

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

**Autoreferát dizertační práce**

*Metabolomika mozkomíšního moku u roztroušené sklerózy*

Praha, 2024

Studijní program Neurovědy, předseda prof. MUDr. Jan  
Laczó, Ph.D.

Školící pracoviště: Neurologická klinika 3. lékařské fakulty  
Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské  
Vinohrady

Autor: MUDr. Michal Židó

Školitel: prof. MUDr. Ivana Štětkařová, CSc., MHA.

Oponent č. 1:

Oponent č. 2:

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne                    v    hod, v

S disertací je možno se seznámit na děkanátu 3. lékařské  
fakulty Univerzity Karlovy

## **Obsah**

Abstrakt .....	04
Abstract .....	05
1. Úvod .....	06
2. Cíl dizertační práce .....	07
2.1 Hypotézy .....	08
3. Metodika dizertace .....	09
4. Výsledky .....	13
5. Diskuze .....	17
6. Závěr .....	22
Použitá literatura .....	23
Seznam publikací doktoranda .....	30

## Abstrakt

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění, poškozující dominantně bílou hmotu centrálního nervového systému (CNS). 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 korelovat tyto výsledky v čase s hodnotami 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. 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 CNS. Metabolomics is a systematic study to profile endogenously small molecule metabolites present in the examined preparation. Our main goal was to determine significant differences in the metabolome of the CSF of patients in the initial stage of MS compared to controls. Furthermore, we correlated these results over time with the EDSS values. Subsequently, we also evaluated other potential biomarkers of MS, more precisely evoked potentials (EP), neurofilament light chains (NfL) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). We collected CSF samples from 40 patients in the early stages of MS, and 33 healthy controls. 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. 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.

## 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 CNS. RS 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. Péče o pacienty s RS a jejich léčba jsou finančně i časově nákladné. V rámci České republiky jí zabezpečují neurologové v specializovaných centrech pro demyelinizační onemocnění.

Současné možnosti léčby RS jsou rozsáhlé. K dispozici je veliké množství léků a stále přibývají další, ale jejich efektivita se značně liší. Proto je v rámci péče o pacienty s RS preferován a podporován individuální přístup k pacientovi s prevencí rozvoje disability brzkým zahájením terapie.

Snaha o časnou efektivní léčbu RS 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 likvoru, NFL, GFAP a evokované potenciály u pacientů s RS a identifikovat nové potenciální prognostické biomarkery tohoto onemocnění.

## 2. Cíl dizertační práce

Hlavním cílem této dizertace bylo stanovit statisticky signifikantní rozdíly v metabolomu likvoru pacientů v počátečním stádiu RS (zatím bez specifické DMD terapie) v porovnání s likvorem kontrolní skupiny.

Dále jsme si vytyčili vytvořit seznam signifikantně změněných metabolitů, které jsme se pokusili z patofyziologického hlediska odůvodnit.

Dalším cílem bylo zhodnotit korelaci mezi koncentracemi jednotlivých statisticky signifikantně rozdílných metabolitů likvoru a klinickým stavem pacientů v podobě hodnot EDSS (Kurtzke, 1983) v době odběru likvoru a s odstupem času (po 1 roce a po 2 letech) a dále korelaci mezi koncentracemi metabolitů od projevu prvních příznaků do odběru vzorku likvoru.

Následně jsme v rámci dalších analýz hodnotili i jiné potenciální biomarkery RS. U částí pacientů, u kterých bylo provedeno dodatečné měření hladin NfL a GFAP v séru a v likvoru, jsme hodnotili korelaci mezi hodnotami EDSS a hladinami NfL a GFAP.

U další části pacientů, kteří v období odběru likvoru absolvovali vyšetření EP, jsme korelovali nálezy EDSS s výsledky dostupných EP 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 RS.

## **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

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.

Do první skupiny byli zařazeni pacienti v počátečních stádiích RS. 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 likvoru odpovídajícím demyelinizačnímu onemocnění typu RS. Likvor a sérum těchto pacientů bylo bez průkazu protilátek proti aquaporinu-4 a protilátek proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu. Pacienti v době odběru likvoru byli bez specifické DMD terapie. Tato skupina zahrnovala celkem 40 pacientů, z toho 31 žen a 9 mužů. Odběry jejich likvoru byly prováděny v průměru 53 dní od vzniku klinických symptomů (s výjimkou 4 subjektů, kterých likvor 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 čítí, 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.

Příprava analytických vzorků pro necílenou metabolickou analýzu a cílenou analýzu vybraných malých molekulárních metabolitů (50 – 300 Da) probíhala následovně:

100  $\mu$ l likvoru bylo převedeno do předchlazené zkumavky typu Eppendorf (1,5 ml), následně bylo přidáno 400  $\mu$ l 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 100 $\mu$ l H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1, v/v) a sonikován v chladné koupeli po dobu 20 min. Supernatant byl následně převeden do zkumavky a přímo analyzován.

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 prázdňnými vzorky vstříknuté v pozitivním i negativním (ESI+, ESI-) modu pomocí metody SWATH. Vzorky byly separované na koloně (Kinetex C18, 2,6  $\mu$ 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  $\mu$ l.min<sup>-1</sup> a nástřikový objem vzorku byl 5  $\mu$ 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 malo-molekulárních metabolitů. Separace byla dosažena na kolonách (Kinetex C18, 2,6  $\mu\text{m}$  x150  $\times$  3 mm; Phenomenex) s následným 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<sup>-1</sup>. Objem nástřiku byl nastaven na 5  $\mu\text{l}$ . 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.

Dostupná klinická a paraklinická data, týkající se pacientů s RS 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.

U některých subjektů skupiny s roztroušenou sklerózou bylo také provedeno vyšetření evokovaných potenciálů (somatosenzorických - SEP, zrakových - VEP a motorických - MEP). Vyšetření multimodálními evokovanými potenciály bylo provedeno v souladu s doporučením Mezinárodní federace klinické neurofyziologie. V této 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 těchto z-transformovaných výsledků bylo následně vypočteno EP skóre. EP skóre nemá specifickou jednotku, protože je vypočten z jednotlivých z-skóre.

Měření hladin lehkých řetězců neurofilament a gliálního fibrilárního acidického proteinu z mozkomíšního moku u pacientů s RS bylo provedeno ve spolupráci s laboratoři

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 immuno-assay. 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.

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 vyhodnocený 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

Prostřednictvím necílené metabolické analýzy jsme v likvoru pozorovali kolem 60 různých analytů. Nejvýznamnější rozdíly jsme zjistili u aminokyselin a mastných kyselin v likvoru 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 1.

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

Poznámka: RS = skupina pacientů s roztroušenou sklerózou; C = kontrolní skupina; SD = směrodatná odchylka; 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 sniženy u osob s RS (průměrná koncentrace: 3,97  $\mu\text{g/ml}$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou. Histidin (p-value: 0,005) byl rovněž snížen u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 7,02  $\mu\text{g/ml}$ ), podobně i lutamát (p-value: 0,015) (průměrná koncentrace: 1,89  $\mu\text{g/ml}$ ) a cholin (p-value: 0,023) (průměrná koncentrace: 1,04  $\mu\text{g/ml}$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou. Další signifikantní změny byly pozorovány v případě tyrosinu (p-value: 0,031), kterého koncentrace byly sniženy u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 1,10  $\mu\text{g/ml}$ ) a také v případě serinu (p-value: 0,047), kterého koncentrace byly rovněž sniženy u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 2,27  $\mu\text{g/ml}$ ). Pouze koncentrace spermidinu (p-value: 0,012) byly signifikantně zvýšeny u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 0,04  $\mu\text{g/ml}$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou. Signifikantní změny byly nalezeny u kyseliny linoleové (p-value: 0,001), jejíž koncentrace byly sniženy u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 3,13  $\mu\text{g/ml}$ ) a v případě kyseliny stearové (p-value: 0,029), jejíž koncentrace byly taky sniženy u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 2,77  $\mu\text{g/ml}$ ). V případě kyseliny olejové (p-value: 0,015) byly její koncentrace zvýšeny u pacientů s RS (průměrná koncentrace: 8,79  $\mu\text{g/ml}$ ) ve srovnání s kontrolami.

V případě histidinu jsme nepozorovali signifikantní korelaci mezi jeho koncentracemi a hodnotami EDSS v době odběru likvoru (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). 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).

Celkem 31 pacientů s RS absolvovalo vyšetření alespoň jednou modalitou EP. Vyšetření VEP bylo provedeno u 31 pacientů, SEP u 25 pacientů a vyšetření MEP u 14 pacientů. Všechny modalities EP absolvovalo celkem 14 pacientů. Po extrakci latencí jednotlivých odpovědí byly tyto hodnoty transformované s ohledem na normativní hodnoty naší laboratoře. 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).

Při korelaci jednotlivých EP skóre s hodnotami EDSS z odběru likvoru 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 likvoru lze, vzhledem k hodnotám p-value, považovat za statisticky signifikantní.

Při korelaci jednotlivých EP skór s hodnotami EDSS po 1 roce od odběru likvoru 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.



## 5. Diskuze

Několik autorů v posledních letech prezentovalo nálezy metabolomiky likvoru u pacientů s RS (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 likvoru 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 likvoru. Někteří autoři vzali do kontrolních skupin pacienty s různými neurologickými nemocemi, v některých případech i nemocné se zánětlivými onemocněními CNS, která mohou významně ovlivnit složení likvoru. 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, 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.

V rámci hlavního cíle této práce jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíly v metabolomice likvoru 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 NO hraje roli i v patogenezi RS (Smith et al., 2002). V místech zánětu (akutní/ aktivní léze u roztroušené sklerózy) dochází k aktivaci specifické formy enzymu tvořícího NO, takzvané inducibilní NO syntázy (iNOS). Tato forma enzymu produkuje vysoké koncentrace NO nezávisle na koncentracích kalcia (Alderton et al., 200; Koprowski et al., 1993). U RS byly nalezeny zvýšené koncentrace NO 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 NO pomocí inducibilní NO syntázy. V naší práci jsme necíleným přístupem objevili signifikantně snížené hladiny l-argininu u pacientů s RS. Tento nálezy 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 NO.

Aminokyselina histidin je prekurzorem neurotransmiteru histaminu. 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). 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). Několik studií našlo zvýšené hladiny histaminu v mozkomíšním moku pacientů s RS (Molnár et al., 1966; Tuomisto et al., 1983; Kallweit et al., 2013), což může podpořit vysvětlení snížené hladiny histidinu zvýšenou spotřebou prekurzoru pro syntézu histaminu. Dále jsme pozorovali i střední negativní korelaci mezi koncentracemi histidinu a hodnotami EDSS po 1 roce a 2 letech od odběru likvoru. 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 následujících letech této nemoci. Nižší koncentrace histidinu můžou 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 RS byl zatím popsán pouze v experimentálních zvířecích modelech (Yang et al., 2016). Hladiny spermidinu v likvoru 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 RS, který se podílí na poškozování axonů (Stojanovic et al., 2014). S ohledem na to můžeme spekulovat, že hladina glutamátu představuje marker axonální degenerace u RS. V několika studiích byla publikována zvýšená hladina glutamátu v likvoru pacientů s RS (Oliveria et al., 2019; Pieragostino et al., 2015). V naší práci jsme naopak našli významně snížené hladiny glutamátu v likvoru 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 stádiích RS anebo budou typické pro případy, kde již od začátku převládá proces axonální degenerace.

U části pacientů s RS jsme hodnotili výsledky vyšetření multimodálními EP 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 EP 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

odrážejí aktuální hodnoty EDSS a tím i aktuální klinický stav pacienta. Vyšetření VEP dle našich výsledků, však reflektuje 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 prognosticky 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 NfL a GFAP v séru a likvoru s hodnotami EDSS. Pozorovali jsme pouze hraničně signifikantní lehkou pozitivní korelaci mezi koncentracemi GFAP v séru a hodnotami EDSS v době odběru likvoru. 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 RS. NfL (jde o cytoskeletální strukturu axonů) odrážejí proces axonální neurodegenerace a GFAP (jde o cytoskeletální strukturu astrocytů) ukazují na poškození astrocytů.

## 6. Závěr

Metabolomika jako část multi-omických studií představuje slibný zdroj nových biomarkerů. U RS 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 EP, 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.

NfL lze považovat za marker neuronálního poškození, GFAP je ukazatelem poškození astrocytů. Oba jsou v poslední době v popředí zájmu ve výzkumu biomarkerů RS, 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.

## **Použitá literatura**

1. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.
2. 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.
3. 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.
4. Dziadkowiak E, Wiczorek 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.
5. Encinas JM, Manganas L, Enikolopov G. Nitric oxide and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2005 May;5(3):232-8.
6. 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.

7. 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.
8. 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
9. 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.
10. 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.
11. Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Jan;42(1):39-51.
12. 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.



13. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Histamine and histamine receptors in pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology*. 2010 Sep;59(3):180-9.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983 Nov;33(11):1444-52.
18. 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
19. 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.

20. 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.
21. Murgia F, Loreface 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
  27. 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.
  28. 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/>.
  29. 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.
  30. 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.
  31. 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.

32. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002 Aug;1(4):232-41.
33. 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.
34. 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.
35. Stojanovic IR, Kostic M, Ljubisavljevic S. The role of glutamate and its receptors in multiple sclerosis. *J Neural Transm (Wien-na).* 2014 Aug;121(8):945-55.
36. 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
37. 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.
38. 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,

- Traboulee 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Židó M, Kačer D, Valeš K, Zimová D, Štětkařová 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.

## **Seznam publikací doktoranda**

### **Publikace související s tématem dizertační práce 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

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

### **Publikace nesouvisející s tématem dizertační práce 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

### **Postery, přednášky a 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

### **Postery, přednášky a 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: Štětkařová 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: Štětkařová a kol. (Ed): Spinální neurologie – 2. vydání; Praha: Maxdorf, 2024, p.391. ISBN 9788073457747