

Ocena profilu metabolomicznego u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym jako wskaźnik rozwoju choroby z uwzględnieniem postaci rzutowo-remisyjnej, pierwotnie postępującej i wtórnie postępującej

STRESZCZENIE

Metabolomika to dziedzina nauki, której zagadnienia obejmują analizę jakościową i ilościową metabolitów definiowanych jako całościowy zestaw niskocząsteczkowych związków chemicznych nieprzekraczających masy 1 500 Da. Zalicza się ją, obok genomiki, transkryptomiki i proteomiki, do dziedzin nauki wykorzystujących najnowocześniejsze narzędzia diagnostyczne, które pozwalają na holistyczne podejście do pacjenta. Obecność metabolitów w analizowanym materiale biologicznym, w przeciwieństwie do informacji zawartych bezpośrednio w materiale genetycznym, odzwierciedla aktualny stan fizjologiczny komórki i stanowi integralną zależność między genotypem a fenotypem, co w przyszłości może bezpośrednio przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat podłoża molekularnego w konkretnych jednostkach chorobowych. Dodatkowym aspektem, który przemawia na korzyść analizy metabolicznej, jest zdecydowanie mniejsza ich ilość w porównaniu chociażby do genów, transkryptów i białek. Pomimo rozwoju wielu technologii omicznych, brakuje wciąż badań integrujących i łączących metabolity w komórce organizmu, których wprowadzenie pozwoliłoby na lepszy wgląd w ludzkie patologie i być może, w przyszłości, przywrócić się pełnemu obrazowi szlaków komórkowych. To z kolei mogłoby oznaczać rewolucję w przedklinicznych i klinicznych badaniach nad diagnozowaniem chorób, prognozowaniem, odpowiedzią na leki oraz opracowywaniem nowych leków. Podejście metabolomiczne może pozwolić na personalizację leczenia pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Liczne badania wskazują na ilościową zmianę metabolitów w zależności od konkretnego stadium stwardnienia rozsianego. Jednak złożoność samej choroby utrudnia identyfikację leżących u jej podstaw mechanizmów patogenetycznych. Dlatego znalezienie biomarkerów rozwoju choroby może w przyszłości przyczynić się do zindywidualizowanego planu leczenia, co pomoże zminimalizować niepożądane działania farmakoterapii.

WPROWADZENIE

Stwardnienie rozsiane (ang. *multiple sclerosis*, SM) to jedna z najczęstszych chorób ośrodkowego układu nerwowego (ang. *central nervous system*, CNS) o podłożu zapalnym i neurodegeneracyjnym [1,2]. Jak pokazują dane, najczęściej zapadają na nie młode kobiety: najwyższa zapadalność w 2021 roku obserwowana była w grupie wiekowej 18–29 lat – 1,41 zachorowań na 10 tysięcy osób, dwukrotnie częściej u kobiet [3]. Pod koniec 2021 roku odnotowano w Polsce 54 887 przypadków SM – 14,4 na 10 tysięcy mieszkańców [4], co sprawia, że jest to najpowszechniejsza nieurazowa przyczyna niepełnosprawności wśród osób młodych [1]. Wystąpienie stwardnienia rozsianego jest wynikiem złożonej interakcji między czynnikami genetycznymi a środowiskowymi. Osoby mające predyspozycje genetyczne do choroby mogą być bardziej narażone na jej wystąpienie wskutek działania czynników środowiskowych. Badania wykazały, że im dalej od równika, tym większa częstość występowania SM, co może mieć związek ze zwiększonym narażeniem na niedobór witaminy D i mniejszą ekspozycją na promieniowanie słoneczne. Jednakże migranci z krajów o mniejszym narażeniu na występowania stwardnienia rozsianego nie mają zwiększonego ryzyka zachorowania, co sugeruje istotny wpływ możliwego narażenia w dzieciństwie [1,5]. Udowodniono także korelację pomiędzy objawowym przechorowaniem infekcji wirusem Epsteina-Barr w dzieciństwie lub wieku dorosłym, a częstością występowania SM. Czynnikiem ryzyka jest również palenie tytoniu, otyłość oraz dieta uboga w witaminy A, D i nienasycone kwasy tłuszczowe omega 3, a jednocześnie bogata w sól [1,2,5]. Stwardnienie rozsiane nie jest chorobą dziedziczną, ale zauważono jego częstsze występowanie wśród osób spokrewnionych z chorymi. Geny związane z występowaniem SM to przede

palenia nerwu wzrokowego (ang. *neuromyelitis optica spectrum disorders*); PPAR γ – receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptors*); PPMS – pierwotnie postępująca postać stwardnienia rozsianego (ang. *primary progressive multiple sclerosis*); ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*); RRMS – postać rzutowo-remisyjną stwardnienia rozsianego (ang. *relapsing-remitting multiple sclerosis*); SPMS – wtórnie postępująca postać stwardnienia rozsianego (ang. *secondary progressive multiple sclerosis*); TCA – cykl kwasów tricarboxylowych (ang. *tricarboxylic acid cycle*); TNFR1 – receptor czynnika martwicy nowotworów 1 (ang. *tumor necrosis receptor 1*)

mgr Mikołaj Górka^{1,2✉},
mgr Magdalena Dębiec^{1,3},
mgr Natalia Białoń²,
Dominika Bieczek²,
dr Krzysztof Suszyński²,
dr hab. Dariusz Górka²

¹Centrum Medycyny Doświadczalnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Zakład Medycyny Sportowej i Fizjologii Wysiłku Fizycznego, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

³Katedra i Zakład Fizjologii, Wydział Nauk Medycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

https://doi.org/10.18388/pb.2021_492

✉ autor korespondujący: mgorka434@gmail.com

Słowa kluczowe: stwardnienie rozsiane, metabolom, choroby neurodegeneracyjne

Wykaz skrótów: 5-HIAA – kwas 5-hydroksyindoloctowy (ang. *5-hydroxyindoleacetic acid*); 5-HTP – 5-hydroksytryptofan (ang. *5-hydroxytryptophan*); AOPP – produkty zaawansowanego utleniania białek (ang. *advanced oxidation protein products*); BAFF – czynnik aktywujący komórki B (ang. *B cell activating factor*); BBB – bariera krew – mózg (ang. *blood brain barrier*); CIS – klinicznie izolowany zespół (ang. *clinically isolated syndrome*); CNS – ośrodkowy układ nerwowy (ang. *central nervous system*); COX5B – podjednostka 5B oksydazy cytochromu c (ang. *cytochrome C oxidase subunit 5B*); CSF – płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. *cerebrospinal fluid*); EDSS – Rozszerzona Skala Niepełnosprawności (ang. *Expanded Disability Status Scale*); Glc-6-P – glukoza-6-fosforan (ang. *glucose-6-phosphate*); GLUT – transportery glukozy (ang. *glucose transporters*); GTA – hydroksyloowane nienasycone bardzo długie kwasy tłuszczowe (ang. *Gastrointestinal Tract Acids*); IL2RA – receptor interleukiny 2A (ang. *interleukin 2 receptor*); IL7R – receptor interleukiny 7 (ang. *interleukin-7 receptor*); KYNA – kwas kynureinowy (ang. *kynurenic acid*); Ldh – dehydrogenaza mleczanowa (ang. *lactate dehydrogenase*); MCTs – transportery monokarboxylowe (ang. *monocarboxylate transporters*); MS – stwardnienie rozsiane (ang. *multiple sclerosis*); NMO – spektrum zaburzeń za-

wszystkim HLA-DRB1*15/DQ2 [1,2,5]. Ponadto zidentyfikowano 150 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów związanych z podatnością na wystąpienie stwardnienia rozsianego, m.in. w genach kodujących receptor interleukiny 7 (ang. *interleukin-7 receptor*, IL7R), receptor interleukiny 2A (ang. *interleukin 2 receptor*, IL2RA), receptor czynnika martwicy nowotworów 1 (ang. *tumor necrosis receptor 1*, TNFR1), czynnik aktywujący komórki B (ang. *B cell activating factor*, BAFF) i cytochrom P4502R1 [1,5]. Patogeneza stwardnienia rozsianego polega na rozwoju odpowiedzi zapalnej przeciwko własnym tkankom CNS (co prowadzi do demielinizacji) oraz na postępującej neurodegeneracji i atrofii mózgu [1,2,6]. Obecnie uważa się, że utrata aksonów i neuronów zaczyna się już w najwcześniejszym etapie choroby, skutkując utratą zdolności poznawczych i niepełnosprawnością [6]. W przebiegu choroby dochodzi do inwazji tkanki mózgowej przez limfocyty T i B, a także monocyty i makrofagi. Pojawia się także aktywacja mikrogleju, mogąca być przyczyną powstawania zmian demielinizacyjnych. Cechami charakterystycznymi dla patologii występującej w SM są: utrata aksonów lub neuronów, demielinizacja oraz głojeza. U podłoża uszkodzenia aksonów i powstawania plak demielinizacyjnych może leżeć narażenie na stres oksydacyjny, uszkodzenie mitochondriów w komórkach nerwowych, niedobór energii w obrębie neuronu, a także obrzęk i dezorganizacja cytoszkieletu [2,7]. Większość przypadków stwardnienia rozsianego (80%) rozpoczyna się od wystąpienia klinicznie izolowanego zespołu (ang. *clinically isolated syndrome*, CIS), czyli ostrego ataku klinicznego dotyczącego jednego lub kilku rejonów CNS. U części chorych CIS przechodzi w postać rzutowo-remisyjną stwardnienia rozsianego (ang. *relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS). Po około 10-15 latach u ok. 80% pacjentów RRMS zmienia się w postać wtórnie postępującą stwardnienia rozsianego (ang. *secondary progressive multiple sclerosis*, SPMS), w której objawy choroby już nie poddają się remisji. Jednocześnie 10-15% pacjentów prezentuje postać pierwotnie postępującą SM (ang. *primary progressive MS*, PPMS) z późniejszym wiekiem zachorowania (ok. 40 roku życia) i taką samą częstością występowania u obu płci [2], charakteryzującą się akumulacją niepełnosprawności bez okresów remisji. Istnieje także radiologicznie izolowany zespół CIS, gdzie u pacjenta nie są obecne objawy kliniczne, a badanie rezonansem magnetycznym ujawnia zmiany charakterystyczne dla stwardnienia rozsianego [7]. Objawy kliniczne stwardnienia rozsianego mogą przejawiać się w zaburzeniach czuciowych, ruchowych (także w funkcji pęcherza moczowego lub jelit), wzrokowych (np. diplopia) i w funkcji pnia mózgu. CIS może ujawniać się jako zapalenie nerwu wzrokowego, niepełne poprzeczne zapalenie rdzenia (najczęściej dotyczące odcinka szyjnego rdzenia kręgowego) lub zespół pnia mózgu. U większości chorych w trakcie RRMS symptomy te pojawiają się nagle i zanikają wraz z ustępowaniem rzutu [5-7]. W postaci PPMS częściej występuje postępująca mielopatia z objawami ruchowymi (takimi jak słabość, spastyka, problemy z chodem), które dominują nad objawami czuciowymi. We wszystkich postaciach SM obserwuje się także upośledzenie funkcji poznawczych, jednak u chorych z PPMS jest ono bardziej widoczne niż u pacjentów z RRMS [6]. Diagnoza stwardnienia rozsianego opiera się na badaniu klinicznym, wykluczeniu innych bardziej prawdopo-

dobnych rozpoznań oraz na wykazaniu wieloogniskowości (DIS) i wieloczasowości (DIT) zmian chorobowych, potwierdzonych występowaniem objawów lub badaniem rezonansem magnetycznym (MR) [5-7]. Wieloogniskowość oznacza obecność co najmniej jednej zmiany demielinizacyjnej (w T2 w MR) w przynajmniej dwóch obszarach CNS typowych dla SM – okołokomorowo, przykorowo, podnamiotowo lub w rdzeniu kręgowym. Natomiast wieloczasowość odnosi się do obecności zmian demielinizacyjnych na różnym etapie zaawansowania – aktywnych i przewlekłych, które w badaniu MR widoczne są jako zmiany wzmacniające lub niewzmacniające się po podaniu gadolinu. Rozpoznanie może być także postawione na podstawie stwierdzenia jednego rzutu i historii medycznej pacjenta wskazującej na wystąpienie rzutu w przeszłości. Służą do tego kryteria McDonald'a z 2017 roku [5,6]. Kryteria rozpoznania PPMS obejmują obecność progresji klinicznej choroby przez co najmniej 1 rok oraz 2 kryteria z następujących: obecność zmian DIS w mózgu i/lub szyjnym odcinku rdzenia kręgowego i/lub obecność zmian w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) [5,8]. Leczenie pierwszej linii postaci rzutowo-remisyjnej stwardnienia rozsianego opiera się na podawaniu interferonów lub octanu glatirameru, a w przypadku nieuzyskania satysfakcjonującej odpowiedzi klinicznej lub nietolerancji leczenia przez pacjenta można stosować także natalizumab, mitoksantron, fingolimod, teriflunomid, fumaran dimetylu i alemtuzumab, których użycie jest obciążone ryzykiem wystąpienia poważnych działań niepożądanych (m.in. postępującej leukoencefalopatii wieloogniskowej). Dla postaci PPMS nie ma specyficznego i skutecznego leczenia [5,8]. Celem leczenia jest osiągnięcie NEDA-4 – stanu, w którym nie obserwuje się klinicznych i obrazowych objawów aktywności SM, a także cech zaniku mózgu [1,7]. W przebiegu stwardnienia rozsianego dochodzi do wielu zmian dotyczących metabolizmu energetycznego w mitochondriach, a także w szlakach przemian węglowodanowych oraz lipidowych. Poznanie dokładnego procesu patofizjologicznego leżącego u podłoża SM pozwoli na ulepszenie diagnostyki tego schorzenia i umożliwi skuteczniejsze leczenie pacjentów, a także monitorowanie progresji procesu chorobowego [9,11,12].

Metabolomika jest wykorzystywana do badań przesiewowych chorób metabolicznych u noworodków, wczesnej diagnostyki nowotworów, ze względu na zmieniony metabolizm w komórkach nowotworowych, a także w przewidywaniu odpowiedzi chorego na proponowane leczenie [9]. Ponadto ta dziedzina nauki pozwala na lepsze zrozumienie patofizjologii chorób i ulepszanie procesu diagnostycznego. Obecnie poszukuje się związków chemicznych, które stanowią swoisty marker świadczący o rozwoju stanu zapalnego w SM, ale także o stopniu zaawansowania choroby. Metabolomika może przyczynić się do rozwoju medycyny spersonalizowanej, której założenia opierają się na indywidualnym podejściu do pacjenta, a tym samym dopasowania najbardziej efektywnego leczenia. Znalezienie takich metabolitów, których zmianę można będzie zaobserwować u dużej grupy osób cierpiących na tą samą chorobę przyczyni się do lepszego zrozumienia etiologii stwardnienia rozsianego. Identyfikacja profilu metabolicznego w praktyce klinicznej może przyczynić się również do odróżnienia pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, zwłaszcza na wczesnym etapie

choroby, od zdrowych osób. Co więcej, przyszły rozwój metabolomiki i jej zastosowanie w leczeniu stwardnienia rozsianego pozwoli na szybsze obrazowanie choroby i tym samym szybsze hamowanie jej wtórnie postępującego przebiegu u pacjentów z RRMS.

Produkty przemiany materii stanowią swoisty marker ukazujący faktyczny stan zmian chorobowych, ponieważ ze względu na ich ilościowy pomiar łatwo jest monitorować zmiany patofizjologiczne u pacjentów. Ponadto, odkrycie odpowiednich i tanich biomarkerów, które korelują z rozwojem choroby, przyczyni się do wzrostu częstości monitorowania postępów choroby i oceny skuteczności protokołów podawania leków [13].

METABOLIZM GLUKOZY W STWARDNIENIU ROZSIANYM

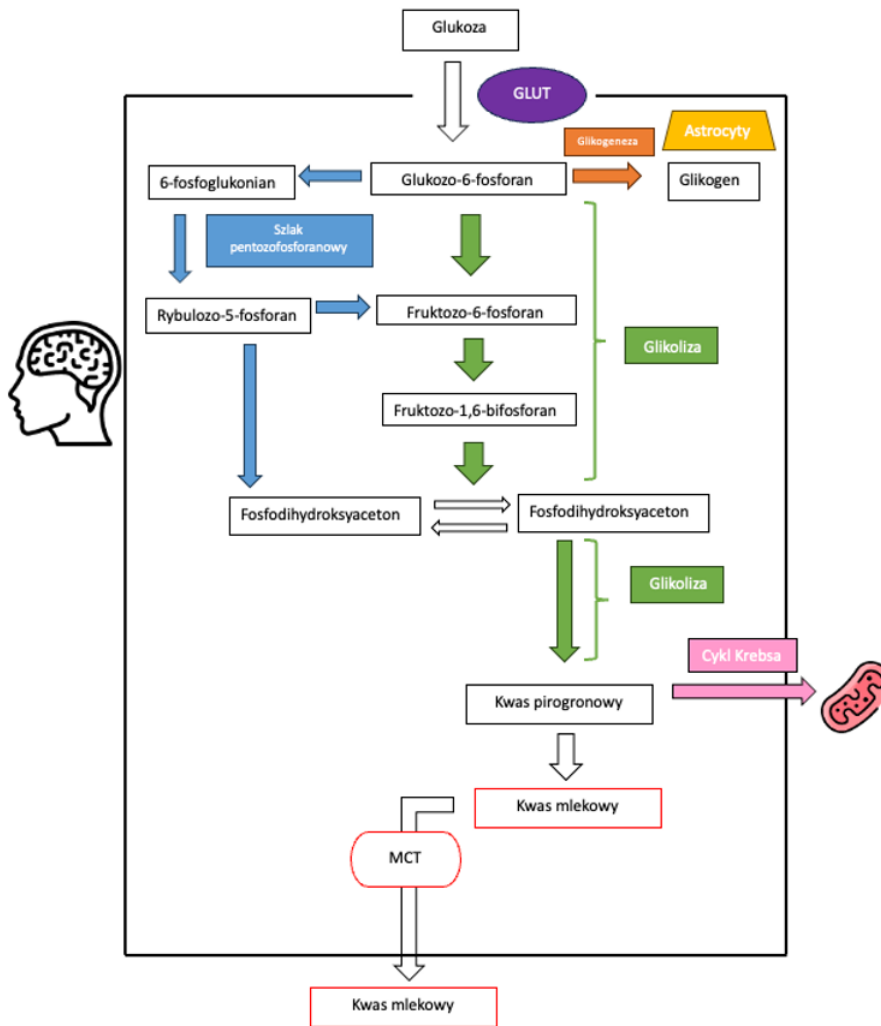
Ze względu na wieloczynnikowe podłoże choroby i duże zróżnicowanie fenotypowe pacjentów, badanie metabolomu stanowi nowe wyzwanie dla współczesnej medycyny. Metabolomika to kompleksowa analiza metabolomu, czyli zestawu metabolitów wytwarzanych lub obecnych w systemach biologicznych w danym momencie. Jej celem jest identyfikacja oraz ilościowe określenie obecności związków o małej masie cząsteczkowej (<1 500 Da) – metabolitów – których stężenia różnią się w zależności od czynników środowiskowych i genetycznych [9]. Metabolity bada się w surowicy krwi, osoczu czy też w PMR. Wykazano, że metabolom u osób ze stwierdzonym stwardnieniem rozsianym może różnić się od metabolomu osób zdrowych [10]. Obecnie do badań w metabolomice w się spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (1H NMR), chromatografię cieczą połączoną ze spektrometrią mas (LC-MS) oraz z chromatografię gazową połączoną ze spektrometrią mas (GC-MS) [9,10].

Ta dziedzina nauki jest wykorzystywana do badań przesiewowych chorób metabolicznych u noworodków, wczesnej diagnostyki nowotworów, ze względu na zmieniony metabolizm w komórkach nowotworowych, a także w przewidywaniu odpowiedzi chorego na proponowane leczenie [9]. Ponadto metabolomika pozwala na lepsze zrozumienie patofizjologii chorób i ulepszenie procesu diagnostycznego. Identyfikacja profilu metabolicznego w praktyce klinicznej może przyczynić się również do odróżnienia pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, zwłaszcza na wczesnym etapie choroby, od zdrowych osób z grupy kontrolnej. Co więcej, przyszły rozwój metabolomiki i jej zastosowanie w leczeniu stwardnienia rozsianego pozwoli na szybsze obrazowanie choroby i tym samym szybsze hamowanie jej wtórnie postępującego przebiegu u pacjentów z RRMS. Ponadto odkrycie odpowiednich i tanich biomarkerów, które korelują z rozwojem choroby, przyczyni się do wzrostu częstości monitorowania postępów choroby i oceny skuteczności protokołów podawania leków [13]. Przykładem tego jest analiza profilu metabolitów w płynie mózgowo-rdzeniowym i w osoczu. Zmiany w poziomie niektórych aminokwasów przypisywane są selektywnemu zaburzeniu ich transportu w obrębie mózgu [14].

Ścisła regulacja metabolizmu glukozy jest niezbędna dla prawidłowej fizjologii mózgu, a zaburzenia na dowolnym etapie szlaku metabolicznego mogą stanowić patofizjologiczne podłoże wielu chorób neurodegeneracyjnych. Metabolizm glukozy dostarcza energii w postaci ATP, które jest niezbędne do przeżycia komórek neuronalnych i nieneuronalnych oraz wytwarzania neuroprzekazników. Transport glukozy odbywa się poprzez transportery glukozy (ang. *glucose transporters*, GLUT). Jej ufosforylowana postać, glukozo-6-fosforan (ang. *glucose-6-phosphate*, Glc-6-P), może być wykorzystywana w trzech głównych skoordynowanych szlakach metabolicznych: glikolizy, reakcji pomostowej i cyklu Krebsa. Zmiany w poziomie metabolitów dostarczają informacji, który szlak w przypadku SM dominuje nad pozostałymi. Spadek poziomu kwasu cytrynowego i szczawiooctowego będących produktami cyklu Krebsa u osób cierpiących na SM wskazuje na pozyskiwanie energii głównie z procesu glikolizy. Zwiększony poziom mleczanu, który jest ostatecznym produktem przemian beztlenowych, świadczy o zmniejszonym udziale procesów oksydacyjnych zachodzących w komórce [16,17]. W Tabeli 1 przedstawiono metabolity związane z przemianami Glc-6-P, na podstawie których można odróżnić pacjentów z SM od osób zdrowych. Nieprawidłowy metabolizm Glc-6-P prowadzi do podwyższonego poziomu pirogronianu zarówno na czczo, jak i po posiłku u osób chorych na SM. Alternatywnie, pirogronian może zostać zredukowany do mleczanu przez dehydrogenazę mleczanową (ang. *lactate dehydrogenase*, Ldh). Powstały mleczan może zostać uwolniony do przestrzeni zewnątrzkomórkowej poprzez transportery monokarboxylowe (ang. *monocarboxylate transporters*, MCTs). Glc-6-P jest utleniany do rybulozo-5-fosforanu oraz wytwarzany

Tabela 1. Zestawienie etapów metabolizowania glukozy oraz metabolitów stanowiących biomarkery oceny stanu zapalnego w neuronach.

Etapy metabolizowania glukozy	Metabolit stanowiący biomarker oceny stanu zapalnego w neuronach
Glikoliza	Podwyższony poziom pirogronianu na czczo i po posiłku [19], zwiększona aktywność enzymów metabolicznych, w tym enolazy i kinazy pirogronianowej w CSF [20], podwyższony poziom enolazy i dehydrogenazy mleczanowej [20].
Cykl Krebsa	Podwyższony poziom α -ketoglutaranu na czczo i cytrynianu po spożyciu glukozy [21].
Fosforylacja oksydacyjna	Zmniejszona ekspresja genu syntazy ATP [22], zwiększona aktywność mitochondrialnego kompleksu ETC IV [23], podwyższona aktywność enzymów kompleksu I, II, III, IV i V [24], zmniejszona ekspresji genu podjednostki 5B oksydazy cytochromu c (ang. <i>cytochrome C oxidase subunit 5B</i> , COX5B) [25]; funkcjonalne istotne defekty białek mitochondrialnych w kompleksie III [26], różna ekspresja genów kinazy kreatynowej i MBP w mózgu pacjentów [27].



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie metabolizmu glukozy w mózgu, zmienione na podstawie [18].

jest dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. *nicotinamide adeninedinucleotide*, NADPH). W kontekście omawiania przemian glukozy w stwardnieniu rozsianym bardzo ważnym szlakiem jest przekształcenie Glc-6-P w glikogen w procesie glikogenezy w astrocytach [15]. Schematyczne przedstawienie metabolizmu glukozy w mózgu przedstawiono na rycinie 1.

ROLA ASTROCYTÓW W PRAWIDŁOWEJ DYSTRYBUCJI SUBSTRATÓW ENERGETYCZNYCH DO MÓZGU

Kluczową rolę w dystrybucji substratów energetycznych do neuronów odgrywają komórki śródbłonna naczyniowego i komórki glejowe, stanowiące prawie połowę objętości mózgu. Astrocyty są pierwszą barierą komórkową, którą napotyka glukoza przedostająca się do mózgu, co czyni je prawdopodobnym miejscem wychwytu glukozy i substratów energetycznych. Receptory i miejsca wychwytu obecne na astrocytach pozwalają neuroprzekaznikom komunikować się z nimi. Strukturalne i funkcjonalne cechy tych komórek sprawiają, że nadają się one do łączenia lokalnych zmian aktywności neuronów ze skoordynowanymi adaptacjami energetycznymi w CNS pacjentów ze stwardnieniem rozsianym [28].

U pacjentów chorych na SM obserwuje się podwyższony poziom stężenia pirogronianu [29] i α -ketoglutaranu we krwi zarówno na czczo, jak i po posiłku. Zwiększona aktywność enzymów metabolicznych, w tym enolazy, kinazy pirogronianowej, Ldh i aldolazy w płynie mózgowo-rdzeniowym czyni je czułym wskaźnikiem aktywnej demielinizacji towarzyszącej MS [30]. Ponadto, w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów ze zdiagnozowanym SM obserwuje się zwiększony poziom receptorów gamma aktywowanego przez proliferatorami peroksyosomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR γ). Jest to czynnik transkrypcyjny aktywowany ligandem, odgrywający kluczową rolę w regulacji metabolizmu glukozy i lipidów. Podwyższona ekspresja PPAR γ została odnotowana w modelach *in vitro* demielinizacji indukowanej antygenem. Odkrycia te mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia roli PPAR γ w patogenezie stwardnienia rozsianego [31].

Badania pacjentów z RRMS i SPMS wykazały zwiększony poziom mleczanu, sorbitolu i glukozy w płynie mózgowo-rdzeniowym (w mniejszym stopniu u pacjentów z RRMS w porównaniu z pacjentami SPMS). Opisywane zmiany w metabolizmie energetycznym mogą przyczyniać się do dys-

funkcji mitochondriów i zwyrodnienia neuroaksonalnego, które leży u podstaw progresji stwardnienia rozsianego. Z kolei inne badania wykazały, że aktywność enolazy, kinazy pirogronianowej, Ldh i aldolazy była zwiększona u pacjentów chorujących na SM [30].

Inna istotną kwestią, oprócz aspektów związanych z metabolizmem glukozy, jest obecność mleczanu jako ważnego biomarkera SM [32]. Jego poziom jest skorelowany ze wzrostem liczby blaszek zapalnych, będących konsekwencją rozpadu mieliny. W wyniku tego procesu neuropatologicznego obserwuje się zwiększenie poziomu beta hydrokysyzoamasłanu [33]. U pacjentów z SM obserwuje się także podwyższony poziom glutaminy i O-fosfoetanolaminy w mózgu, co może być związane z niszczeniem oligodendrocytów i rozproszonym procesem neurodegeneracyjnym, charakterystycznym dla tej jednostki chorobowej.

Jak pokazują dane literaturowe, badacze zajmujący się pacjentami ze zdiagnozowanym stwierdzeniem rozsianym odnotowali u nich także podwyższony poziom mio-inozytolu i kreatyny. Wyniki badań eksperymentalnych potwierdziły, że zaobserwowane stężenia wynikają z dużej gęstości komórek glejowych [34]. Badanie dotyczące fofatydyloetanolaminy w istocie szarej i istocie białej wykazało wyższą zawartość fosfolipidów i niższą zawartość sfingolipidów w składzie lipidowym tych tkanek [35].

ZNACZENIE SZLAKU KYNUREINOWEGO, SEROTONINOWEGO ORAZ INNYCH METABOLITÓW W FENOTYPOWANIU PACJENTÓW ZE STWARDNIENIEM ROZSIANYM

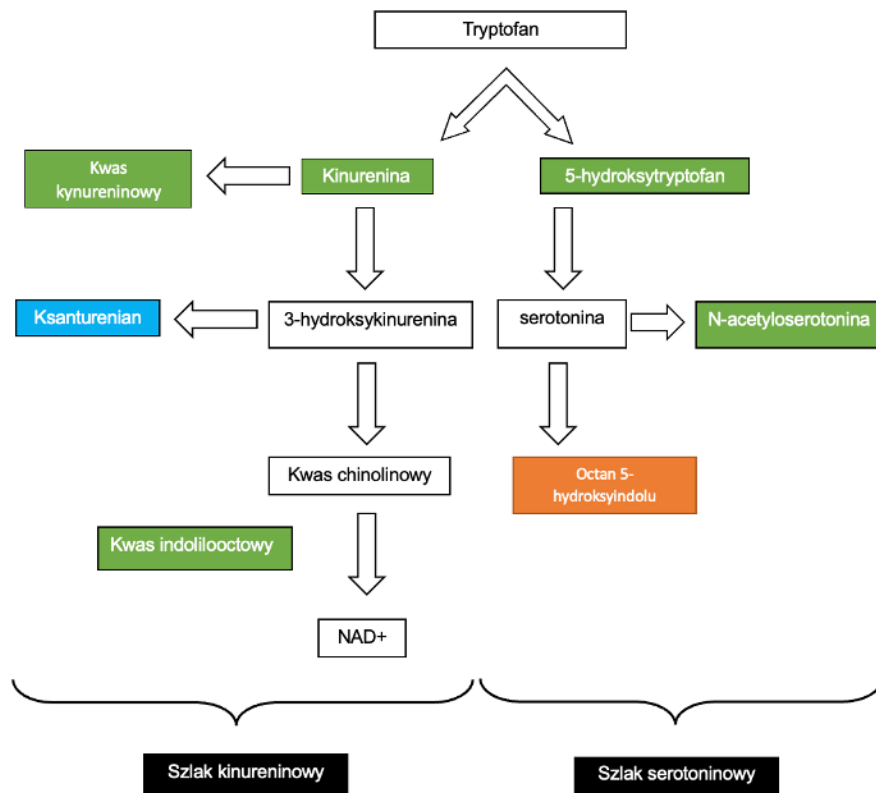
Porównując pacjentów ze zdiagnozowanym PPMS do osób zdrowych i z objawami RRMS, zaobserwowano istotną statystycznie różnicę stężenia tryptofanu i fenyloalaniny, która ponadto różni się istotnie statystycznie, gdy porówna się pacjentów ze zdiagnozowanym PPMS do osób zdrowych i do osób z objawami RRMS. Wykazano także zależność między niskim poziomem tryptofanu a cięższym przebiegiem i możliwością nawrotu choroby u dzieci dotkniętych pediatrycznym stwardnieniem rozsianym (PMS). Badania te skupiły się nad sekwencjonowaniem genu 16S rRNA bakterii zasiedlających mikroflorę jelitową, które rozkładają tryptofan. Ich wyniki pokazały potencjalną zależność między osią jelito-mózg i metabolitami a postępiem chorobotwórczym [36]. Metabolizm pirymidyn, azotu i puryn oraz biosynteza i degradacja waliny, leucyny i izoleucyny były wyjątkowo zmienione u pacjentów z SPMS i RRMS. Największe różnice stwierdzono w przypadku metabolizmu pirymidyn, a cztery metabolity związane z metabolizmem pirymidyn były znacząco zmienione w SPMS w porównaniu z pacjentami z RRMS, gdzie poziom glutaminy, tyminy i urydyny u pacjentów z RRMS był zwiększony [37].

Szlak kynureinowy, w którym zachodzą przemiany metaboliczne tryptofanu, wymieniany jest jako jeden z najczęstszych jeżeli chodzi o etiologię SM [38]. Obecność tryptofanu ma kluczowe znaczenie w diagnostyce chorych, ze względu na jego odmienny poziom w różnych stadiach stwardnienia rozsianego, szczególnie w odróżnieniu pacjentów z objawami RRMS i SPMS. Tryptofan jest prekursorem kwasu kynu-

reinowego (ang. *kynureninic acid*, KYNA), którego poziom w płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF) jest znacząco wyższy u chorych na SPMS w porównaniu z pacjentami z RRMS i zmienia się w trakcie trwania SM [37]. Badania wykazują, że metabolizm tryptofanu, a zwłaszcza metabolitów w szlaku kynureniny rozkładającej tryptofan, jest zmieniony w różnych typach SM – w tym RRMS i SPMS [40,41]. Metabolity te zostały uznane za środek komunikacji między układem odpornościowym a CNS i mogą odgrywać kluczową rolę w przebiegu choroby [39]. KYNA wykazuje neuroprotekcję, a zahamowanie jego syntezy prowadzi do zakłócenia szlaków nerwowych [38]. Ponadto udowodniono, że podwyższony stosunek KYNA do tryptofanu działa jako immunomodulator, który reguluje odpowiedź odpornościową organizmu i tym hamuje nasilenie nowych objawów u pacjentów z RRMS [42]. Co również istotne, niższy poziom KYNA w CSF stwierdzono u tych pacjentów z RRMS, u których choroba znajdowała się w fazie remisji [43]. Ksanturenian ze szlaku kynureninowego został zidentyfikowany i oznaczony, jednakże nie został uwzględniony jako wiarygodny marker rozwoju stanu zapalnego SM [37]. Z drugiej strony przewlekła aktywacja KP i zwiększona produkcja kwasu chinolinowego (QA), który jest produktem kwasu 3-hydroksyantranilowego, powoduje zachwianie równowagi między hamowaniem a pobudzeniem neuronów. Jednocześnie poziom QA, wzrasta wraz z nasilaniem się choroby i jest większy w podgrupie PPMS [44].

Badania pokazują, że z tryptofanem powiązany jest ściśle także szlak serotoninowy, gdzie u pacjentów z SPMS obserwuje się znacząco podwyższony poziom 5-hydroksytryptofanu (ang. *5-hydroxytryptophan*, 5-HTP) i obniżony poziom kwasu 5-hydroksyindoloctowego (ang. *5-hydroxyindoleacetic acid*, 5-HIAA) [37]. Stwierdzono również znacznie podwyższone poziomy pochodnej serotoniny N-acetyloserotoniny w SPMS w porównaniu z pacjentami z RRMS i osobami zdrowymi, co wpływało na czas trwania choroby. Podobnie było w przypadku 5-HIAA, który miał związek z Rozszerzoną Skalą Stanu Niepełnosprawności (ang. *Expanded Disability Status Scale*, EDSS) i wielkością rdzenia kręgowego, przy czym ujemna korelacja z EDSS była zgodna z wcześniejszymi ustaleniami dot. płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów z SM [45]. Graficzne przedstawienie metabolitów na szlaku kynureinowym i serotoninowym, które są markerami w rozwoju SPMS, zostało pokazane na rycinie 2.

U pacjentów z SPMS wyróżnia się 19 metabolitów, które nie uległy zmianie względem grupy ze zdiagnozowanym RRMS, jak i grupy kontrolnej: 1-metyloadenozyna, 3-metoksytyramina, 4-acetamidobutanian, octan 5-hydroksyindolu (ang. *5-hydroxyindole acetate*, 5-HIAA), 5-HTP, kofeina, deoksyurydina, guanozyna, ketoleucyna, kynurenat (KYNA), N-acetyloleucyna, N-acetylofenyloalanina, N-acetyloserotonina, N6-(delta2-izopentenylo)-adenina, O-sukcynylo-homoseryna, fenylooctan, pipekolan, trygonelina i urydina. Opisane zmiany biochemiczne reprezentują modyfikacje unikalne dla fenotypu SPMS w porównaniu zarówno z RRMS, jak i grupy kontrolnej. Połączenie minimum czterech metabolitów biorących udział w szlakach syntezy określonego typu związku dało podstawę do stwierdzenia, że u pacjentów z objawami RRMS występują zaburzenia nastę-



Rycina 2 Metabolizm tryptofanu z uwzględnieniem różnic na poziomie metabolitów u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Na zielono zaznaczono wzrost określonych metabolitów, na niebiesko brak istotnie statystycznych różnic, a na pomarańczowo spadek poziomu metabolitu, zmienione na podstawie [37].

pujących szlaków metabolicznych: metabolizm puryn (cykliczny AMP, glutamina, guanozyna, sól kwasu moczowego, ksantozyna), metabolizm pirymidyn (dezoksyurydina, glutamina, tymina, urydina), metabolizm argininy i proliny (4-acetamidobutanian, 4-guanidynobutanian, cytrulina, glutamina), metabolizm tyrozyny (3,4-dihydroksyfenyloglikol, 3-metoksytyramina, homogentyzynian, tyrozyna), metabolizm fenyloalaniny (4-hydroksybenzoesan, N-acetylofenyloalanina, fenylooctan, fenyloalanina, tyrozyna), metabolizm tryptofanu (5-HIAA, 5-HTP, indolo-3-octan, KYNA, kynurenina (KYN), N-acetyloserotonina, tryptofan) i biosynteza aminoacylo-tRNA (glutamina, izoleucyna/leucyna, metionina, fenyloalanina, tyrozyna, walina) [37]. Pacjenci cierpiący na RRMS, w porównaniu z pacjentami z CPMS, cechują się niższym poziomem glutaminy w surowicy [46]. Może to wskazywać na zwiększone wykorzystanie glutaminianu albo przez same astrocyty, albo przez neurony w RRMS [46]. Taka sytuacja prowadzi do upośledzenia funkcji astrocytów, które poprzez gliotransmitery przekazują informacje zwrotne zarówno do neuronów presynaptycznych, jak i postsynaptycznych [16]. Znaczny wzrost reaktywnych form tlenu związany jest z niskim poziomem glutaminy, czyli prekursora glutationu będącego kofaktorem peroksydazy glutationowej, który swoją aktywnością przyczynia się do zmniejszenia stresu komórkowego w obrębie mitochondriów [47]. Do prawidłowego funkcjonowania tego enzymu niezbędna jest obecność jonów selenu. Wiedza uzyskana z profilu metabolomicznego pacjentów chorych na SM przyczyniła się do uzupełnienia ich leczenia farmakologicznego o wskazany pierwiastek [9]. Innym markerem jest glutamina, która jest głównym neurotransmiterem związanym

z komórkami gleju. Degeneracyjne działanie mikrogleju w SM polega na uwalnianiu mieloperoksydazy, która podtrzymuje kaskadę zapalną w ognisku demielinizacji oraz wywołuje dalsze uszkodzenie tkanki nerwowej [49], a tym samym zmiany w poziomie glutaminy. Z uwagi na ten fakt glutamina stanowi wiarygodny marker monitorowania procesów chorobotwórczych [49].

ZNACZENIE PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO W PROFILOWANIU METABOLICZNYM OSÓB Z SM

Uszkodzenie bariery krew-mózg (ang. *blood brain barrier*, BBB), będące cechą charakterystyczną zapalnych zaburzeń autoimmunologicznych, przyczynia się pośrednio do określenia profilu metabolicznego [54]. W związku z tym, że CSF pozostaje w bliskim kontakcie z mózgiem, rozwój stanu zapalnego i uszkodzenie komórek nieodłącznie związane jest z wieloetapowym procesem patologii stwardnienia rozsianego [52].

Istnieje coraz więcej dowodów na znaczenie lipidów w patofizjologii stwardnienia rozsianego [50,51]. Lipidy odgrywają kluczową rolę w biologii komórki i stanach zapalnych, a ich wysokie stężenie obserwuje się w tkance nerwowej budującej mózg [52]. Jednymi z najważniejszych lipidów, którego obecność w osoczu związana jest z dysfunkcją BBB, są glicerofosfolipidy. Ich wysokie stężenie stanowi biomarker przy diagnozie SM [53]. Dzieje się tak, ponieważ metabolizm tłuszczów podlega wpływowi stresu oksydacyjnego i dysfunkcji mitochondriów, czy szerzej, procesów patofizjologicznych związanych z występowaniem stward-

nienia rozszianego. Ostatnie badania wykazały, że mio-inozytol w CSF jest biomarkerem odróżniającym SM od innych chorób neurodegeneracyjnych. Z kolei obecność chitinaazy-3 i jej zmienny poziom w CSF świadczy o nadchodzącym rzucie choroby [54,55].

Pacjenci z SM cechują się wyższym poziomem sfingomielinazy, której działanie polega na hydrolizie sfingomieliny, czego konsekwencją jest powstanie ceramidu. Jego obecność związana jest z uszkodzeniem i demielinizacją aksonów towarzyszącemu chorobie [56]. Kolejną klasą lipidów, które stanowią odpowiedni biomarker służący do odróżnienia osób chorych, są glicerofosfolipidy występujące w błonach biologicznych [57,58]. Inna próba powiązania biomarkerów kandydujących dla SM i cech klinicznych wykazała negatywną korelację między obecnością lizofosfatydylocholin, a nasileniem się objawów chorobowych w skali EDSS, co sugeruje działanie neuroprotektoryjne [57]. Oznacza to, że profil metabolomu lipidowego powinien być traktowany jako marker procesów neurodegeneracji, nie zaś procesu zapalnego w obrębie neuronów [53].

W CSF znajdują się również inne metabolity, których monitorowanie może zapewnić lepszy wgląd i diagnozę stwardnienia rozszianego. Badania z wykorzystaniem spektrometrii NMR wykazały znaczny spadek fenyloalaniny, cytrynianu, 3-hydroksymasłanu, mannozy i 2-hydroksyizowalerianu, których obecność sugeruje działanie ochronne na neurony [59,60].

Badania CSF znajdują zastosowanie w porównywaniu i ocenie stężenia tych samych metabolitów, lecz w odmiennych chorobach neurodegeneracyjnych. Spektrum zaburzeń zapalenia nerwu wzrokowego (ang. *neuromyelitis optica spectrum disorders*, NMOSD) to rzadka choroba o podłożu autoimmunologicznym, charakteryzująca się ciężkim zapaleniem nerwów wzrokowych, rdzenia kręgowego i innymi objawami z zakresu CNS. Do 2004 roku NMOSD, określane również nazwą chorobą Devica, uznawane było za ciężki podtyp stwardnienia rozszianego. Podstawą jej klasyfikacji jako oddzielnej jednostki chorobowej było odkrycie przeciwciała przeciw akwaporynie 4 (ang. *anti-aquaporin antibodies 4 AQP4-IgG*) [61]. Analiza porównawcza metabolomu w CSF ujawniła, że pacjenci z SM mają niższy poziom cytrynianu, izoleucyny i waliny niż pacjenci z NMOSD. Natomiast u pacjentów NMOSD zaobserwowano znacznie wyższy poziom mleczanu niż u pacjentów w SM [62]. Zmiany tych metabolitów związane są ze zmienioną biosyntezą kwasów tłuszczowych i metabolizmem energetycznym mózgu. Odnotowano również wyższe ilości 2-hydroksymasłanu, acetonu, fumaranu i piroglutaminianu oraz niższe ilości octanu oraz glukozy w SM i NMOSD [63]. Wzrost poziomu fruktozy, kreatyniny, glutaminy, glukozy i octanu obserwuje się w stwardnieniu rozszianym oporowym (ang. *clinically isolated syndrome, CIS*) [63,64].

CFS odgrywa zatem pierwszorzędową rolę w diagnostyce SM. Metabolity w nim zawarte odzwierciedlają procesy zapalne zachodzące w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Dodatkowo, drobnocząsteczkowe substancje pomagają uzyskać wgląd w aktualny stan metaboliczny komórki. Obok CSF innymi płynami ustrojowymi, które brane są do

analizy metabolomicznej jest osocze i mocz. W osoczu odnotowuje się zmieniony poziom fosfatydylocholony (ang. *phosphatidylcholine*, PC) i lizofosfatydylocholiny (ang. *lysophosphatidylcholines*, LPC). Spadek całkowitego stosunku LPC do PC jest markerem, który odróżnia MS od innych chorób neurodegeneracyjnych [65]. Analiza próbek moczu trzech grup: pacjentów z SM, pacjentów chorych na NMOSD i osób zdrowych chorymi na NMOSD wykazała zmiany w 27 metabolitach związanych z syntezą i degradacją aminokwasów, ciał ketonowych, cyklem kwasów trikarboksylowych, glikolizą, propionianem i metabolizmem pirogronianiu. Zmiana metabolitów w osoczu jest konsekwencją procesów chorobowych, którym towarzyszą zmiany w mikrobiocie jelitowej, aktywności mitochondriów oraz metabolizmie energii i kwasów tłuszczowych w mikrobiocie jelitowej [66].

ZNACZENIE STRESU OKSYDACYJNEGO W NASILENIU OBJAWÓW CHOROBY SM

U osób chorujących na stwardnienie rozsziane obserwuje się zmianę ekspresji białek w mózgu, do których możemy zaliczyć: COX5B, podjednostkę beta hemoglobiny i podstawowe białko mielinowe (MBP) [67,68]. W wyniku przedłużającego się procesu zapalnego komórki mikrogleju i makrofagi uwalniają reaktywne formy tlenu oraz tlenek azotu. Substancje te zaburzają prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów, co prowadzi do deficytu energetycznego w neuronach.

Analiza metabolomiczna osób chorych na SM wykazała, że mała ilość kwasu askorbinowego przyczynia się do zaburzonej równowagi pomiędzy wolnymi rodnikami a przeciwutleniaczami, powodując nasilenie stresu oksydacyjnego. Duża ilość takich związków jak azotyny, azotany i malondialdehyd (MDA) inicjuje ten proces [69,70]. Ich obecność w płynie mózgowo-rdzeniowym i moczu podczas ostrych zaostrzeń choroby była związana z progresją aktywności zapalnej [71]. MDA przyczynia się do peroksydacji lipidów za pośrednictwem reaktywnych form tlenu. W wyniku tego procesu powstają aldehydy pochodzące z utleniania lipidów, których obecność może uszkadzać białka błonowe. Jednocześnie przyczyniają się one do wytwarzania autoantygenów, które powstają wskutek utraty tolerancji na własne antygeny, co z kolei może przyczyniać się do znacznego nasilenia objawów chorobowych [69].

Za stres oksydacyjny i nitrozacyjny w głównej mierze odpowiedzialne są: interleukina-10 (IL-10), czynnik martwicy nowotworów (TNF-alfa), interferon- γ (IFN- γ) oraz toksyny powstające na skutek reakcji białek osocza z chlorowanymi utleniaczami, takimi jak chloraminy, kwas podchlorawy, produkty zaawansowanego utleniania białek (ang. *advanced oxidation protein products*, AOPP) i metabolity tlenu azotu [72]. Pacjenci, którzy uzyskali wyższy wynik w EDSS, charakteryzowali się także większą ilością wskazanych wyżej biomarkerów. Jedną z metod, która w przyszłości ma szansę zatrzymać procesy neurodegeneracyjne u pacjentów chorych na SM, jest terapia mająca na celu ochronę mitochondriów przed reaktywnymi formami tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) oraz zwiększenie mitochondrialnego metabolizmu energetycznego [49].

ZALEŻNOŚCI MIĘDZY METABOLOMEM A CZASEM OD WYSTĄPIENIA PIERWSZYCH OBJAWÓW STWARDNIENIA ROZSIANEGO

Badania, które uwzględniają biochemiczne aspekty SM wskazują na istnienie zależności między obecnością niektórych metabolitów, a długością trwania choroby. U pacjentów z RRMS trwającym co najmniej 13 lat obserwuje się istotny statystycznie zwiększony poziom długołańcuchowych kwasów tłuszczowych produkowanych przez bakterie zasiedlające jelito grube, które charakteryzują się właściwościami przeciwzapalnymi [73]. Równoległe do tego poziom markerów stresu oksydacyjnego w obrębie mitochondriów (np. bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, VLCFA) pozostaje bez zmian w porównaniu z osobami zdrowymi. Wzrost VLCFA jest konsekwencją spowolnienia procesów beta oksydacji i zwiększenia aktywności enzymów z klasy peroksydaz.

U pacjentów z SPMS zauważono niezmienną wartość w poziomie hydroksylowanych nienasyconych bardzo długich kwasów tłuszczowych (ang. Gastrointestinal Tract Acids, GTAs) i jednocześnie zwiększony poziom biomarkerów świadczących o stresie oksydacyjnym oraz wzrost plazmalogenu etanolaminowego (EtnPLA) [74]. EtnPLA jest lipidem eterowym wykazującym właściwości przeciwzapalne, a także istotnym składnikiem neurolemmy, którego stężenie w dwuwarstwie różni się w zależności od typu komórki i postępu choroby [40]. Wyższy poziom GTAs u pacjentów z RRMS sugeruje odpowiedź protekcyjną we wczesnym stadium choroby, a następnie ulega zmniejszeniu w momencie wystąpienia fazy progresywnej. Istnieją również wyniki badań, w których wykazano, że najsilniejsze pozytywne powiązania pomiędzy czasem trwania choroby a metabolitami stwierdzono dla 4-acetamidobutanianu i indolo-3-octanu. Z kolei najsilniejsze negatywne powiązania z czasem trwania choroby stwierdzono w przypadku dezoksyurydyny i kofeiny [37].

PODSUMOWANIE

W artykule przedstawiono informacje o najważniejszych metabolitach, których różnica w poziomie świadczy o zmianach neurodegeneracyjnych u pacjentów cierpiących na stwardnienie rozsiane. Rozwój metabolomiki, obok innych dziedzin nauk związanych z biologią systemów, stanowi dopełnienie genomiki, transkryptomiki i proteomiki, co pozwala na lepsze zrozumienie podstaw podłoża choroby. Badania wykazały różnice w profilu metabolicznym osób ze stwardnieniem rozsianym w porównaniu z osobami zdrowymi, ze szczególnym uwzględnieniem metabolizmu glukozy. Poszukiwanie korelacji między większą ilością metabolitów świadczących o rozwoju choroby w przyszłości może przyczynić się do odkrycia nowych metod leczenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Dobson R, Giovannoni G (2019) Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol* 26: 27-40
2. Doshi A, Chataway J (2016) Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clin Med (Lond)* 16: 53-59
3. Zapadalność na stwardnienie rozsiane. https://analizy.mz.gov.pl/html/zpa_sm/zapadalnosc.html (data dostępu: 23.06.2023)

4. Chorobowość stwardnienia rozsianego w Polsce.: https://analizy.mz.gov.pl/html/zpa_sm/chorobowosc.html (data dostępu: 23.06.2023)
5. Garg N, Smith TW (2015) An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav* 5(9): e00362
6. Katz Sand I (2015) Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 28(3): 193-205
7. Yamout BI, Alroughani R (2018) Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 38(2): 212-225
8. Correale J, Gaitán ML, Ysrraelit MC, Fiol MP (2017) Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain J Neurol* 140(3): 527-546
9. Rispoli MG, Valentinuzzi S, De Luca G, Del Boccio P, Federici L, Di Iorio M, Digiovanni A, Grasso E. A, Pozzilli V, Villani A, Chiarelli A.M, Onofri M, Wise R.G, Pieragostino D, Tomassini V (2021) Contribution of Metabolomics to Multiple Sclerosis Diagnosis, Prognosis and Treatment. *Int J Mol Sci* 22(20): 11112
10. Bhargava P, Fitzgerald KC, Calabresi PA, Mowry EM (2017) Metabolic alterations in multiple sclerosis and the impact of vitamin D supplementation. *JCI Insight* 2(19): e95302
11. Park SJ, Choi JW (2020) Brain energy metabolism and multiple sclerosis: progress and prospects. *Arch Pharm Res* 43(10): 1017-1030
12. Pashaei S, Mohammadi P, Yarani R, Haghgoo SM, Emami MS (2021) Carbohydrate and lipid metabolism in multiple sclerosis: Clinical implications for etiology, pathogenesis, diagnosis, prognosis, and therapy. *Arch Biochem Biophys* 712: 109030
13. Zahoor I, Rui B, Khan J, Datta I, Giri S (2021) An emerging potential of metabolomics in multiple sclerosis: a comprehensive overview. *Cell Mol Life Sci* 78(7): 3181-3203.
14. Quershi GA, Baig MS (1988) Quantitation of free amino acids in biological samples by high-performance liquid chromatography: Application of the method in evaluating amino acid levels in cerebrospinal fluid and plasma of patients with multiple sclerosis. *J Chromatogr A* 459: 237-244
15. Mathur D, López-Rodas G, Casanova B, Marti MB (2014) Perturbed glucose metabolism: insights into multiple sclerosis pathogenesis. *Front Neurol* 1: 5-250
16. Broadwater L, Pandit A, Azzam S, Clements R, Vadnal J, Sulak M (2011) Analysis of the mitochondrial proteome in multiple sclerosis cortex. *Biochim Biophys Acta* 1812(5): 630-41
17. Lim CK, Bilgin A, Lovejoy DB, Tan V, Bustamante S, Taylor BV, Besse A, Brew BJ, Guillemin GJ (2017) Kynurenine Pathway Metabolomics Predicts and Provides Mechanistic Insight into Multiple Sclerosis Progression. *Sci Rep* 7: 41473
18. Mathur D, López-Rodas G, Casanova B, Marti MB (2014) Perturbed glucose metabolism: insights into multiple sclerosis pathogenesis. *Front Neurol* 5: 250
19. Jones HH, Jones HH, Bunch LD (1950) Biochemical studies in multiple sclerosis. *Ann Intern Med* 33(4): 40-831
20. Royds JA, Timperley WR, Taylor CB (1981) Levels of enolase and other enzymes in the cerebrospinal fluid as indices of pathological change. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 44: 35-1129
21. Henneman DH, Altschule MD, Goncz RM, Alexander L (1954) Carbohydrate metabolism in brain disease. Glucose metabolism in multiple sclerosis. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 72(6): 95-688
22. Smith KJ, Lassmann H (2002) The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 1(4): 41-232
23. Regenold WT, Phatak P, Makley MJ, Stone RD, Kling MA (2008) Cerebrospinal fluid evidence of increased extra-mitochondrial glucose metabolism implicates mitochondrial dysfunction in multiple sclerosis disease progression. *J Neurol Sci* 275: 12-106
24. Iñarrea P, Alarcia R, Alava MA, Capablo JL, Casanova A, Iñiguez C (2014) Mitochondrial complex enzyme activities and cytochrome c expression changes in multiple sclerosis. *Mol Neurobiol* 49(1): 1-9
25. Safavizadeh N, Rahmani SA, Zaefizadeh M (2013) Investigation of cytochrome c oxidase gene subunits expression on the multiple sclerosis. *Indian J Hum Genet* 19(1): 18-25

26. Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull D (2008) Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 131: 35-1722
27. Broadwater L, Pandit A, Azzam S, Clements R, Vadnal J, Sulak M (2011) Analysis of the mitochondrial proteome in multiple sclerosis cortex. *Biochim Biophys Acta* 1812(5): 41-630
28. Mathur D, López-Rodas G, Casanova B, Marti MB (2014) Perturbed glucose metabolism: insights into multiple sclerosis pathogenesis. *Front Neurol* 1: 5-250
29. Jeanes AL, Cumings JN (1958) Some laboratory investigations in multiple sclerosis. *Confin Neurol* 18(6): 397-404
30. Royds JA, Timperley WR, Taylor CB (1981) Levels of enolase and other enzymes in the cerebrospinal fluid as indices of pathological change. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 44: 35-1129
31. Szalardya L, Zadoria D, Tanczosb E, Simuc M, Bencsika K, Vecseia dL (2013) Elevated levels of PPAR-gamma in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 554: 4-131
32. Tarp U (1994) Selenium and the selenium-dependent glutathione peroxidase in rheumatoid arthritis. *Dan Med Bull* 41: 264-274
33. Lutz NW, Viola A, Malikova I (2007) Inflammatory multiple-sclerosis plaques generate characteristic metabolic profiles in cerebrospinal fluid. *PLoS One* 2(7)
34. Tisell A, Leinhard OD, Warntjes JBM (2013) Increased concentrations of glutamate and glutamine in normal-appearing white matter of patients with multiple sclerosis and normal MR imaging brain scans. *PLoS One* 17(8)
35. Wheeler D, Bandaru VVR, Calabresi PA, Nath A, Haughey NJ (2008) A defect of sphingolipid metabolism modifies the properties of normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 131(11): 3092-3102
36. Nourbakhsh B, Bhargava P, Tremlett H (2018) Altered tryptophan metabolism is associated with pediatric multiple sclerosis risk and course. *Ann Clin Transl Neurol* 5: 1211-1221
37. Herman S, Åkerfeldt T, Spjuth O, Burman J, Kultima K (2019) Biochemical Differences in Cerebrospinal Fluid between Secondary Progressive and Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. *Cells* 8(2):84
38. Guillemain G, Kerr S, Smythe G, Smith D, Kapoor V, Armati P, Croitoru J, Brew BJ (2001) Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: A paradox for neuronal protection. *J Neurochem* 78: 842-853
39. Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J (2013) Kynurenines in the CNS: Recent Advances and New Questions. *Nat Rev Drug Discov* 12: 64-82
40. Lim CK, Bilgin A, Lovejoy DB, Tan V, Bustamante S, Taylor BV, Besede A, Brew BJ, Guillemain GJ (2017) Kynurenine Pathway Metabolomics Predicts and Provides Mechanistic Insight into Multiple Sclerosis Progression. *Sci Rep* 7: 41473
41. Rajda C, Majláth Z, Pukoli D, Vécsei L (2015) Kynurenines and Multiple Sclerosis: The Dialogue between the Immune System and the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 16: 18270-18282
42. Senanayake VK, Jin W, Mochizuki A, Chitou B, Goodenowe DB (2015) Metabolic dysfunctions in multiple sclerosis: Implications as to causation, early detection, and treatment, a case control study. *BMC Neurol* 15: 154
43. Rejdak K, Bartosik-Psujek H, Dobosz B, Kocki T, Grieb P, Giovannoni G, Turski WA, Stelmasiak Z (2002) Decreased Level of Kynurenic Acid in Cerebrospinal Fluid of Relapsing-Onset Multiple Sclerosis Patients. *Neurosci Lett* 331: 63-65
44. Lim CK, Bilgin A, Lovejoy DB, Tan V, Bustamante S, Taylor BV, Besede A, Brew BJ, Guillemain GJ (2017) Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression. *Sci Rep* 7: 41473
45. Markianos M, Koutsis G, Evangelopoulos ME, Mandellos D, Karahaliou G, Sfagos C (2009) Relationship of CSF Neurotransmitter Metabolite Levels to Disease Severity and Disability in Multiple Sclerosis. *J Neurochem* 108: 158-164
46. Aasly J, Gårseth M, Sonnewald U, Zwart JA, White LR, Unsgård G (1997) Cerebrospinal fluid lactate and glutamine are reduced in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 95(1): 9-12
47. Tarp U (1994) Selenium and the selenium-dependent glutathione peroxidase in rheumatoid arthritis. *Dan Med Bull* 41: 264-274
48. Lefkowitz DL, Lefkowitz SS (2008) Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med* 45(5): 726-31
49. Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161: 303-310
50. Cermentati G, Mitro N, Audano M, Melcangi RC, Crestani M, De Fabiani E (2015) Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to patho-physiology. *Biochim Biophys Acta* 1851(1): 51-60
51. Adibhatla RM, Hatcher JF (2007) Role of Lipids in Brain Injury and Diseases *Future Lipidol* 2(4): 22-403
52. Simon MJ, Iliff JJ (2016) Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1862(3): 51-442
53. Oliveira EML, Montani DA, Oliveira-Silva D, Rodrigues-Oliveira AF, Matas SLA, Fernandes GBP, Silva IDCG, Lo Turco EG (2019) Multiple sclerosis has a distinct lipid signature in plasma and cerebrospinal fluid. *Arq Neuropsiquiatr* 77: 696-704
54. Reinke SN, Broadhurst DL, Sykes BD, Baker GB, Catz I, Warren K.G, Power C (2014) Metabolomic profiling in multiple sclerosis: Insights into biomarkers and pathogenesis. *Mult Scler* 20: 1396-1400
55. Hinsinger G, Galéotti N, Nabholz N, Urbach S, Rigau V, Demattei C (2015) Chitinase 3-like proteins as diagnostic and prognostic biomarkers of multiple sclerosis. *Mult Scler* 21(10): 1251-61
56. Pieragostino D, Cicalini I, Lanuti P, Ercolino E, Loia M, Zucchelli M (2018) Enhanced release of acid sphingomyelinase-enriched exosomes generates a lipidomics signature in CSF of Multiple Sclerosis patients. *Sci Rep* 8(1): 3071
57. Villoslada P, Alonso C, Agirrezabal I, Kotelnikova E, Zubizarreta I, Pulido-Valdeolivas I (2017) Metabolomic signatures associated with disease severity in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 4(2): e321
58. Del Boccio P, Pieragostino D, Di Ioia M, Petrucci F, Lugaresi A, De Luca G (2011) Lipidomic investigations for the characterization of circulating serum lipids in multiple sclerosis. *J Proteomics* 74(12): 2826-36
59. Reinke S, Broadhurst D, Sykes B (2014) Metabolomic profiling in multiple sclerosis: insights into biomarkers and pathogenesis. *Mult Scler* 20(10): 1396-1400
60. Mathur D, López-Rodas G, Casanova B, Marti MB (2014) Perturbed glucose metabolism: insights into multiple sclerosis pathogenesis. *Front Neurol* 5: 250
61. Kim HH, Jeong IH, Hyun JS, Kong BS, Kim HJ, Park SJ (2017) Metabolomic profiling of CSF in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder by nuclear magnetic resonance. *PLoS One* 12(7): e0181758
62. Noga MJ, Dane A, Shi S (2012) Metabolomics of cerebrospinal fluid reveals changes in the central nervous system metabolism in a rat model of multiple sclerosis. *Metabolomics* 8(2): 253-263
63. Hassan-Smith G, Wallace GR, Douglas MR, Sinclair AJ (2012) The role of metabolomics in neurological disease. *J Neuroimmunol* 248(1-2): 48-52
64. Lutz NW, Viola A, Malikova I (2007) Inflammatory multiple-sclerosis plaques generate characteristic metabolic profiles in cerebrospinal fluid. *PLoS One* 2(7): e595
65. Del Boccio P, Pieragostino D, Di Ioia M (2011) Lipidomic investigations for the characterization of circulating serum lipids in multiple sclerosis. *J Proteomics* 74(12): 2826-2836
66. Gebregiworgis T, Nielsen HH, Massilamany C (2016) A urinary metabolic signature for multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Proteome Res* 15(2): 659-666
67. Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull D (2008) Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 131: 35-1722

68. Broadwater L, Pandit A, Azzam S, Clements R, Vadnal J, Sulak M (2011) Analysis of the mitochondrial proteome in multiple sclerosis cortex. *Biochim Biophys Acta* 1812(5): 41-630
69. Gonzalo H, Brieva L, Tatzber F, Jové M, Cacabelos D, Cassanyé A, Lanau-Angulo L, Boada J, Serrano JC, González C (2012) Lipidome analysis in multiple sclerosis reveals protein lipoxidative damage as a potential pathogenic mechanism. *J Neurochem* 123: 622-634
70. Tavazzi B, Batocchi AP, Amorini AM, Nociti V, D'Urso S, Longo S, Gullotta S, Picardi M, Lazzarino G (2011) Serum metabolic profile in multiple sclerosis patients. *Mult Scler Int* 2011: 167156
71. Jafari A, Babajani A, Rezaei-Tavirani M (2021) Multiple Sclerosis Biomarker Discoveries by Proteomics and Metabolomics Approaches. *Biomark Insights* 6(16):11772719211013352
72. Kallaur AP, Reiche EMV, Oliveira SR, Simão ANC, Pereira WLJ, Alfieri DF, Flauzino T, Proença CM, Lozovoy MAB, Kaimen-Maciel DR (2017) Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 54: 31-44
73. Senanayake VK, Jin W, Mochizuki A, Chitou B, Goodenowe DB (2015) Metabolic dysfunctions in multiple sclerosis: Implications as to causation, early detection, and treatment, a case control study. *BMC Neurol* 15: 154
74. Wong DA, Bassilian S, Lim S, Paul Lee WN (2004) Coordination of peroxisomal beta-oxidation and fatty acid elongation in HepG2 cells. *J Biol Chem* 279: 41302-41309

Assessment of metabolomics in patients with multiple sclerosis as an indicator of disease development, including relapsing-remitting, primary progressive and secondary progressive stage

Mikołaj Górka^{1,2}✉, Magdalena Dębiec^{1,3}, Natalia Białoń², Dominika Bieczek², Krzysztof Suszyński², Dariusz Górka²

¹Center for Experimental Medicine, Medical University of Silesia in Katowice

²Department of Sports Medicine and Exercise Physiology, Medical University of Silesia, Katowice

³Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Medical University of Silesia in Katowice

✉corresponding author: mgorka434@gmail.com

Keywords: multiple sclerosis, metabolome, neurodegenerative diseases, systems biology

ABSTRACT

Metabolomics is a field of science whose issues cover the qualitative and quantitative range of metabolites defined as a complete set of low-molecular chemical additives not exceeding the mass of 1,500 Da. It is included, along with genomics, transcriptomics and proteomics, in the field of science supported by the latest diagnostic tools that allow for a holistic approach to the patient. metabolites in the analyzed certificate material, based on information directly directly in the partial material, establishing the current state of affairs and constitutes an integral relationship between the genotype and phenotype, which in the future may directly affect the expansion of knowledge about the molecular basis on the basis of damage units. An additional aspect that you will use to analyze the analysis is their smaller amount compared to genes, transcripts and proteins. Despite the development of many omics technologies, there is still a lack of research that integrates and combines metabolites in the body cell, which takes into account a better insight into human pathologies and may, in the future, look at the full picture of achievable pathways. This, in turn, will mean a revolution in preclinical medicine and research into disease diagnosis, prognosis, drug response and drug development. The metabolomics approach can be used to personalize the treatment of patients with multiple sclerosis. Numerous studies indicate a quantitative change in metabolites depending on the use of the stage of multiple sclerosis. However, the complexity of the disease itself makes it difficult to identify differences in its pathogenetic basis. In this way, biomarkers were used, which develop the disease, may in the future help in an individualized treatment plan, which will help to apply the effect of pharmacotherapy.

