsson M, Malmeström C, Nilsson S, Haghighi S, Rosengren L, Lycke J. Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2011 May;258(5):882-8.
- 7) Baker JB, Larson SJ, Sances A, White PT. Evoked potentials as an aid to the diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology* 1968;18:286.
- 8) Berkovich RR. Acute Multiple Sclerosis Relapse. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 2016 Jun;22(3):799-814.
- 9) Bertrams J, Kuwert E, Liedtke U. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Tissue Antigens.* 1972;2(5):405-8.

- 10) Bittner S, Oh J, Havrdová EK, Tintoré M, Zipp F. The potential of serum neurofilament as biomarker for multiple sclerosis. *Brain*. 2021 Nov 29;144(10):2954-2963.
- 11) Cabre P, Signate A, Olindo S, Merle H, Caparros-Lefebvre D, Béra O, Smadja D. Role of return migration in the emergence of multiple sclerosis in the French West Indies. *Brain*. 2005 Dec;128(Pt 12):2899-910.
- 12) Calabresi PA, Radue EW, Goodin D, Jeffery D, Rammohan KW, Reder AT, Vollmer T, Agius MA, Kappos L, Stites T, Li B, Cappiello L, von Rosenstiel P, Lublin FD. Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2014 Jun;13(6):545-56.
- 13) Carlsson H, Abujrais S, Herman S, Khoonsari PE, Åkerfeldt T, Svenningsson A, Burman J, Kultima K. Targeted metabolomics of CSF in healthy individuals and patients with secondary progressive multiple sclerosis using high-resolution mass spectrometry. *Metabolomics*. 2020 Feb 12;16(2):26.
- 14) Cocco E, Murgia F, Lorefice L, Barberini L, Poddighe S, Frau J, Fenu G, Coghe G, Murru MR, Murru R, Del Carratore F, Atzori L, Marrosu MG. (1)H-NMR analysis provides a metabolomic profile of patients with multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015 Dec 24;3(1):e185.
- 15) Cree BAC, Hartung HP, Barnett M. New drugs for multiple sclerosis: new treatment algorithms. *Curr Opin Neurol*. 2022 Jun 1;35(3):262-270.
- 16) De Silvestri A, Capittini C, Mallucci G, Bergamaschi R, Rebuffi C, Pasi A, Martinetti M, Tinelli C. The Involvement of HLA Class II Alleles in Multiple Sclerosis: A Systematic Review with Meta-analysis. *Dis Markers*. 2019 Nov 6;2019:1409069.
- 17) Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019 Apr 12;10:726.

- 18) Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015 Sep 15;15(9):545-58. doi: 10.1038/nri3871. Epub 2015 Aug 7.
- 19) 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; Swiss Multiple Sclerosis Cohort Study Group. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2017 Jun;81(6):857-870.
- 20) Dumitrescu L, Papathanasiou A, Coclitu C, Garjani A, Evangelou N, Constantinescu CS, Popescu BO, Tanasescu R. An update on the use of sphingosine 1-phosphate receptor modulators for the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2023 Mar;24(4):495-509.
- 21) Dziadkowiak E, Wieczorek M, Zagrajek M, Chojdak-Łukasiewicz J, Gruszka E, Budrewicz S and Pokryszko-Dragan A (2022) Multimodal Evoked Potentials as Potential Biomarkers of Disease Activity in Patients With Clinically Isolated Syndrome. *Front. Neurol.* 12:678035.
- 22) Efendi H. Clinically Isolated Syndromes: Clinical Characteristics, Differential Diagnosis, and Management. *Noro Psikiyatrs Ars.* 2015 Dec;52(Suppl 1):S1-S11.
- 23) Encinas JM, Manganas L, Enikolopov G. Nitric oxide and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2005 May;5(3):232-8.
- 24) Fialová L, Barilly P, Štětkářová I, Bartoš A, Noskova L, Zimova D, Židó M, Hoffmanova I. Impaired intestinal permeability in patients with multiple sclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2023 Aug 11.

- 25) Fitzgerald KC, Smith MD, Kim S, Sotirchos ES, Kornberg MD, Douglas M, Nourbakhsh B, Graves J, Rattan R, Poisson L, Cerghet M, Mowry EM, Waubant E, Giri S, Calabresi PA, Bhargava P. Multi-omic evaluation of metabolic alterations in multiple sclerosis identifies shifts in aromatic amino acid metabolism. *Cell Rep Med*. 2021 Oct 19;2(10):100424.
- 26) Fogdell-Hahn A, Ligers A, Grønning M, Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens*. 2000 Feb;55(2):140-8.
- 27) Ford H. Clinical presentation and diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Med (Lond)*. 2020 Jul;20(4):380-383.
- 28) Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci*. 2002 Sep;3(9):705-14.
- 29) Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* Jul 2014, 83 (3) 278-286.
- 30) Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2014 Apr;10(4):225-38. doi: 10.1038/nrneurol.2014.37. Epub 2014 Mar 18.
- 31) Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009 May;132(Pt 5):1175-89.

- 32) Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Soelberg Sørensen P, Vermersch P, Chang P, Hamlett A, Musch B, Greenberg SJ; CLARITY Study Group. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010 Feb 4;362(5):416-26.
- 33) Giovannoni G, Tomic D, Bright JR, Havrdová E. "No evident disease activity": The use of combined assessments in the management of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017 Aug;23(9):1179-1187.
- 34) Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI, Dawson KT; DEFINE Study Investigators. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012 Sep 20;367(12):1098-107.
- 35) Goldsmith JR. Vitamin D as an Immunomodulator: Risks with Deficiencies and Benefits of Supplementation. *Healthcare (Basel)*. 2015 Apr 14;3(2):219-32.
- 36) Gonzalo H, Brieva L, Tatzber F, Jové M, Cacabelos D, Cassanyé A, Lanau-Angulo L, Boada J, Serrano JC, González C, Hernández L, Peralta S, Pamplona R, Portero-Otin M. Lipidome analysis in multiple sclerosis reveals protein lipoxidative damage as a potential pathogenic mechanism. *J Neurochem*. 2012 Nov;123(4):622-34.
- 37) Gudi V, Grieb P, Linker RA, Skripuletz T. CDP-choline to promote remyelination in multiple sclerosis: the need for a clinical trial. *Neural Regen Res*. 2023 Dec;18(12):2599-2605.
- 38) Halawani AT, Zeidan ZA, Kareem AM, Alharthi AA, Almalki HA. Sociodemographic, environmental and lifestyle risk factors for multiple sclerosis development in the Western region of Saudi Arabia. A matched case control study. *Saudi Med J*. 2018 Aug;39(8):808-814.
- 39) Halliday AM, McDonald WI, Mushin J. Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet* 1972;1:982–985.

- 40) Harbo HF, Gold R, Tintoré M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013 Jul;6(4):237-48.
- 41) Hardmeier M, Fuhr P. Multimodal Evoked Potentials as Candidate Prognostic and Response Biomarkers in Clinical Trials of Multiple Sclerosis. *J Clin Neurophysiol*. 2021 May 1;38(3):171-180
- 42) Hardmeier M, Leocani L, Fuhr P. A new role for evoked potentials in MS? Repurposing evoked potentials as biomarkers for clinical trials in MS. *Mult Scler*. 2017 Sep;23(10):1309-1319.
- 43) Hardmeier M, Schlaeger R, Lascano AM, Toffolet L, Schindler C, Gobbi C, Lalive P, Kuhle J, Kappos L, Fuhr P. Prognostic biomarkers in primary progressive multiple sclerosis: Validating and scrutinizing multimodal evoked potentials. *Clin Neurophysiol*. 2022 May;137:152-158.
- 44) Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med*. 2020 Dec;133(12):1380-1390.e2.
- 45) Havrdova E, Horakova D, Kovarova I. Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis: key clinical trial results and considerations for use. *Ther Adv Neurol Disord*. 2015 Jan;8(1):31-45.
- 46) Havrdova E., Piřha J. KLINICKÝ DOPORUČENÝ POSTUP PRO DIAGNOSTIKU A LÉČBU ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY A NEUROMYELITIS OPTICA A ONEMOCNĚNÍ JEJÍHO ŠIRŠÍHO SPEKTRA, 2020 March
- 47) Havrdova E, Arnold DL, Bar-Or A, et al. Evaluation of no evidence of progression or active disease (NEPAD) in patients with relapsing multiple sclerosis in the OPERA I and OPERA II trials. Presented at 3rd Congress of the European Academy of Neurology, 24–27 June 2017, Amsterdam, The Netherlands. Oral presentation PR1092.

- 48) Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jul;14(7):463-77.
- 49) Hess CW, Mills KR, Murray NM. Measurement of central motor conduction in multiple sclerosis by magnetic brain stimulation. *Lancet* 1986;2:355–358.
- 50) 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. *Mult Scler.* 2015 Sep;21(10):1251-61.
- 51) Hinzman JM, Thomas TC, Burmeister JJ, Quintero JE, Huettl P, Pomerleau F, Gerhardt GA, Lifshitz J. Diffuse brain injury elevates tonic glutamate levels and potassium-evoked glutamate release in discrete brain regions at two days post-injury: an enzyme-based microelectrode array study. *J Neurotrauma.* 2010 May;27(5):889-99.
- 52) Ho PR, Koendgen H, Campbell N, Haddock B, Richman S, Chang I. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: a retrospective analysis of data from four clinical studies. *Lancet Neurol.* 2017 Nov;16(11):925-933.
- 53) Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, Serafini B, Aloisi F, Roncaroli F, Magliozzi R, Reynolds R. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 2011 Sep;134(Pt 9):2755-71.
- 54) Huda S, Whittam D, Bhojak M, Chamberlain J, Noonan C, Jacob A. Neuromyelitis optica spectrum disorders. *Clin Med (Lond).* 2019 Mar;19(2):169-176.

- 55) Chari DM. Remyelination in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:589-620.
- 56) Choi SR, Howell OW, Carassiti D, Magliozzi R, Gveric D, Muraro PA, Nicholas R, Roncaroli F, Reynolds R. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2012 Oct;135(Pt 10):2925-37.
- 57) Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Jan;42(1):39-51.
- 58) Iodice R, Carotenuto A, Dubbioso R, Cerillo I, Santoro L, Manganelli F. Multimodal evoked potentials follow up in multiple sclerosis patients under fingolimod therapy. *J Neurol Sci.* 2016 Jun 15;365:143-6.
- 59) Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Histamine and histamine receptors in pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology.* 2010 Sep;59(3):180-9.
- 60) Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation.* 2013 Jan 15;10:8.
- 61) Jog NR, McClain MT, Heinlen LD, Gross T, Towner R, Guthridge JM, Axtell RC, Pardo G, Harley JB, James JA. Epstein Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1) peptides recognized by adult multiple sclerosis patient sera induce neurologic symptoms in a murine model. *J Autoimmun.* 2020 Jan;106:102332.
- 62) Kallweit U, Aritake K, Bassetti CL, Blumenthal S, Hayaishi O, Linnebank M, Baumann CR, Urade Y. Elevated CSF histamine levels in multiple sclerosis patients. *Fluids Barriers CNS.* 2013 May 9;10:19.
- 63) Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, Fox RJ, Giovannoni G, Gold R, Vermersch P, Arnold DL, Arnould S, Scherz T, Wolf C, Wallström E, Dahlke F; EXPAND Clinical Investigators. Siponimod versus placebo in secondary progressive

multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet*. 2018 Mar 31;391(10127):1263-1273.

- 64) Kasakin MF, Rogachev AD, Predtechenskaya EV, Zaigraev VJ, Koval VV, Pokrovsky AG. Targeted metabolomics approach for identification of relapsing-remitting multiple sclerosis markers and evaluation of diagnostic models. *Medchemcomm*. 2019 Aug 12;10(10):1803-1809.
- 65) Kellie G. An Account of the Appearances Observed in the Dissection of Two of Three Individuals Presumed to Have Perished in the Storm of the 3d, and Whose Bodies Were Discovered in the Vicinity of Leith on the Morning of the 4th, November 1821; with Some Reflections on the Pathology of the Brain: Part I. *Trans Med Chir Soc Edinb*. 1824;1:84-122.
- 66) Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011 Jun 1;25(6):491-502.
- 67) Knowles M, Hughes D, Caspary EA, Field EJ. Lymphocyte transformation in multiple sclerosis. Inhibition of unstimulated thymidine uptake by a serum factor. *Lancet*. 1968 Dec 7;2(7580):1207-9.
- 68) Koch M, Mostert J, Heersema D, Teelken A, De Keyser J. Plasma S100beta and NSE levels and progression in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2007 Jan 31;252(2):154-8.
- 69) Kolasinski J, Stagg CJ, Chance SA, Deluca GC, Esiri MM, Chang EH, Palace JA, McNab JA, Jenkinson M, Miller KL, Johansen-Berg H. A combined post-mortem magnetic resonance imaging and quantitative histological study of multiple sclerosis pathology. *Brain*. 2012 Oct;135(Pt 10):2938-51.
- 70) Koprowski H, Zheng YM, Heber-Katz E, Fraser N, Rorke L, Fu ZF, Hanlon C, Dietzschold B. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 1;90(7):3024-7.

- 71) Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983 Nov;33(11):1444-52.
- 72) Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, Burger D, Hohlfeld R, Zamvil SS, Weber MS. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs*. 2011 May;25(5):401-14.
- 73) Langer-Gould AM, Gonzales EG, Smith JB, Li BH, Nelson LM. Racial and Ethnic Disparities in Multiple Sclerosis Prevalence. *Neurology*. 2022 May 3;98(18):e1818-e1827.
- 74) Lanz TV, Brewer RC, Ho PP, Moon JS, Jude KM, Fernandez D, Fernandes RA, Gomez AM, Nadj GS, Bartley CM, Schubert RD, Hawes IA, Vazquez SE, Iyer M, Zuchero JB, Teegen B, Dunn JE, Lock CB, Kipp LB, Cotham VC, Ueberheide BM, Aftab BT, Anderson MS, DeRisi JL, Wilson MR, Bashford-Rogers RJM, Platten M, Garcia KC, Steinman L, Robinson WH. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*. 2022 Mar;603(7900):321-327.
- 75) Lau L, Haganir RL. Role of Tyrosine Phosphorylation in the Nervous System. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
- 76) Levi I, Gurevich M, Perlman G, Magalashvili D, Menascu S, Bar N, et al. Potential role of indolelactate and butyrate in multiple sclerosis revealed by integrated microbiome-metabolome analysis. *Cell Rep Med*. (2021) 2:100246. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100246
- 77) Li P, Yin Y-L, Li D, Woo Kim S, Wu G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr*. (2007) 98:237–52. doi: 10.1017/S000711450769936X

- 78) Llufriu S, Castillo J, Blanco Y, Ramió-Torrentà L, Ríó J, Vallès M, Lozano M, Castellà MD, Calabria J, Horga A, Graus F, Montalban X, Saiz A. Plasma exchange for acute attacks of CNS demyelination: Predictors of improvement at 6 months. *Neurology*. 2009 Sep 22;73(12):949-53.
- 79) Loy BD, Fling BW, Sage KM, Spain RI, Horak FB. Serum Histidine is Lower in Fatigued Women with Multiple Sclerosis. *Fatigue* 2019, 7, 69–80.
- 80) Loy BD, O'Connor PJ. The effect of histamine on changes in mental energy and fatigue after a single bout of exercise. *Physiol. Behav.* 2016, 153, 7–18.
- 81) Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996 Apr;46(4):907-11.
- 82) Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol.* 1996 Jul;6(3):259-74.
- 83) Magliozzi R, Serafini B, Rosicarelli B, Chiappetta G, Veroni C, Reynolds R, Aloisi F. B-cell enrichment and Epstein-Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013 Jan;72(1):29-41.
- 84) Malmeström C, Haghighi S, Rosengren L, Andersen O, Lycke J. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology*. 2003 Dec 23;61(12):1720-5.
- 85) Manchester M, Anand A. Metabolomics: Strategies to Define the Role of Metabolism in Virus Infection and Pathogenesis. *Adv Virus Res.* 2017;98:57-81.

- 86) Marignier R, Hachohen Y, Cobo-Calvo A, Pröbstel AK, Aktas O, Alexopoulos H, Amato MP, Asgari N, Banwell B, Bennett J, Brilot F, Capobianco M, Chitnis T, Ciccarelli O, Deiva K, De Sèze J, Fujihara K, Jacob A, Kim HJ, Kleiter I, Lassmann H, Leite MI, Linington C, Meinl E, Palace J, Paul F, Petzold A, Pittock S, Reindl M, Sato DK, Selmaj K, Siva A, Stankoff B, Tintore M, Traboulsee A, Waters P, Waubant E, Weinshenker B, Derfuss T, Vukusic S, Hemmer B. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease. *Lancet Neurol.* 2021 Sep;20(9):762-772.
- 87) Mathieu PA, Almeida Gubiani MF, Rodríguez D, Gómez Pinto LI, Calcagno ML, Adamo AM. Demyelination-remyelination in the Central Nervous System: Ligand-dependent Participation of the Notch Signaling Pathway. *Toxicol Sci.* 2019 Sep 1;171(1):172-192.
- 88) Matušková V, Lízrová Preiningerová J, Vysloužilová D, Michalec M, Kasl Z, Vlková Z. Použití optické koherenční tomografie u roztroušené sklerózy. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/112(1): 33-40.
- 89) Mills EA, Mao-Draayer Y. Aging and lymphocyte changes by immunomodulatory therapies impact PML risk in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2018 Jul;24(8):1014-1022.
- 90) Mitrovic B, Ignarro LJ, Vinters HV, Akers MA, Schmid I, Uittenbogaart C, Merrill JE. Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes. *Neuroscience.* 1995 Mar;65(2):531-9.
- 91) Molnár G, Moldován J. Histamine content of the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. A preliminary communication. *Acta Med Acad Sci Hung.* 1966;22(3):271-4. PMID: 5919462.
- 92) Morell P, Quarles RH. "The myelin sheath." *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* 6 (1999).

- 93) Murgia F, Lorefice L, Noto A, Spada M, Frau J, Fenu G, Coghe G, Gagliano A, Atzori L, Cocco E. Metabolomic Changes in Patients Affected by Multiple Sclerosis and Treated with Fingolimod. *Metabolites*. 2023 Mar 15;13(3):428.
- 94) Murgia F, Lorefice L, Poddighe S, Fenu G, Secci MA, Marrosu MG, Cocco E, Atzori L. Multi-Platform Characterization of Cerebrospinal Fluid and Serum Metabolome of Patients Affected by Relapsing-Remitting and Primary Progressive Multiple Sclerosis. *J Clin Med*. 2020 Mar 21;9(3):863.
- 95) Musio S, Gallo B, Scabeni S, Lapilla M, Poliani PL, Matarese G, Ohtsu H, Galli SJ, Mantegazza R, Steinman L, et al. A key regulatory role for histamine in experimental autoimmune encephalomyelitis: Disease exacerbation in histidine decarboxylase-deficient mice. *J. Immunol*. 2006, 176, 17–26.
- 96) Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens*. 1972;2(1):1-4.
- 97) Nogueras L, Gonzalo H, Jové M, Sol J, Gil-Sanchez A, Hervás JV, Valcheva P, Gonzalez-Mingot C, Solana MJ, Peralta S, Pamplona R, Brieva L. Lipid profile of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients: a potential tool for diagnosis. *Sci Rep*. 2019 Aug 5;9(1):11313.
- 98) Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, Axelsson M, Khademi M, Gunnarsson M, Malmeström C, Svenningsson A, Olsson T, Piehl F, Blennow K, Lycke J. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology*. 2017 Nov 28;89(22):2230-2237.
- 99) Nygaard O, Langbakk B, Romner B. Neuron-specific enolase concentrations in serum and cerebrospinal fluid in patients with no previous history of neurological disorder. *Scand J Clin Lab Invest*. 1998 May;58(3):183-6.
- 100) O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, Benzerdjeb H, Truffinet P, Wang L, Miller A, Freedman MS; TEMSO Trial

Group. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011 Oct 6;365(14):1293-303.

- 101) Oliveira EML, Montani DA, Oliveira-Silva D, Rodrigues-Oliveira AF, Matas SLA, Fernandes GBP, Silva IDC GD, Lo Turco EG. Multiple sclerosis has a distinct lipid signature in plasma and cerebrospinal fluid. *Arq Neuropsiquiatr*. 2019 Oct 24;77(10):696-704.
- 102) Orton SM, Ramagopalan SV, Brocklebank D, Herrera BM, Dymment DA, Yee IM, Sadovnick AD, Ebers GC. Effect of immigration on multiple sclerosis sex ratio in Canada: the Canadian Collaborative Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Jan;81(1):31-6.
- 103) Park SJ, Jeong IH, Kong BS, Lee JE, Kim KH, Lee DY, Kim HJ. Disease Type- and Status-Specific Alteration of CSF Metabolome Coordinated with Clinical Parameters in Inflammatory Demyelinating Diseases of CNS. *PLoS One*. 2016 Nov 17;11(11):e0166277.
- 104) Parodi B, Kerlero de Rosbo N. The Gut-Brain Axis in Multiple Sclerosis. Is Its Dysfunction a Pathological Trigger or a Consequence of the Disease? *Front Immunol*. 2021 Sep 21;12:718220.
- 105) Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Mar 22;13(4):263-9.
- 106) Pender MP. The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neuroscientist*. 2011 Aug;17(4):351-67.
- 107) Petzold A, de Boer JF, Schippling S, Vermersch P, Kardon R, Green A, Calabresi PA, Polman C. Optical coherence tomography in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2010 Sep;9(9):921-32.
- 108) Petzold A, Eikelenboom MJ, Gveric D, Keir G, Chapman M, Lazeron RH, Cuzner ML, Polman CH, Uitdehaag BM, Thompson EJ, Giovannoni G. Markers

for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain*. 2002 Jul;125(Pt 7):1462-73.

- 109) Pieragostino D, D'Alessandro M, di Ioia M, Rossi C, Zucchelli M, Urbani A, Di Ilio C, Lugaresi A, Sacchetta P, Del Boccio P. An integrated metabolomics approach for the research of new cerebrospinal fluid biomarkers of multiple sclerosis. *Mol Biosyst*. 2015 Jun;11(6):1563-72.
- 110) Poddighe S, Murgia F, Lorefice L, Liggi S, Cocco E, Marrosu MG, Atzori L. Metabolomic analysis identifies altered metabolic pathways in Multiple Sclerosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017 Dec;93:148-155.
- 111) Podlecka-Piętowska A, Kacka A, Zakrzewska-Pniewska B, Nojszewska M, Zieminska E, Chalimoniuk M, Toczyłowska B. Altered Cerebrospinal Fluid Concentrations of Hydrophobic and Hydrophilic Compounds in Early Stages of Multiple Sclerosis-Metabolic Profile Analyses. *J Mol Neurosci*. 2019 Sep;69(1):94-105.
- 112) Polito A, Reynolds R. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat*. 2005 Dec;207(6):707-16.
- 113) Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW; AFFIRM Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):899-910.
- 114) Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983 Mar;13(3):227-31.

- 115) Rabinowitz JD, Purdy JG, Vastag L, Shenk T, Koyuncu E. Metabolomics in drug target discovery. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:235-46.
- 116) Ramagopalan SV, Handel AE, Giovannoni G, Rutherford Siegel S, Ebers GC, Chaplin G. Relationship of UV exposure to prevalence of multiple sclerosis in England. *Neurology.* 2011 Apr 19;76(16):1410-4.
- 117) Ramanathan S, Lenton K, Burke T, Gomes L, Storchenegger K, Yiannikas C, Vucic S. The utility of multimodal evoked potentials in multiple sclerosis prognostication. *J Clin Neurosci.* 2013 Nov;20(11):1576-81.
- 118) R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- 119) Reinke SN, Broadhurst DL, Sykes BD, Baker GB, Catz I, Warren KG, Power C. Metabolomic profiling in multiple sclerosis: insights into biomarkers and pathogenesis. *Mult Scler.* 2014 Sep;20(10):1396-400.
- 120) Robinson K, Rudge P. Abnormalities of the auditory evoked potentials in patients with multiple sclerosis. *Brain* 1977;100(pt 1):19–40.
- 121) Rodríguez-Porcel F, Hornik A, Rosenblum J, Borys E, Biller J. Refractory Fulminant Acute Disseminated Encephalomyelitis (ADEM) in an Adult. *Front Neurol.* 2014 Dec 23;5:270.
- 122) Sachs JA. HLA antigens in multiple sclerosis. *Proc R Soc Med.* 1977 Dec;70(12):869-71.
- 123) Sarchielli P, Greco L, Floridi A, Floridi A, Gallai V. Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. *Arch Neurol.* 2003 Aug;60(8):1082-8.

- 124) Sellebjerg F, Barnes D, Filippini G, Midgard R, Montalban X, Rieckmann P, Selmaj K, Visser LH, Sørensen PS; EFNS Task Force on Treatment of Multiple Sclerosis Relapses. EFNS guideline on treatment of multiple sclerosis relapses: report of an EFNS task force on treatment of multiple sclerosis relapses. *Eur J Neurol.* 2005 Dec;12(12):939-46.
- 125) Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, Rosicarelli B, Veroni C, Chiappetta G, Magliozzi R, Reynolds R, Coccia EM, Aloisi F. Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010 Jul;69(7):677-93.
- 126) Schlaeger R, D'Souza M, Schindler C, Grize L, Kappos L, Fuhr P. Electrophysiological markers and predictors of the disease course in primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014 Jan;20(1):51-6.
- 127) Signoriello E, Iardino P, Casertano S, De Lucia D, Pucciarelli A, Puoti G, Chiosi E, Lus G. 12-months prospective Pentraxin-3 and metabolomic evaluation in multiple sclerosis patients treated with glatiramer acetate. *J Neuroimmunol.* 2020 Nov 15;348:577385.
- 128) Sinclair AJ, Viant MR, Ball AK, Burdon MA, Walker EA, Stewart PM, Rauz S, Young SP. NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases--a diagnostic tool? *NMR Biomed.* 2010 Feb;23(2):123-32.
- 129) Skripuletz T, Linker RA, Stangel M. The choline pathway as a strategy to promote central nervous system (CNS) remyelination. *Neural Regen Res.* 2015 Sep;10(9):1369-70.
- 130) Skripuletz T, Manzel A, Gropengießer K, Schäfer N, Gudi V, Singh V, Salinas Tejedor L, Jörg S, Hammer A, Voss E, Vulinovic F, Degen D, Wolf R, Lee DH, Pul R, Moharrehg-Khiabani D, Baumgärtner W, Gold R, Linker RA,

- Stangel M. Pivotal role of choline metabolites in remyelination. *Brain*. 2015 Feb;138(Pt 2):398-413.
- 131) Smith KJ, Blakemore WF, McDonald WI. Central remyelination restores secure conduction. *Nature*. 1979 Aug 2;280(5721):395-6.
- 132) Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2002 Aug;1(4):232-41.
- 133) Sorensen PS, Blinkenberg M. The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Neurol Disord*. 2016 Jan;9(1):44-52.
- 134) Sorensen PS. The role of intravenous immunoglobulin in the treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2003 Feb 15;206(2):123-30.
- 135) Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, Nelson S, Pelletier D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain*. 2005 May;128(Pt 5):1016-25.
- 136) Sylvestre DA, Slupsky CM, Aviv RI, Swardfager W, Taha AY. Untargeted metabolomic analysis of plasma from relapsing-remitting multiple sclerosis patients reveals changes in metabolites associated with structural changes in brain. *Brain Res*. 2020 Apr 1;1732:146589.
- 137) Štětkařová I, Židó M. Bolesti hlavy v kazuistikách – kapitola 26: Frontální bolest hlavy a bolest oka – první příznak demyelinizačního onemocnění?. Praha: Maxdorf, 2022. 271-275. 9788073457365
- 138) Štětkařová I, Židó M, et al. Spinální neurologie – 2. vydání. Praha: Maxdorf, 2024. 9788073457747

- 139) Stojanovic IR, Kostic M, Ljubisavljevic S. The role of glutamate and its receptors in multiple sclerosis. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Aug;121(8):945-55.
- 140) Taan M, Al Ahmad F, Ercksousi MK, Hamza G. Risk Factors Associated with Multiple Sclerosis: A Case-Control Study in Damascus, Syria. *Mult Scler Int*. 2021 Jun 1;2021:8147451.
- 141) Tenenbaum S, Chitnis T, Ness J, Hahn JS; International Pediatric MS Study Group. Acute disseminated encephalomyelitis. *Neurology*. 2007 Apr 17;68(16 Suppl 2):S23-36.
- 142) Tengvall K, Huang J, Hellström C, Kammer P, Biström M, Ayoglu B, Lima Bomfim I, Stridh P, Butt J, Brenner N, Michel A, Lundberg K, Padyukov L, Lundberg IE, Svenungsson E, Ernberg I, Olafsson S, Dilthey AT, Hillert J, Alfredsson L, Sundström P, Nilsson P, Waterboer T, Olsson T, Kockum I. Molecular mimicry between Anoctamin 2 and Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 associates with multiple sclerosis risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Aug 20;116(34):16955-16960.
- 143) Teunissen C, Menge T, Altintas A, Álvarez-Cermeño JC, Bertolotto A, Berven FS, et al. Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. *Mult Scler*. (2013) 19:1802–9. doi: 10.1177/1352458513488232
- 144) Thebault S, Abdoli M, Fereshtehnejad SM, Tessier D, Tabard-Cossa V, Freedman MS. Serum neurofilament light chain predicts long term clinical outcomes in multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2020 Jun 25;10(1):10381.
- 145) Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA.

Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018 Feb;17(2):162-173.

- 146) Tuomisto L, Kilpeläinen H, Riekkinen P. Histamine and histamine-N-methyltransferase in the CSF of patients with multiple sclerosis. *Agents Actions.* 1983 Apr;13(2-3):255-7.
- 147) Veroni C, Serafini B, Rosicarelli B, Fagnani C, Aloisi F. Transcriptional profile and Epstein-Barr virus infection status of laser-cut immune infiltrates from the brain of patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2018 Jan 16;15(1):18.
- 148) Wallin MT, Culpepper WJ, Coffman P, Pulaski S, Maloni H, Mahan CM, Haselkorn JK, Kurtzke JF; Veterans Affairs Multiple Sclerosis Centres of Excellence Epidemiology Group. The Gulf War era multiple sclerosis cohort: age and incidence rates by race, sex and service. *Brain.* 2012 Jun;135(Pt 6):1778-85.
- 149) Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, Robertson N, La Rocca N, Uitdehaag B, van der Mei I, Wallin M, Helme A, Angood Napier C, Rijke N, Baneke P. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler.* 2020 Dec;26(14):1816-1821.
- 150) Waschbisch A, Sanderson N, Krumbholz M, Vlad G, Theil D, Schwab S, Mäurer M, Derfuss T. Interferon beta and vitamin D synergize to induce immunoregulatory receptors on peripheral blood monocytes of multiple sclerosis patients. *PLoS One.* 2014 Dec 31;9(12):e115488.
- 151) Weiner HL. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Arch Neurol.* (2004) 61:1613–5.
- 152) Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):492-9.

- 153) Winger RC, Zamvil SS. Antibodies in multiple sclerosis oligoclonal bands target debris. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 12;113(28):7696-8.
- 154) Yan J, Kuzhiumparambil U, Bandodkar S, Dale RC, Fu S. Cerebrospinal fluid metabolomics: detection of neuroinflammation in human central nervous system disease. *Clin Transl Immunology*. 2021 Aug 6;10(8):e1318.
- 155) Yang Q, Zheng C, Cao J, Cao G, Shou P, Lin L, Velletri T, Jiang M, Chen Q, Han Y, Li F, Wang Y, Cao W, Shi Y. Spermidine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through inducing inhibitory macrophages. *Cell Death Differ*. 2016 Nov 1;23(11):1850-1861.
- 156) Ye L, Sun Y, Jiang Z, Wang G. L-Serine, an Endogenous Amino Acid, Is a Potential Neuroprotective Agent for Neurological Disease and Injury. *Front Mol Neurosci*. 2021 Sep 6;14:726665.
- 157) Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992 Mar 5;356(6364):63-6.
- 158) Zéphir H. Progress in understanding the pathophysiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2018 Jun;174(6):358-363. doi: 10.1016/j.neurol.2018.03.006. Epub 2018 Apr 19.
- 159) Židó M, Kačer D, Valeš K, Svobodová Z, Zimová D, Štětkářová I. Metabolomics of Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis Compared With Healthy Controls: A Pilot Study. *Front Neurol*. 2022 May 26;13:874121.
- 160) Židó M, Kačer D, Valeš K, Zimová D, Štětkářová I. Metabolomics of Cerebrospinal Fluid Amino and Fatty Acids in Early Stages of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 13;24(22):16271.

10. Seznam publikované literatury

10.1 Publikace související s tématem dizertační práce

10.1.1 Prvoautorské publikace v časopisech s IF

Židó M, Kačer D, Valeš K, Svobodová Z, Zimová D, Štětkářová I. Metabolomics of Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis Compared With Healthy Controls: A Pilot Study. *Front Neurol.* 2022 May 26;13:874121. IF: 3,4

Židó M, Kačer D, Valeš K, Zimová D, Štětkářová I. Metabolomics of Cerebrospinal Fluid Amino and Fatty Acids in Early Stages of Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 16271. IF: 5,6

10.1.2 Spoluautorské publikace v časopisech s IF

Fialova L, Barilly P, Štětkářová I, Bartoš A, Noskova L, Zimova D, **Židó M**, Hoffmanova I. Impaired intestinal permeability in patients with multiple sclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2023 Aug 11. IF: 0,9

10.2 Publikace nesouvisející s tématem dizertační práce

10.2.1 Spoluautorské publikace v časopisech s IF

Štětkářová I, Ehler E, **Židó M**, Lauer D, Polák J, Keller J, Peisker T. Influence of Hyperglycaemia and CRP on the Need for Mechanical Ventilation in Guillain-Barré Syndrome. *Frontiers in Neurology*, 2022, vol. 13. ISSN 1664-2295. IF: 3,4

10.3 Ostatní práce

10.3.1 Postery, přednášky, kapitoly v knihách související s tématem dizertační práce

Židó M. Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis; poster; Studentská vědecká konference 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy; 2020, Praha

Židó M. Metabolomics of Cerebrospinal Fluid in Patients with Multiple Sclerosis Compared to Healthy Controls: Pilot Study; e-prezentace; 7th Congress of the European Academy of Neurology; 19. – 22. června 2021, Paříž

Židó M. Metabolomika mozkomíšního moku u pacientů s roztroušenou sklerózou; poster; 34. Český a slovenský neurologický sjezd; 29. – 31. března 2022, Olomouc

Židó M. Potential Role of Arginine as a Biomarker of Acute Inflammatory Process in Multiple Sclerosis; e-prezentace; 8th Congress of the European Academy of Neurology; 25. – 28. června 2022, Vídeň

Štětkářová I, **Židó M.** Bolesti hlavy v kazuistikách – kapitola 26: Frontální bolest hlavy a bolest oka – první příznak demyelinizačního onemocnění?. Praha: Maxdorf, 2022, pp 271-275. ISBN 9788073457365

Židó M. Možný prognostický potenciál aminokyselin a mastných kyselin u pacientů v počátečních stádiích roztroušené sklerózy; poster; 36. Český a slovenský neurologický sjezd; 30. listopadu 2023, Hradec Králové

10.3.2 Postery, přednášky, kapitoly v knihách nesouvisející s tématem dizertační práce

Lauer D, **Židó M.** Various Peripheral Nerve Complications Associated with COVID-19 Vaccination: A Case Study; poster; Peripheral Nerve Society Annual Meeting 2022; 14. – 17. května, Miami

Židó M, Svobodová Z. Bolesti hlavy v kazuistikách – kapitola 29: Protrahovaná bolest hlavy jako první příznak závažné expanzivní léze CNS. Praha: Maxdorf, 2022, pp. 301-305. ISBN 9788073457365

Židó M. Neurological complications of immune checkpoint inhibitors therapy; poster; 9th Congress of the European Academy of Neurology; 1. – 4. července 2023, Budapešť

Židó M. Kazuistika 11.2. Poúrazová slabost a zhoršení citlivosti levostranných končetin. In: Štětkářová a kol. (Ed): Spinální neurologie – 2. vydání; Praha: Maxdorf, 2024, p.228. ISBN 9788073457747

Židó M. Kazuistika 19.1. Progredující silné bolesti krční páteře s výraznou elevací CRP. In: Štětkářová a kol. (Ed): Spinální neurologie – 2. vydání; Praha: Maxdorf, 2024, p.391. ISBN 9788073457747

11. Příloha I: Originály publikací související s tématem dizertační práce