

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Zobrazovací metody v lékařství



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Romana Burgetová

**Kvantitativní multiparametrická MRI v longitudinálním
sledování pacientů s roztroušenou sklerózou: korelace s klinickým
stavem a biochemickými markery**

**Quantitative multiparametric MRI in the longitudinal follow-up
of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical status
and biochemical markers**

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Ing. Lukáš Lambert, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

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

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

V Praze, 31.7.2024

MUDr. Romana Burgetová

Podpis

Identifikační záznam:

Burgetová, Romana. Kvantitativní multiparametrická MRI v longitudinálním sledování pacientů s roztroušenou sklerózou: korelace s klinickým stavem a biochemickými markery [Quantitative multiparametric MRI in the longitudinal follow-up of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical status and biochemical markers] Praha, 2024. 97s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Radiodiagnostická klinika. Školitel: prof. MUDr. Ing. Lukáš Lambert, Ph.D.

Poděkování

Dovolte mi vyjádřit svou upřímnou vděčnost především svému školiteli prof. Lukáši Lambertovi za odborné vedení mého postgraduálního studia, za jeho neocenitelné rady a podporu v průběhu posledních let.

Rovněž bych ráda poděkovala vedení Radiodiagnostické kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. LF UK a kolektivu Kliniky radiologie a nukleární medicíny Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. LF UK za jejich vstřícnost a vytvoření vhodných podmínek pro mé studium. Poděkování patří také kolegům z Neurologické kliniky, jmenovitě doc. MUDr. Petru Duškovi, Ph.D, a Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu a povzbuzení.

Abstrakt

Účel. Analyzovat změny v mozku s použitím kvantitativní multiparametrické MR v longitudinálním sledování pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) a korelovat kvantitativní parametry MR s klinickým stavem a biochemickými markery oxidačního stresu.

Metodika. Byly použity pokročilé MR techniky, kvantitativní mapování susceptibility (QSM) k měření ukládání železa v mozkových strukturách a volumetrické zpracování MR obrazů. Do studie byla zařazena kohorta nově diagnostikovaných pacientů s RS (n=103). Na začátku onemocnění byla provedena vyšetření MR, klinického stavu a biochemických markerů oxidačního stresu v mozkomíšním moku a séru. Další vyšetření MR a zhodnocení klinického stavu bylo provedeno za 2 roky. Stejně byla vyšetřena kohorta zdravých kontrol.

Výsledky. U nově diagnostikovaných RS pacientů v porovnání se zdravými subjekty jsme zjistili atrofii thalamu a putamen a zvýšený obsah železa v ncl. caudatus a globus pallidus, zvýšenou koncentraci markerů peroxidace lipidů a redukci peroxidů v mozkomíšním moku. Po 2 letech u RS pacientů dochází k excesivní atrofii thalamu a bílé hmoty a akumulaci železa ve striatu, globus pallidus v porovnání se zdravými subjekty. Nezaznamenali jsme vývoj klinických markerů v prvních 2 letech progresu RS. Nenašli jsme biochemické prediktory akumulace železa v mozku, markery oxidačního stresu nebyly přesvědčivě asociovány s longitudinálním vývojem MRI nálezu. Hladina neurofilament v séru a likvoru v době diagnózy predikovala atrofii thalamu a úbytek bílé hmoty u RS pacientů.

Závěry. Naše zjištění ukázala, že již u nově diagnostikovaných pacientů s RS dochází k větší akumulaci železa a atrofii mozku v porovnání se zdravými subjekty, což se dále zvýraznilo po 2 letech sledování. To naznačuje, že mozek pacientů s RS, ačkoliv dobře léčených, stárne rychleji, a že MR může sloužit jako citlivý marker pro sledování a detekci časné progresu onemocnění. Prokázali jsme prediktivní hodnotu hladin lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku a séru, které předpovídaly budoucí úbytek mozkové tkáně, naopak se nepotvrdil předpoklad, že oxidační stres hraje významnou roli v časné progresi onemocnění u léčených pacientů s RS.

Klíčová slova: *magnetická rezonance, roztroušená skleróza, oxidativní stres, invalidita*

Abstract

Purpose. To analyze brain changes using quantitative multiparametric MRI in a longitudinal study of patients with multiple sclerosis (MS) and to correlate MRI quantitative parameters with clinical status and biochemical markers of oxidative stress.

Methods. Advanced MRI techniques were used, including quantitative susceptibility mapping (QSM) for measuring iron deposition and volumetric processing of MRI images. A cohort of newly diagnosed MS patients (n=103) was included. MRI, clinical evaluations, and biochemical markers of oxidative stress in cerebrospinal fluid and serum were assessed at disease onset and after 2 years. A cohort of healthy controls was also examined similarly.

Results. In newly diagnosed MS patients compared to healthy subjects, thalamus and putamen atrophy, increased iron content in the caudate nucleus and globus pallidus, elevated concentrations of lipid peroxidation markers, and reduced peroxides in cerebrospinal fluid were observed. After 2 years, MS patients exhibited excessive thalamus and white matter atrophy and iron accumulation in the striatum and globus pallidus compared to healthy subjects. No significant development of clinical markers was observed in the first 2 years of MS progression. Biochemical predictors of brain iron accumulation were not found, and oxidative stress markers were not convincingly associated with longitudinal MRI findings. However, serum and cerebrospinal fluid neurofilament levels at diagnosis predicted thalamus atrophy and white matter loss in MS patients.

Conclusions. Our findings suggest that newly diagnosed MS patients already exhibit greater iron accumulation and brain atrophy compared to healthy subjects, which further intensifies after 2 years of follow-up. This indicates that the brains of MS patients, even those well-treated, age faster, and that MRI could serve as a sensitive marker for monitoring and detecting early disease progression. We demonstrated the predictive value of neurofilament light chain levels in cerebrospinal fluid and serum for forecasting future brain tissue loss, whereas the hypothesis that oxidative stress plays a significant role in early disease progression in treated MS patients was not confirmed

Keywords: *magnetic resonance imaging, multiple sclerosis, oxidative stress, disability*

Seznam zkratek

AIC	The Akaike Information Criterion
AICHA	Atlas of Intrinsic Connectivity of Homotopic Areas
ATP	adenosintrifosfát
BHT	butylovaný hydroxytoluen
BPF	brain parenchymal fraction
CAT12	Computational Anatomy Toolbox
CIS	klinicky izolovaný syndrom
CNS	centrální nervový systém
CSF	cerebrospinal fluid
DIR	double inversion recovery
DIS	dissemination in space
DIT	dissemination in time
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DWI	diffusion weighted imaging
EDSS	expanded disability status scale
EIA	enviromental impact assessment
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPI	echo planar imaging
FA	flip angle
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
FOV	field of view
GLM	generalized linear model

GRE	gradient echo
HAE	4-hydroxyalkenal
isoPG	isoprostan 8-iso-PGF α
LPO	peroxidace lipidů (lipid peroxidation)
MDA	malondialdehyd
MNI	Montreal Neurological Institute
MR	magnetická rezonance
MS	multiple sclerosis
MTI	magnetization transfer imaging
NGAL	neurofilní gelatináza asociovaná s lipokalinem
OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosin
PGF2 α	prostaglandin F2 α
PPB	parts per billion
PPRS	primárně-progresivní forma roztroušené sklerózy
PRDX2	peroxiredoxin2
QSM	quantitative susceptibility mapping
RIS	radiologicky izolovaný syndrom
RMSE	Root Mean Squared Error
ROI	region of interest
ROS	reactive oxygens species
RRRS	relaps-remitentní forma roztroušené sklerózy
RS	roztroušená skleróza
SPM12	Statistical Parametric Mapping
SPRS	sekundárně-progresivní forma roztroušené sklerózy

SWI	susceptibility weighted imaging
TE	echo time
TI	inversion recovery
TR	repetition time

Obsah

1	Úvod	12
1.1	Roztroušená skleróza	13
1.1.1	Patofyziologie	13
1.1.2	Formy RS	13
1.1.3	Diagnostika RS	14
1.1.4	Roztroušená skleróza v MR obraze	16
1.1.5	MR kritéria pro diagnózu RS	24
1.2	Železo v lidském organismu	27
1.2.1	Funkce železa v lidském organismu	27
1.2.2	Železo v mozkové tkáni	28
1.2.3	Měření obsahu železa v mozku pomocí MR	29
1.2.4	Železo v mozku u pacientů s RS	34
2	Změny magnetické susceptibility v podkorových strukturách mozku a v mozkové kůře v souvislosti s fyziologickým stárnutím	37
2.1	Úvod	37
2.2	Materiál a metodika	38
2.3	Výsledky	46
2.4	Diskuze	51
2.5	Závěr	55
3	Longitudinální sledování pacientů s RS se zaměřením na kvantifikaci biomarkerů oxidačního stresu v mozkomíšním moku a séru a zkoumání jejich vztahu k mozkové atrofii a akumulaci železa v mozku na začátku onemocnění a za 2 roky	56
3.1	Úvod	56
3.2	Materiál a metodika	57
3.3	Výsledky	65
3.3.1	Baseline	65

3.3.2 První kontrola	68
3.4 Diskuze	70
3.4.1 Baseline	70
3.4.2 První kontrola	72
3.5 Závěr.....	75
3.5.1 Baseline	75
3.5.2 První kontrola	75
4 Souhrn.....	77
Literatura	79
Seznam publikací doktoranda.....	97
Příložené publikace	98

1 Úvod

Tato práce se zaměřuje na roztroušenou sklerózu (RS), její charakteristiky na MR vyšetření mozku, vývoj MR parametrů v čase v korelaci s funkčním postižením a biochemickými markery oxidativního stresu, neuronálního postižení, a reparačních mechanismů. Na MR jsou pro RS typické léze v bílé hmotě, které by měly splňovat tzv. McDonaldova kritéria s progresí v prostoru a čase. Známkou neurodegenerace je atrofie mozku a jednotlivých mozkových struktur a akumulace železa. Úbytek mozku, šedé a bílé hmoty a mozkových struktur, lze měřit na MR následným volumetrickým zpracováním MR obrazů. MR také disponuje pokročilými technikami, kterými lze stanovit železo v mozku in vivo, především železo vázané ve formě ferritinu a hemosiderinu, zásobních bílkovin železa.

Magnetická rezonance přenesla obor radiologie od výhradně anatomického zobrazování k poskytování funkčních poznatků o lidském těle. Vzhledem k tomu, že technologie magnetické rezonance pokračuje v rozvoji, slibuje další zlepšení našeho porozumění lidskému tělu a zlepšení péče o pacienty.

V první části práce je pojednáno o roztroušené skleróze, jejích subtypech, morfologických nálezech na zobrazovacích metodách s důrazem na vývoj koncentrace železa v podkorových strukturách mozku, jejich vývoje a prediktivní schopnosti. V další části práce navazuje vlastní výzkum. Studie zaměřená na podrobnou analýzu vzorců ukládání železa v hluboké šedé hmotě mozkové a v mozkové kůře pomocí regionálně založených analýz a analýzy magnetické susceptibility celého mozku u normálních dospělých mladšího a středního věku s cílem získat normální vzorce ukládání železa v mozku. Další studie se již týkají specificky pacientů s RS a využívají kvantitativní multiparametrickou MR v longitudinálním sledování nově diagnostikovaných pacientů s RS v korelaci s jejich klinickým stavem a biochemickými markery. Ve výzkumu jsme se zaměřili na úlohu ukládání železa v mozku ve vztahu k RS, v souvislosti s neurozánětem, neurodegenerací, pochopení patogeneze nemoci, jeho potenciálu jako nástroje predikce vývoje nemoci a sledování aktivity onemocnění.

1.1 Roztroušená skleróza

1.1.1 Patofyziologie

Roztroušená skleróza je progredující chronické autoimunitní a neurodegenerativní onemocnění. Histopatologicky je toto onemocnění charakteristické tvorbou lézí bílé hmoty, tzv. demyelinizačních plak. Typicky se vyskytuje u pacientů mladšího až středního věku (20–40 let), přičemž postihuje více ženy. Geograficky je nejvyšší výskyt v populaci severní Evropy, s poklesem incidence ve státech mírného klimatického pásma, signifikantně menší výskyt je ve státech Asie či Afriky (Govindarajan et al., 2020).

Jedná se o multifaktoriální onemocnění, na jehož rozvoji se podílí kombinace faktorů genetických, imunologických a enviromentálních. Výzkumy naznačují, že určité genetické varianty mohou zvýšit náchylnost k tomuto onemocnění, zatímco faktory, jako je kouření, nedostatek vitamínu D a infekce (např. Epstein-Barrův virus) mohou přispět k jeho rozvoji (Lopez et al., 2021).

V patogenezi hraje roli aberantní imunitní odpověď proti antigenům myelinových pochev vlastním imunitním systémem. Studie ukazují, že aktivované imunitní buňky, včetně T a B lymfocytů, mají zásadní roli v iniciaci a udržování zánětlivých procesů v CNS (Govindarajan et al., 2020). Tyto aktivované imunitní buňky spouštějí řetězec reakcí, který vede k rozvoji zánětu a následné demyelinizaci. Zánik myelinových pochev narušuje přenos nervového vzruchu. Jako důsledek demyelinizace dochází ke ztrátě axonů, což vede k permanentnímu neurologickému deficitu. Na probíhající poškození reaguje organismus reparačními mechanismy, jejichž výsledkem jsou ložiska gliózy. Tyto procesy vedou neodvratně k neurodegeneraci, vč. atrofie mozkových struktur. Určitý podíl v patogenezi atrofie mozkových struktur mají i depozita železa v mozkových strukturách (Jhelum et al., 2020).

1.1.2 Formy RS

Podle průběhu onemocnění se RS rozděluje do několika klinických forem:

- Relaps-remitentní RS (RRRS):

Nejčastější forma RS (85%). Pacientům s touto formou se střídají období relapsu, tedy klinického zhoršení onemocnění, během kterého dochází k manifestaci nových symptomů nebo zhoršení závažnosti symptomů již existujících. Tyto relapsy jsou následovány periodami

parciální či kompletní remise. Asi polovina pacientů s RRRS přejde do sekundárně progresivní formy.

- Sekundárně-progresivní RS (SPRS):

Představuje fázi, kdy dochází k postupnému zhoršení disability s nebo bez případných period relapsů či remise. Přejde do této formy je variabilní a může se objevit i za několik let po stanovení diagnózy.

- Primárně-progresivní RS (PPRS):

Tato forma je charakterizována postupnou progresí onemocnění od stanovení diagnózy, pouze s občasnými periodami relapsu onemocnění bez období remisí. Tvoří asi 15% všech klinických případů RS.

- Klinicky izolovaný syndrom RS (CIS):

Jedná se o první epizodu neurologických symptomů, která trvá nejméně 24 hodin, a je způsobena zánětlivým procesem či demyelinizací CNS. Progrese do RS je variabilní, pacienti s MR negativním nálezem mají šanci 20%. Pokud je zároveň přítomen nález na MR mozku, riziko přechodu do klinické formy RS je vyšší v rozsahu 60-80%.

- Radiologicky izolovaný syndrom RS (RIS):

Jedná se o nejmírnější formu RS, charakterizovanou diseminací lézí bílé hmoty v čase na MR vyšetření mozku, nicméně bez anamnézy neurologických symptomů a s fyziologickým neurologickým vyšetřením. V případě, že dojde k manifestaci neurologického symptomu, pacient s touto formou RS se přesouvá do formy klinické.

1.1.3 Diagnostika RS

Samotná diagnostika RS zahrnuje kombinaci neurologického vyšetření vč. zhodnocení klinického stavu a paraklinických vyšetřovacích metod. V průběhu let se kritéria pro diagnostiku RS vyvíjela s důrazem na objektivní prokázání diseminace lézí v čase a prostoru. Nejužívanější akceptovaná kritéria pro diagnostiku RS jsou McDonaldova kritéria z roku 2001, revidovaná v letech 2005, 2010, s nejnovější verzí v roce 2017. Tato kritéria zahrnují:

- Klinická kritéria

Nejméně dvě separované klinické ataky postihující rozdílné části CNS nebo pouze jedna ataka, pokud je přítomen jasný důkaz nové léze na následujícím MR vyšetření.

- MR kritéria

Přítomnost charakteristických lézí a jejich diseminace v čase (DIT) a diseminace v prostoru (DIS).

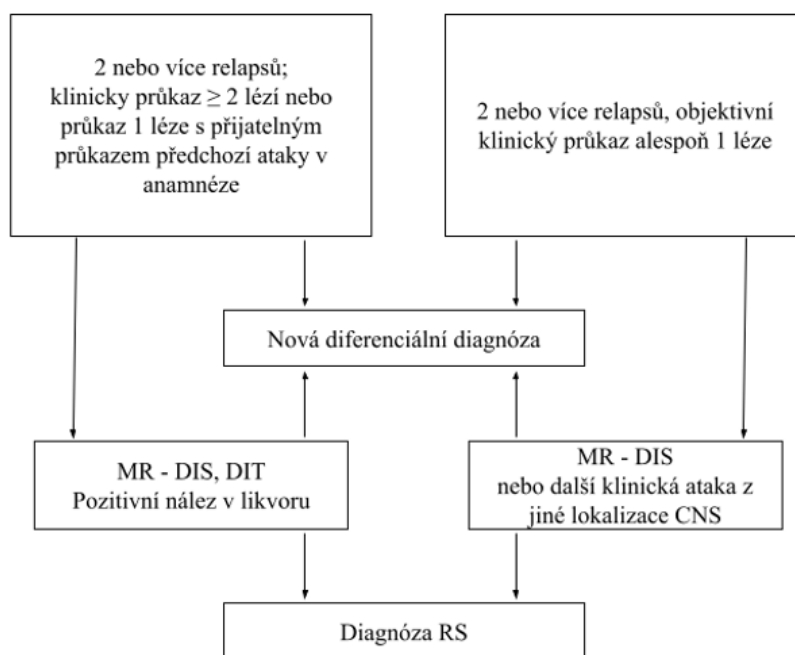
- Likvor

Vyšetření likvoru má doplňující charakter, podporuje potvrzení diagnózy RS zvláště v případech, kdy MR nálezy nejsou jednoznačné. Typický je nález oligoklonálních páسů, bez jejich přítomnosti v séru, což je důkaz imunologické aktivity v CNS.

- Evokované potenciály (volitelné)

Abnormální vizuální evokované potenciály mohou podpořit diagnózu RS.

Příklad diagnostického postupu u pacienta se suspekci na relaps-remitentní formu roztroušené sklerózy na obrázku níže (Obrázek 1).



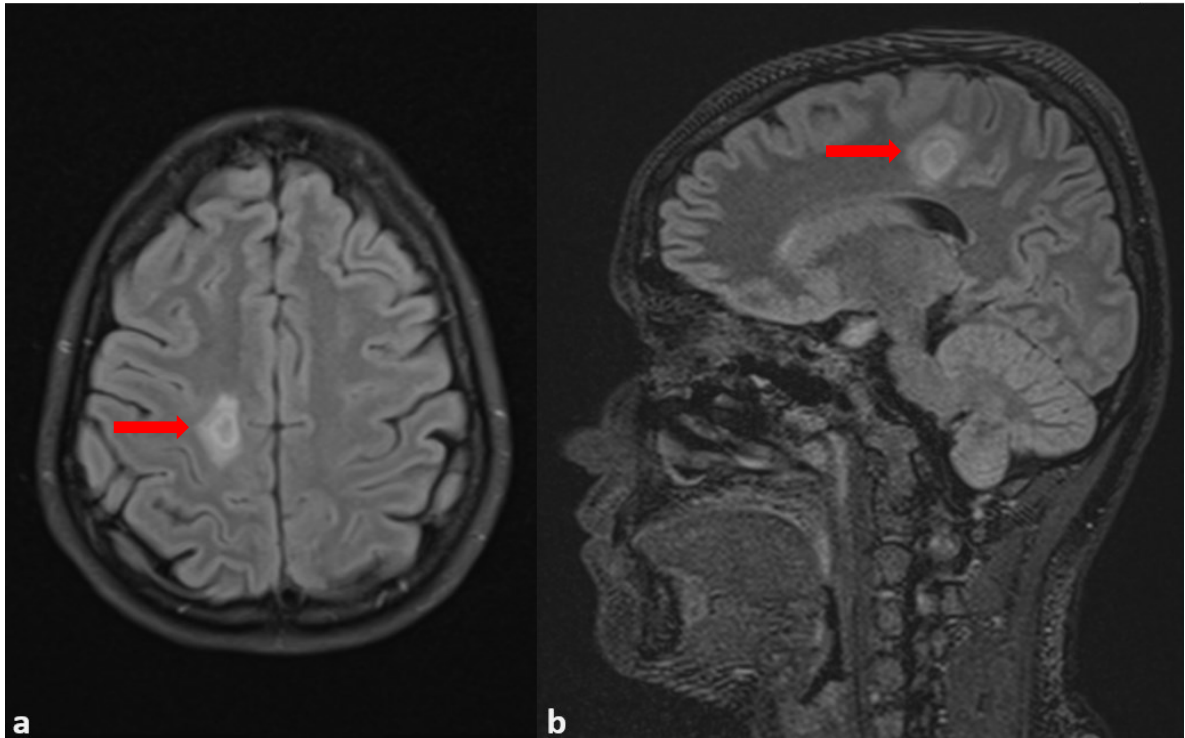
Obrázek 1. Diagnostický algoritmus při podezření na RS.

1.1.4 Roztroušená skleróza v MR obraze

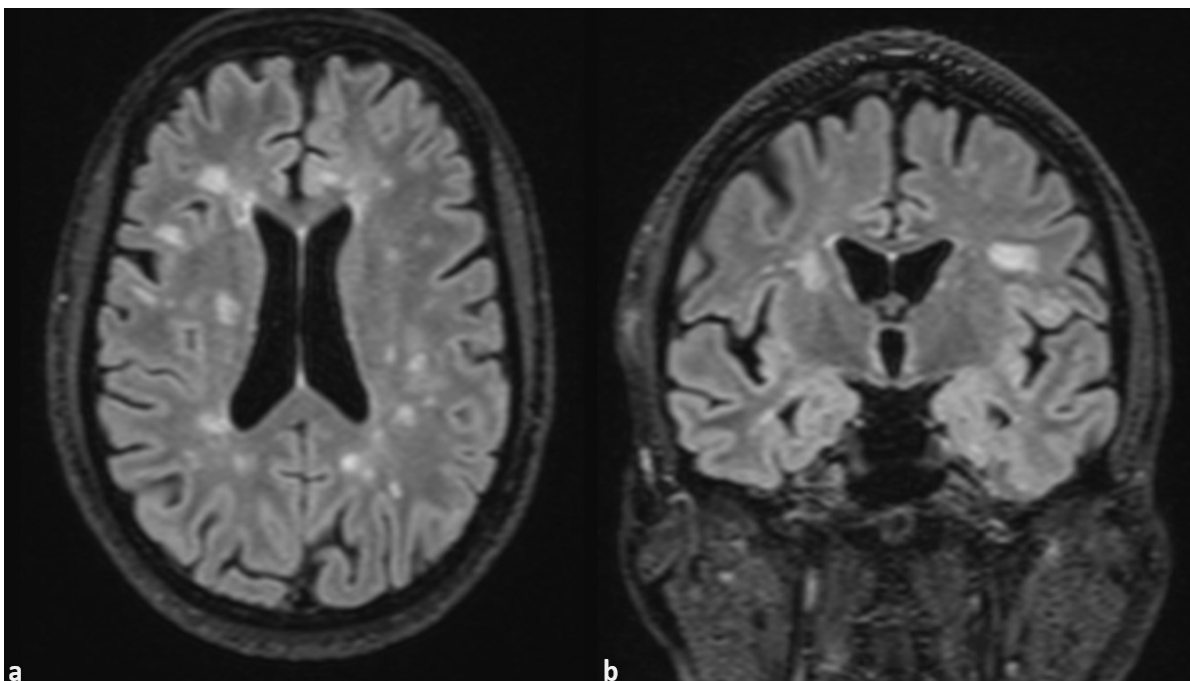
Magnetická rezonance (MR) hraje zásadní roli v diagnostice a následném managementu pacientů s RS. Umožňuje nám zobrazení demyelinizačních plak, poskytuje cenné informace o jejich lokalizaci a rozsahu postižení v CNS a míše, umožňuje sledování dynamiky a progresu onemocnění.

Pro RS jsou charakteristická demyelinizační ložiska v T2 vážených obrazech a T2-FLAIR. Jejich podkladem je primárně demyelinizace, ale ke vzniku lézí mohou přispívat také další patologické procesy jako je edém, zánět či glióza. Ložiska mohou mít různou velikost, od milimetrových po větší tzv. tumoriformní plaky, které se často iniciálně objevují jako léze solitární (Obrázek 2), ačkoliv pro RS jsou typické léze mnohočetné. Přestože se mohou plaky vyskytovat téměř kdekoli, nejčastější lokalizace je supratentoriálně, zejména periventrikulárně, při postranních komorách, kde vytvářejí charakteristický obraz tzv. Dawsonových prstů, rozpínajících se radiálně od komor. Tento typický obraz vzniká z důvodu toho, že u RS dochází dominantně k tzv. perivenulárnímu typu demyelinizace. Další typické lokalizace jsou uvedeny níže:

- Supratentoriálně (90%)
 - periventrikulárně (Obrázek 3)
 - juxta/subkortikálně (Obrázek 3)
 - na callososeptálním rozhraní (Obrázek 4)
- Infratentoriálně (10%) (Obrázek 5)
- Mícha
 - C mícha (Obrázek 6)
 - Th mícha (Obrázek 7)



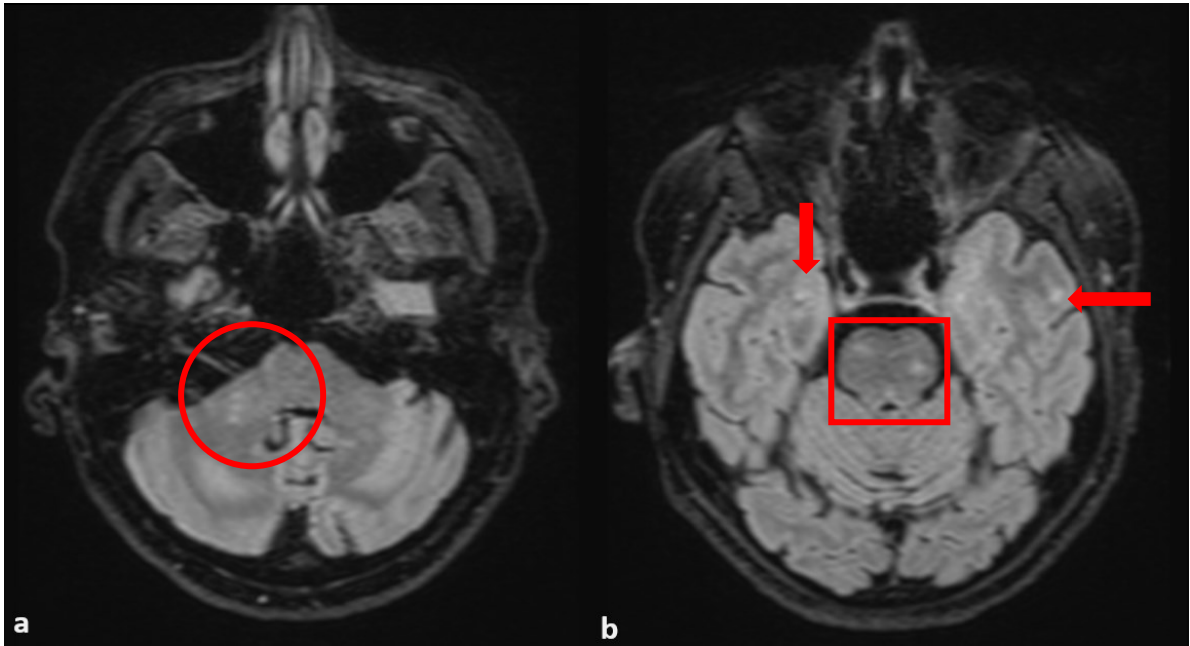
Obrázek 2. Tumoriformní plaka supratentoriálně vpravo parietálně na T2-FLAIR v rovině axiální (a) a sagitální (b).



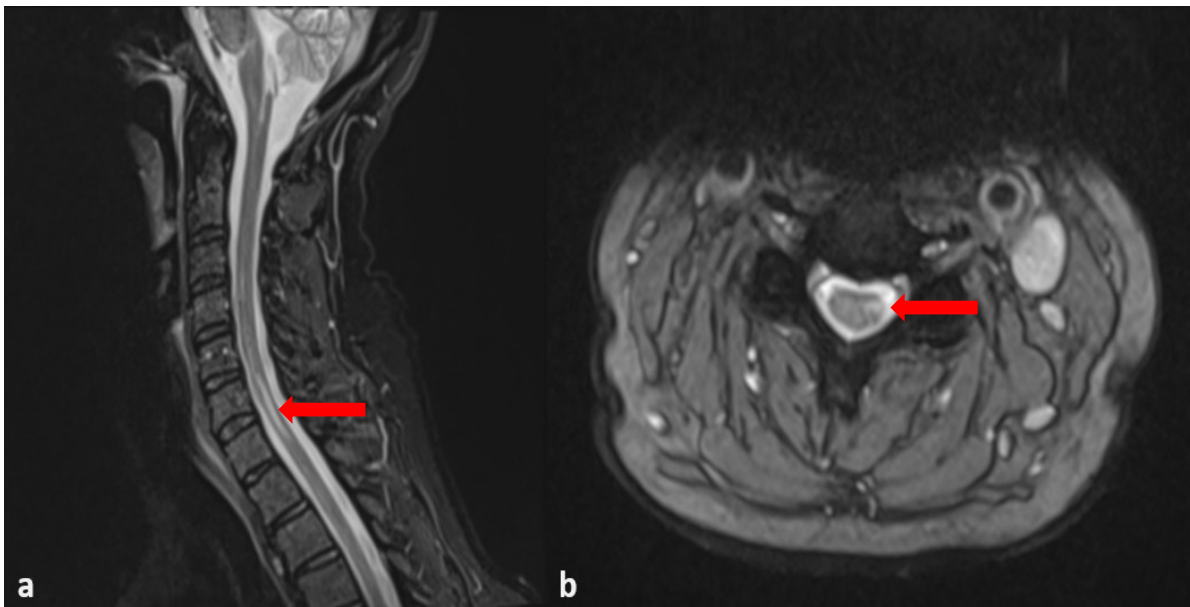
Obrázek 3. Mnohočetná hyperintenzní ložiska v typické lokalizaci supratentoriálně periventrikulárně a juxta/subkortikálně na T2-FLAIR v rovině axiální (a) a koronární (b).



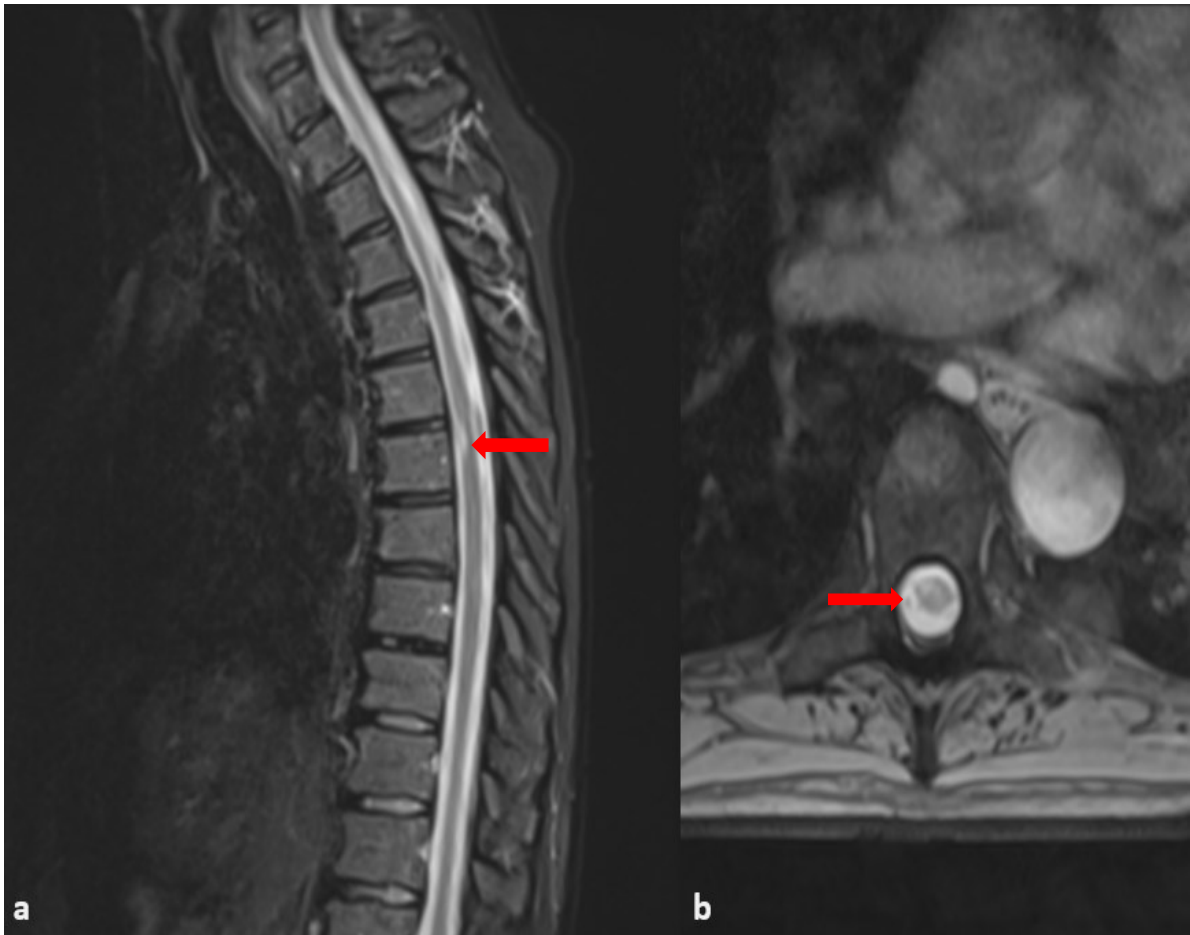
Obrázek 4. Hyperintenzní ložiska u pacienta s RS v oblasti calloseptálního rozhraní na T2-FLAIR.



Obrázek 5. Infratentoriální ložiska u dvou různých pacientů s RS na T2-FLAIR v rovině axiální; vpravo v pontu, v pontinním pedunklu a v mozečkové hemisféře (a) a vícečetná v oblasti pontu oboustranně a současně supratentoriálně juxta/subkortikálně oboustranně (b).

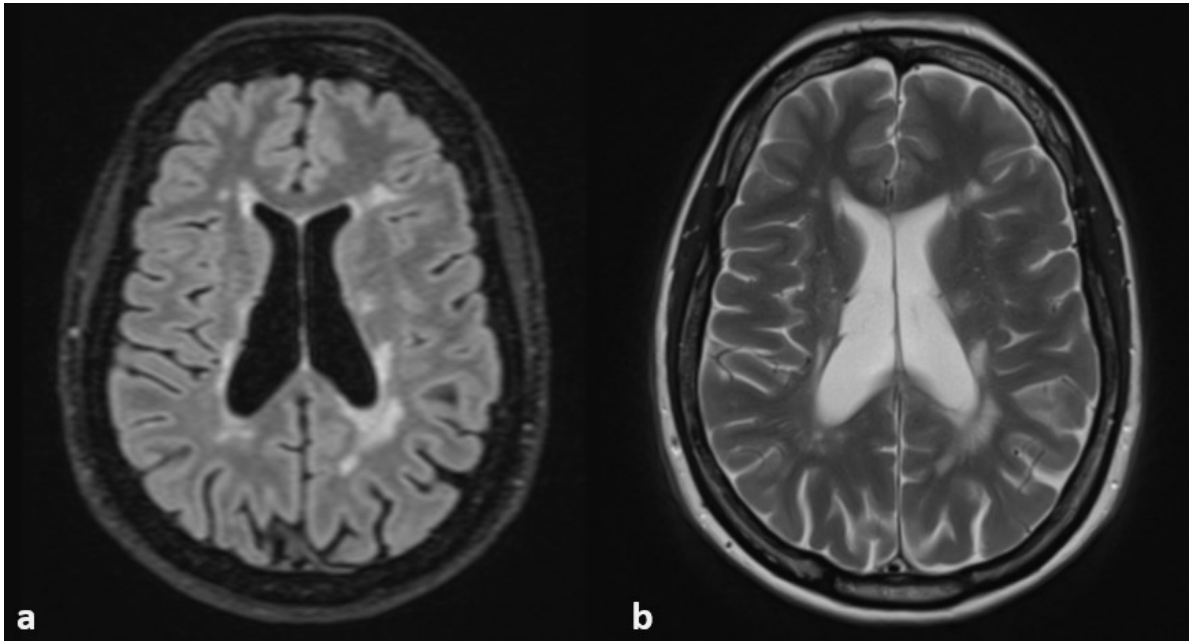


Obrázek 6. Hyperintenzní ložiska v krční míše u pacienta s RS. Rozsáhlejší léze v úrovni C6-C7 viditelná na T2 v sagitální rovině (a), v axiální rovině (b) patrná její lokalizace v míše laterálně vlevo.



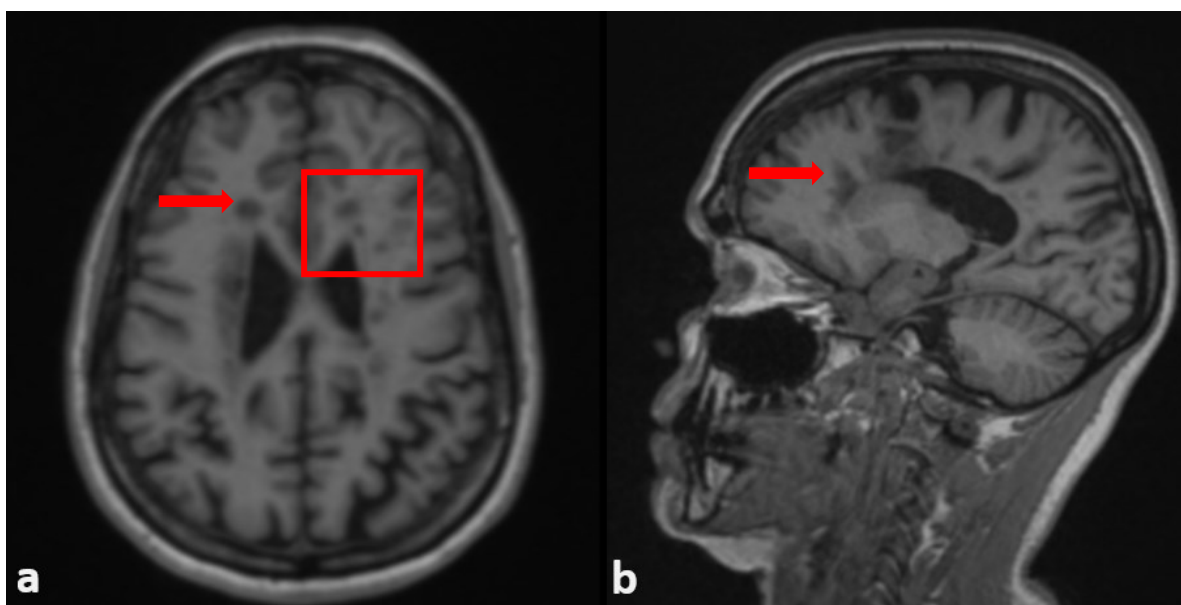
Obrázek 7. Hyperintenzní ložiska v hrudní míše u pacienta s RS. Léze v úrovni Th5/Th6 viditelný na T2 v rovině sagitální (a) a v rovině axiální (b) je lokalizovaná vpravo latero-ventrálně.

Standardní protokol MR: Pro detekci lézí jsou součástí standardního protokolu sekvence **T2WI** a **T2-FLAIR**, na kterých jsou typicky ložiska zvýšené intenzity signálu (Obrázek 8). Nově se doporučuje FLAIR sekvence jako 3D FLAIR.



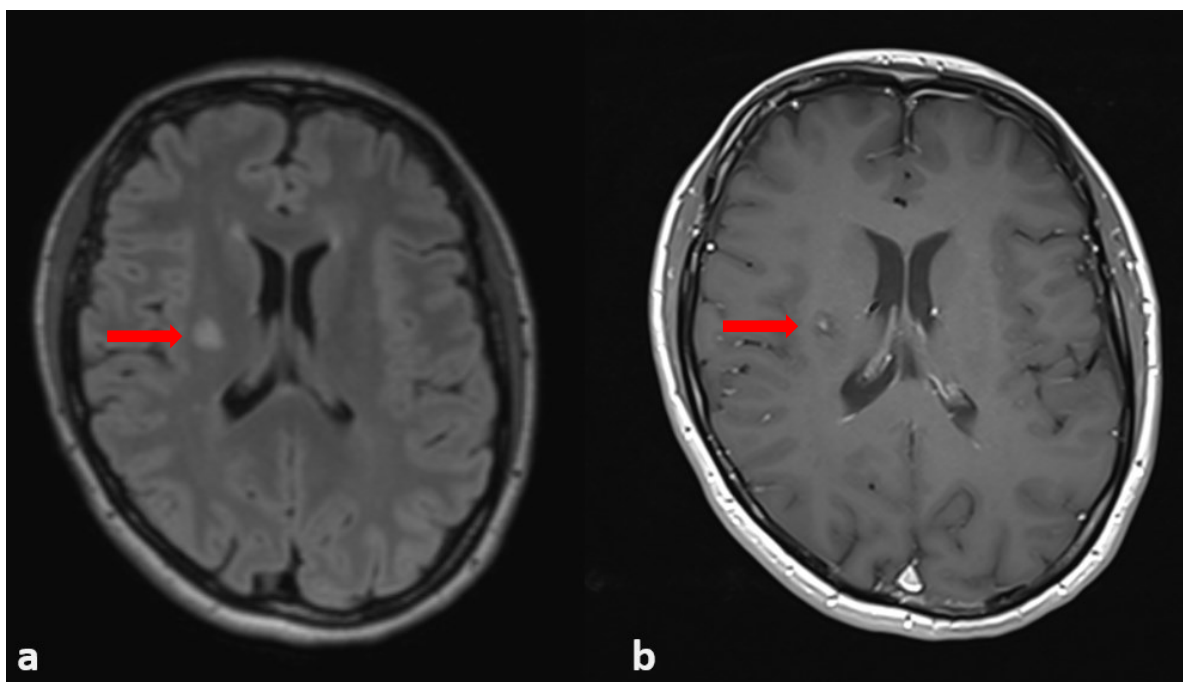
Obrázek 8. Hyperintenzní ložiska na axiálních T2-FLAIR (a) a T2 (b) sekvencích supratentoriálně dominantně periventrikulárně.

T1WI slouží jako přehledové anatomické obrazy, 3D T1WI jsou základem pro volumetrické analýzy obrazů. Hyperintenzní ložiska na T2WI a T2-FLAIR mohou korelovat s hypointenzními ložisky na T1WI (tzv. „black holes“), které odpovídají axonálním ztrátám (Obrázek 9). Může se u nich objevit periferní lem relativně lehce zvýšeného signálu, vznikající sekundárně při peroxidaci lipidů a infiltraci makrofágy (Paty et al., 1994).

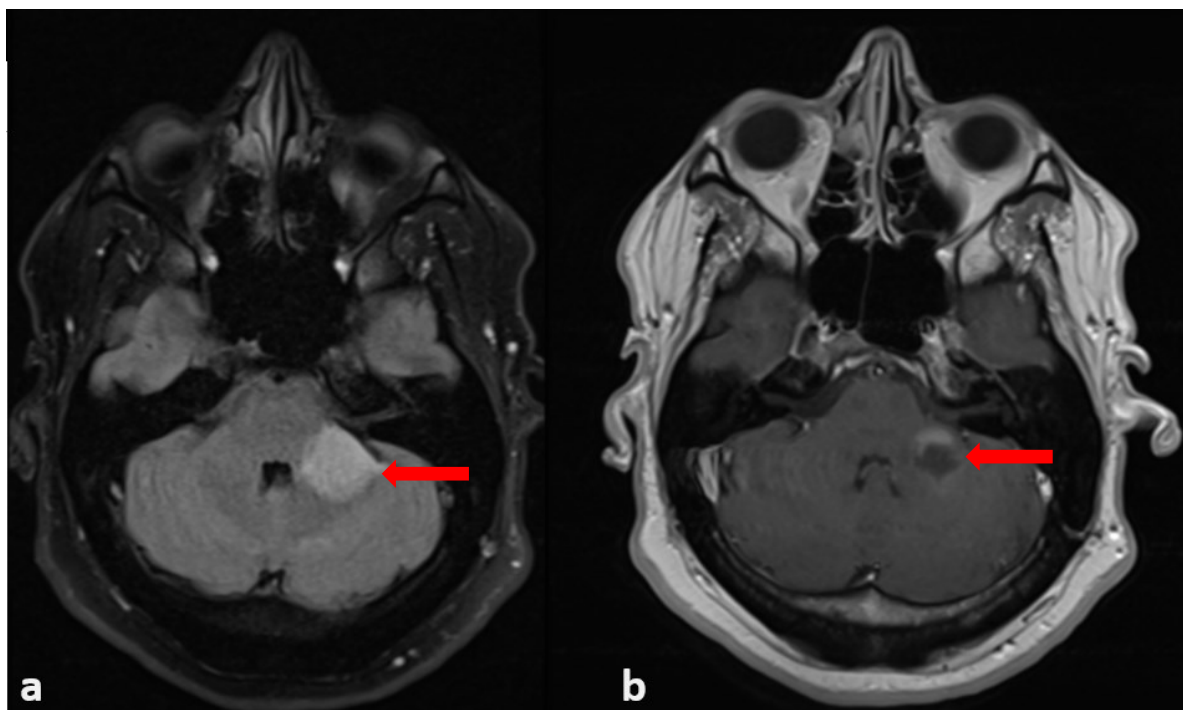


Obrázek 9. „Black holes“ – hypointenzní ložiska oboustranně při frontálních rozích postranních komor na T1 v rovině axiální (a), hypointenzní ložisko frontálně subkortikálně v rovině sagitální (b).

Poskontrastní vyšetření (T1+Gd): Podání gadoliniové kontrastní látky by mělo být součástí protokolu u prvního diagnostického vyšetření, kdy může napomoci stanovení diagnózy a může odhalit diseminaci v čase. Při dalších kontrolách v tzv. monitorovacím protokolu se kontrastní látka již většinou nepodává. Postkontrastní vyšetření může identifikovat aktivní léze, u kterých dochází k sycení z důvodu narušení hematoencefalické bariéry. Sycení může být různého charakteru, od tečkovitého (Obrázek 11), nodulárního až po periferní. Typické bývá nekompletní periferní sycení do tvaru podkovy, kdy nesyťící se segment je natočen směrem ke kortexu (Obrázek 10). V 90% případů dochází k vymizení postkontrastního sycení do 6 měsíců, k tomu napomáhá i léčba kortikosteroidy (Katz et al., 1993).

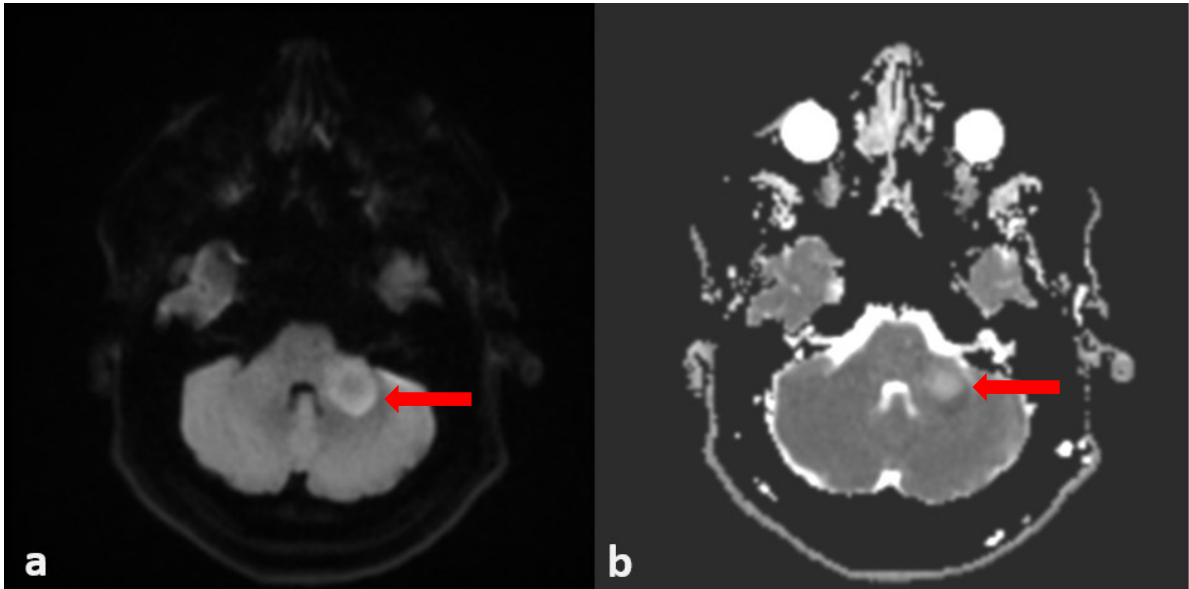


Obrázek 11. Příklad tečkovitého sycení léze. Hyperintenzní ložisko v axiální rovině na T2-FLAIR (a) a postkontrastní sycení ložiska T1 Gd+ (b).



Obrázek 10. Příklad nekompletního periferního sycení tumoriformní plaky do tvaru podkovy. Hyperintenzní ložisko vlevo v oblasti pontinního pedunklu, na T2-FLAIR (a), postkontrastní sycení ložiska v T1 Gd+ (b) v axiální rovině.

DWI: Demyelinizační plaky mohou vykazovat zvýšenou restrikcí difuze na DWI, vč. lézí aktivních, nicméně tento nálezn by se neměl používat jako biomarker aktivity onemocnění (Obrázek 12).



Obrázek 12. Ložisko v levém pontinním pedunklu s restrikcí difuze na periferii ložiska. Hyperintenzní signál na periferii na DWI (a) korelováno s poklesem signálu na ADC mapě (b) v axiální rovině.

Ke zvážení jsou sekvence **DIR** (Double Inversion Recovery), které potlačují signály ze dvou různých typů tkání, z mozkomíšního mozku a z bílé hmoty, nebo sekvence SWI, které jsou citlivé k hemoragiím, vizualizují žíly a depozita železa a jsou základem pro QSM.

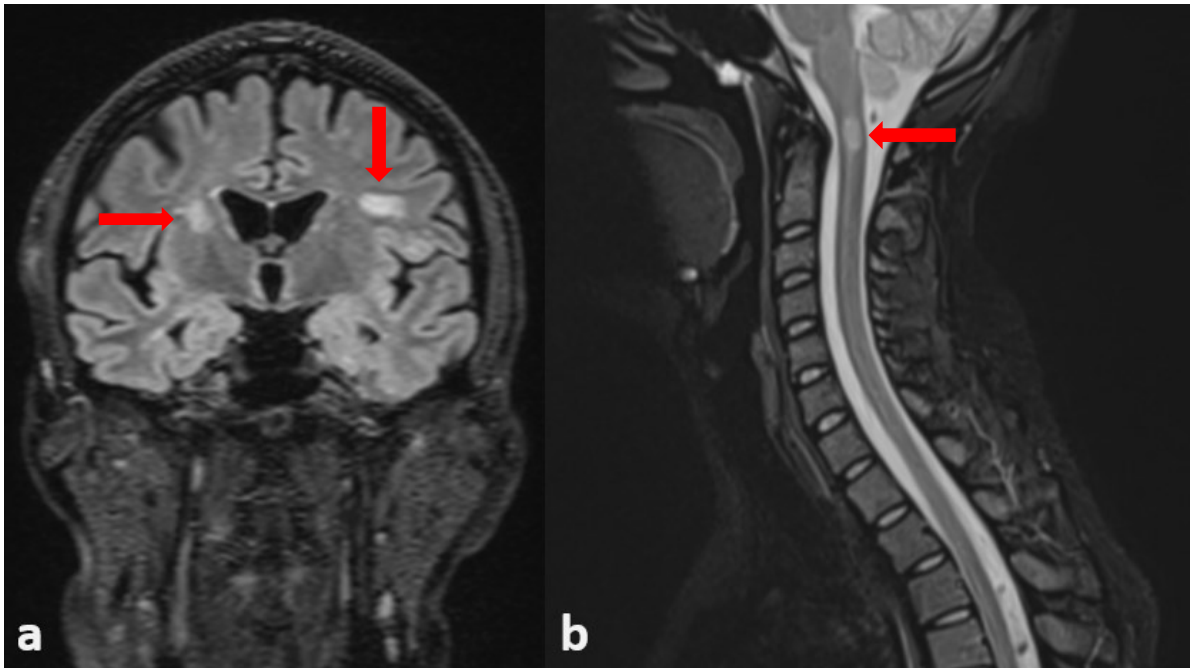
Pokročilé techniky zobrazení: Některé studie pracují s pokročilými technikami zobrazení. Mezi ně se řadí např. MTI (Magnetization Transfer Imaging), poskytující nám informace o obsahu myelinu. Funkční MR, spektroskopie a kvantitativní mapování susceptibility (QSM) přinášejí cenné informace o mikrostrukturách tkání, funkčních či metabolických změnách.

1.1.5 MR kritéria pro diagnózu RS

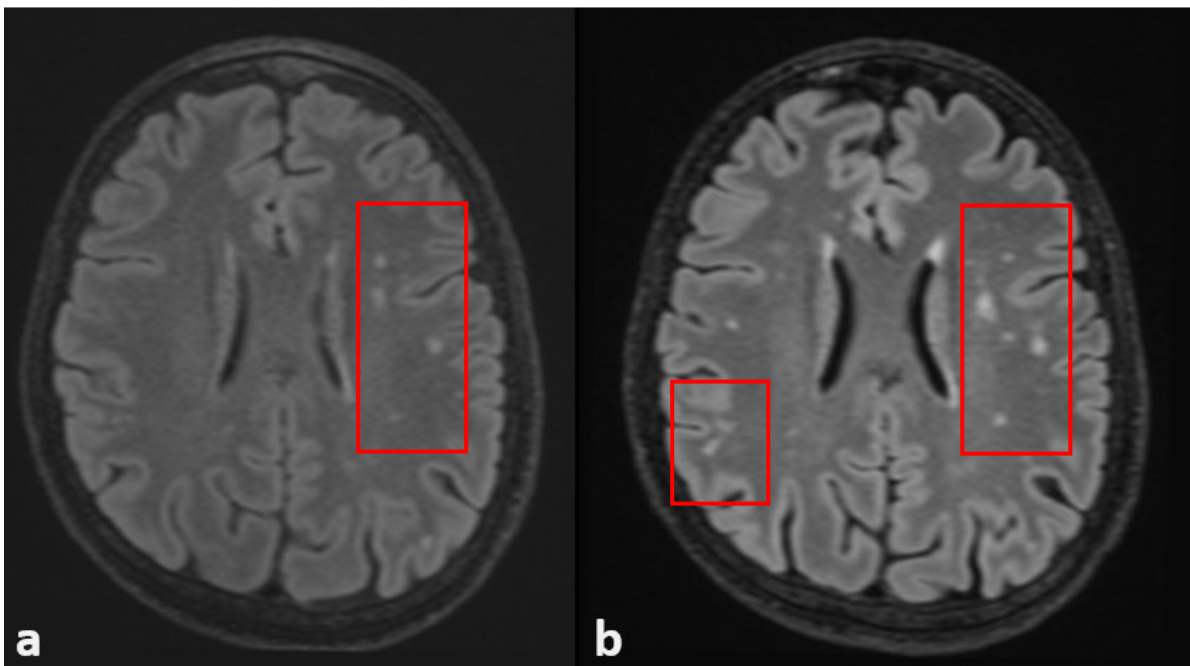
Při klinickém podezření na RS je MR důležitou součástí na cestě ke stanovení finální diagnózy. MR zobrazení je součástí McDonaldových kritérií, demonstruje diseminaci ložisek

v prostoru a diseminaci v čase. Zároveň je důležitou úlohou MR i vyloučení ev. jiného onemocnění, které by mohlo být příčinou klinických symptomů.

- Diseminace v prostoru (DIS):
 - ≥ 1 T2 hyperintenzní léze
 - v nejméně ve 2 z následujících 4 oblastí (Obrázek 14):
 - periventrikulárně,
 - sub/juxtakortikálně
 - infratentoriálně
 - v míše
- Diseminace v čase (DIT)
 - buď nové T2 hyperintenzní ložisko nebo postkontrastně sytící se ložisko na následujícím MR vyšetření (Obrázek 13).
 - nebo současně přítomny
 - asymptomatické postkontrastně sytící se léze
 - a nesytící se léze



Obrázek 14. Hyperintenzní ložiska supratentoriálně periventrikulárně a juxtakortikálně na T2-FLAIR v řezu koronárním (a) a ložisko na rozhraní prodloužené míchy a C míchy na T2 STIR v rovině sagitální (b). Pacient splňuje kritéria diseminace v prostoru.



Obrázek 13. DIT – MR vyšetření pacienta s RS (a) a stejného pacienta s odstupem 6 měsíců od předchozího vyšetření (b). Na sekvencích T2-FLAIR v axiální rovině je za 6 měsíců patrná progresse počtu ložisek supratentoriálně periventrikulárně a juxta/subkortikálně. Pacient splňuje kritérium diseminace v čase.

1.2 Železo v lidském organismu

1.2.1 Funkce železa v lidském organismu

Železo je stopový prvek, který hraje nezastupitelnou roli ve fungování lidského těla. V lidském organismu se nachází v několika formách, které mají specifické funkce. Železo je součástí hemoglobinu, proteinu červených krvinek, jehož úkolem je navázat a transportovat kyslík ke tkáním. Současně se podílí na transportu elektronů v mitochondriích, buněčné organele zodpovědné za tvorbu energie ve formě ATP při buněčném dýchání. Dále je zabudován do svalového proteinu myoglobinu, funguje jako kofaktor enzymů v různých biochemických reakcích jako je syntéza DNA či metabolismus aminokyselin. Železo se spolupodílí na syntéze myelinu a neurotransmiterů vč. dopaminu, serotoninu či noradrenalinu. Také má esenciální roli ve fungování imunitního systému.

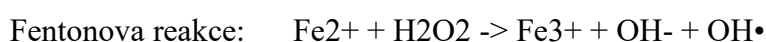
Železo je z potravy absorbováno v duodenu a horním jejunu ve formě hemového a non-hemového železa. Odsud se dostává do krevního oběhu, kde se váže na transportní glykoprotein transferin. Cirkulací ve vazbě na transferin je transportováno do orgánů, kde probíhá erythropoéza, tzn. do kostní dřeně, jater a sleziny, k erytroidním buňkám pro syntézu hemoglobinu. Mimoto je v těchto orgánech skladováno ve vazbě na protein ferritin, ze kterého se při potřebě uvolňuje (Hurrell & Egli, 2010).

Lidský organismus má přísné regulační mechanismy pro udržení homeostázy železa. Deficience železa může vést ke stavům jako je anémie nebo narušení různých fyziologických funkcí. Nadbytek na druhou stranu přispívá k oxidativnímu stresu a poškození tkání (Katsarou & Pantopoulos, 2020).

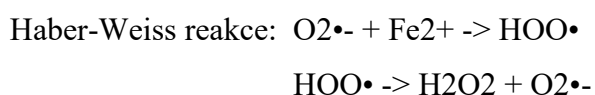
Pokud dojde ke zvýšení podílu volného železa, ať už z důvodu poškození protektivních molekul ferritinu, kde je železo uloženo jako tzv. bezpečné železo, nebo vyčerpáním kapacit ferritinu, projeví se toxicita železa a jeho role v oxidačním stresu (Kruszewski, 2003). Volné železo se podílí na tvorbě volných kyslíkových radikálů (ROS) a tím pádem i oxidativním poškození buněčných komponent. V tzv. Fentonově reakci se peroxid vodíku (H_2O_2) rozkládá na hydroxylové radikály ($OH\cdot$). Dvojmocné železo (Fe^{2+}) slouží jako katalyzátor pro tuto reakci, jako vedlejší produkt reakce vzniká železo trojmocné (Rovnice 1) (Fenton, 1894). Haber-Weiss reakce je další biochemický pochod podílející se na tvorbě ROS, probíhá mezi superoxidovým aniontem ($O_2^{\cdot-}$) a ionty kovu, obvykle železa (Fe^{2+}), za tvorby hydroxyperoxidu ($HOO\cdot$). Hydroxyperoxid ($HOO\cdot$) následně disproportionuje na peroxi vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($OH\cdot$) (Rovnice 2) (Kehrer, 2000; Koppenol, 2001). ROS mohou iniciovat peroxidaci lipidů, řetězovou reakci, která

poškozuje buněčné membrány a vede k apoptóze buněk. Dále se ROS podílí na oxidačním poškození DNA, což může vést k mutacím a genové nestabilitě. ROS se podílí na oxidaci proteinů a tím ovlivňují jejich funkci, následkem čehož dochází inaktivaci enzymů, chybnému skládání proteinů, jejich agregaci, což přispívá k buněčné dysfunkci (Kajarabille & Latunde-Dada, 2019). Organismus je vybaven mechanismy antioxidační obranyschopnosti. Nadměrné množství volného železa však může tyto buněčné antioxidanty, jako je např. glutathion, vyčerpat a tím snížit schopnost buňky neutralizovat ROS a snížit dopady oxidačního stresu (Hayes & McLellan, 1999).

Rovnice 1.



Rovnice 2.



1.2.2 Železo v mozkové tkáni

Hematoencefalická bariéra, tvořená endoteliálními buňkami mozkových kapilár, je pro transferin nepropustná. Tyto endoteliální buňky na svém povrchu exprimují transferinové receptory, které usnadňují přestup železa do mozkové tkáně (Connor & Benkovic, 1992). Přes tyto receptory železo vstupuje do mozku tzv. endocytózou (Rouault & Cooperman, 2006). Ve formě ferritinu je železo uloženo dominantně v astrocytech, odkud je podle potřeby následně uvolňováno (Dringen et al., 2007).

Železo vykazuje nerovnoměrnou distribuci v mozkové tkáni, s vysokými hladinami v oblastech hluboké šedé hmoty, tzn. v bazálních gangliích vč. ncl. rubber. Vyskytuje se hlavně v organických zásobních formách jako je ferritin a hraje zásadní roli v syntéze DNA, tvorbě myelinu a metabolismu neurotransmiterů (dopamin, serotonin, nor epinefrin a epinefrin) (Gerlach et al., 2000).

V mozku je železo distribuováno do různých buněk, včetně neuronů a glií, a je klíčové pro jejich růst, vývoj a funkci. Tato distribuce je ovlivněna faktory jako jsou počty transferinových receptorů na membránách buněk, což je spojeno s metabolickými potřebami těchto buněk. (Beard et al., 2009). Nejvyšší koncentrace železa byla prokázána v oligodendrocytech, gliových buňkách zodpovědných za tvorbu myelinu. Proto porucha

homeostázy železa ovlivňuje produkci myelinu, tím může hrát zásadní roli v patogenezi demyelinizačních onemocnění.

Koncentrace železa v mozkové tkáni kolísá s věkem, zvyšuje se v průběhu vývoje, poté dosahuje fáze plató a následně klesá. Tyto změny jsou pozorovány v různých oblastech mozku a jsou spojeny s funkčními změnami v CNS (Roskams & Connor, 1994).

Úloha železa v neurologickém vývoji je kritická, protože jeho nedostatek v dětství může vést ke kognitivním a psychomotorickým poruchám (Sadrzadeh & Saffari, 2004)

Abnormální metabolismus železa v mozku se podílí na patogenezi různých neurodegenerativních onemocnění, kromě RS i na rozvoji Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby. Zvýšené hladiny železa ve specifických oblastech mozku jsou spojeny s těmito stavy, což naznačuje souvislost mezi dysregulací železa a neurodegenerací (Gerlach et al., 1994).

1.2.3 Měření obsahu železa v mozku pomocí MR

Magnetická rezonance se stala klíčovým nástrojem v oblasti neurologie a neurověd, poskytující neinvazivní a detailní pohled na struktury a funkce mozkové tkáně. Zvláště důležitým aspektem výzkumu v této oblasti je analýza distribuce železa v mozkových strukturách, což je umožněno rozvojem nových MR technik v průběhu posledních desetiletí. Porozumění role železa v mozkové tkáni může přispět k lepší diagnostice a léčbě neurologických onemocnění a otevřít nové perspektivy pro výzkum CNS.

Mezi klinické a výzkumné aplikace patří diagnostika a monitorování neurodegenerativních onemocnění. Techniky hodnocení koncentrace železa v mozkové tkáni jsou klíčové ve studiích patofyziologie neurologických onemocnění a ve vývoji terapeutických strategií. Zobrazení železa může být použito pro hodnocení účinnosti léčby, zvláště u onemocnění spojených s abnormální akumulací železa.

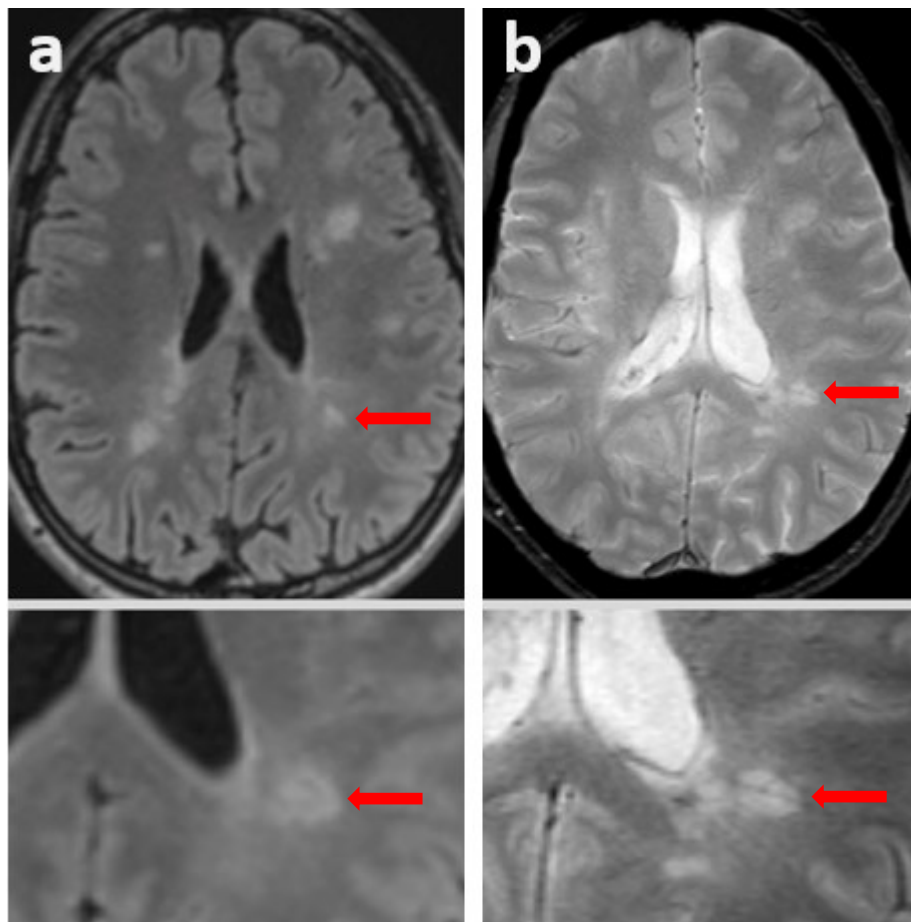
Železo ovlivňuje MR obraz svými paramagnetickými vlastnostmi. V přítomnosti vnějšího magnetického pole se nepárové elektrony v molekulách a atomech obsahujících železo orientují v jeho směru, vytvářejí dočasnou magnetizaci a ovlivňují magnetickou susceptibilitu, což má dopad na lokální magnetické pole v těle. To může vést k artefaktům na MR obrazech, zejména ve tkáních s vysokým obsahem železa, jako jsou krevní hematomy. Železo také ovlivňuje T2*-relaxační čas, což má za následek snížení signálu na T2*-vážených obrazech (Schenck, 2003).

Kromě konvenčních MR metod se dnes používají další moderní nekonvenční MR techniky. Patří sem i techniky, které stanovují železo v mozku in vivo, především

ve ferritinu a hemosiderinu, paramagnetických zásobních bílkovin železa. Tyto metody vykazují různou úroveň tkáňového kontrastu a senzitivity, nejvíce se dnes používá QSM.

1.2.3.1 T2*-vážené obrazy

Tato metoda využívá rychlé relaxace T2* signálu v přítomnosti železa či jiných paramagnetických látek. Železo způsobuje nehomogenity magnetického pole, což vede ke zkrácení relaxace T2*. Používá se gradient-echo (GE) nebo echo-planar imaging (EPI) sekvence. Kombinací těchto sekvencí a rychlých získávacích časů je možné zachytit rychle relaxující signál a vytvořit T2*-vážené obrazy (Obrázek 15). Tyto metody jsou užitečné pro zobrazení železitých lézí a hematomů. Nevýhodou je nižší rozlišení obrazů a citlivost na artefakty jako jsou např. pohybové artefakty. Navíc jsou náchylné k efektu SWI, což může vést k deformacím obrazů v blízkosti oblastí s vysokým obsahem železa (Schenck, 2003).



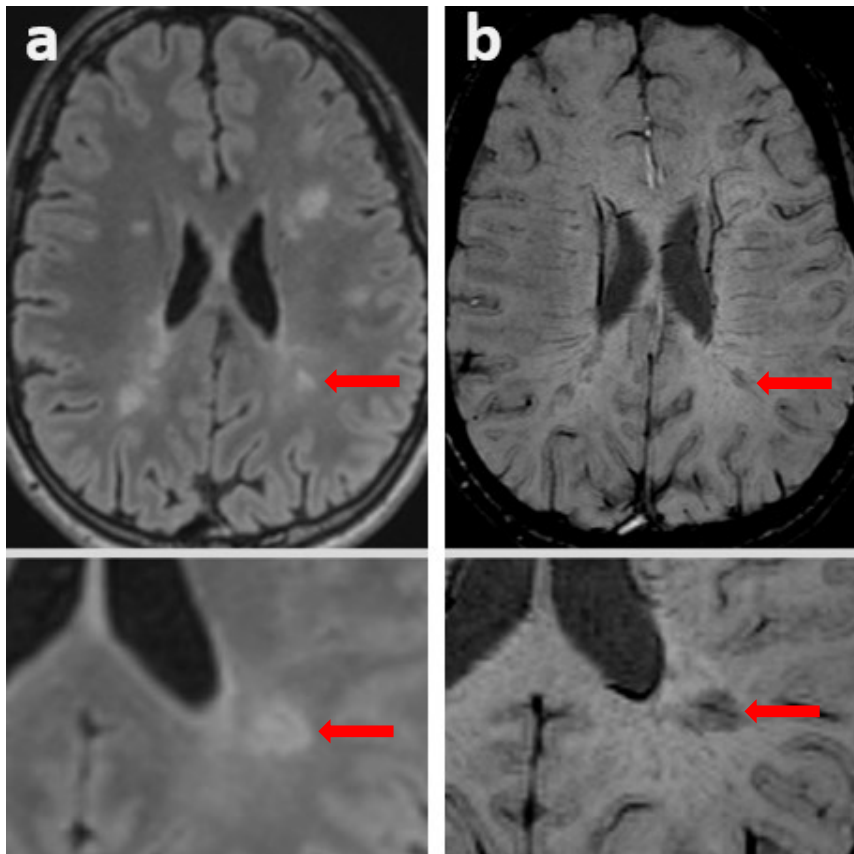
Obrázek 15. Demyelinizační léze bílé hmoty s příznakem tzv. centrální žíly na T2 FLAIR (a) a T2 GRE (b) v axiální rovině (nahore) a v detailu (dole).

1.2.3.2 Tkáňová relaxometrie

Metoda měří relaxační časy T1 a T2 v tkáních obsahujících železo a umožňuje kvantitativní analýzu obsahu železa. Pro měření relaxačních časů se používají různé sekvence. Tato metoda je vhodná zejména pro výzkum a umožňuje kvantifikaci obsahu železa v tkáních (Deoni, 2010). Vysoká magnetická susceptibilita železa zkracuje transversální relaxační čas a indukuje snížení signálu v T2 vážených obrazech v místech bohatých na železo. Tkáňový kontrast v T2 vážených obrazech je ovlivněn ale také například obsahem vody nebo myelinu. Vztah mezi relaxačním časem a koncentrací železa byl ověřen i na preparátech postmortem (Langkammer et al., 2010). V této studii byla měřena koncentrace železa krátce postmortem na preparátech mozku fixovaných ve formalínu technikou MR relaxometrie a poté bylo stanoveno železo histochemicky pomocí spektrometrie. Analýza prokázala, že měření relaxace T2 a především T2* (resp. inverzní R2, R2*) může být použito jako senzitivní a lineární stanovení koncentrace železa v mozku. Korelace vyšly lépe pro měření T2*, která je robustnější metodou, citlivější ke změnám koncentrace železa v mozku včetně rozdílů v bílé hmotě.

1.2.3.3 Susceptibility-weighted imaging (SWI)

SWI lze přeložit jako zobrazování magnetické susceptibility. SWI využívá data o magnitudě i fázi v GRE sekvenci ke zdůraznění rozdílů v magnetické susceptibilitě a poskytuje detailní vizualizaci žilních struktur, krvácení, ukládání minerálů v mozkové tkáni (zjm. železa). SWI je vysoce citlivé na paramagnetické a diamagnetické látky, které generují různé fázové posuny. Výhodou je vysoký kontrast pro železo, detailní zobrazení malých lézí a kapilárních struktur, vč. vaskulárních anomálií, hematomů (Obrázek 16). Nevýhodou je delší doba získávání dat a složitější zpracování obrazů (C. Liu, Li, et al., 2015).



Obrázek 16. Demyelinizační léze bílé hmoty s tzv. příznakem centrální žíly na T2 FLAIR (a) a SWI (b) v axiální rovině (nahore) a v detailu (dole).

1.2.3.4 Quantitative susceptibility mapping (QSM)

Kvantitativní susceptibilní mapování (QSM) je technika, která umožňuje měřit absolutní koncentrace železa a dalších látek v tkáních. Tato technika poskytuje kvantitativní informace o magnetických vlastnostech tkáně na základě změn susceptibility. Produkuje susceptibilní mapy, které jsou nezávislé na orientaci tkáně k hlavnímu magnetickému poli (Schweser et al., 2011). Jde o pokročilé postprocesingové zpracování, které podobně jako SWI využívá fázové informace trojdimenzionálních gradientních sekvencí (3D-GE) k mapování magnetických vlastností tkáně (de Rochefort et al., 2010). Nedávno publikovaná postmortem validační studie prokázala, že susceptibilita v centrální šedé hmotě vysoce koreluje s koncentrací železa. V této studii zkoumali vztah magnetické susceptibility mozku a koncentrace železa na nefixovaných (in situ) postmortem mozcích 13 subjektů s využitím MR a spektrometrie. Byla nalezena velmi silná korelace mezi chemicky stanovenou koncentrací železa a magnetickou susceptibilitou ve strukturách šedé hmoty ($r_s =$

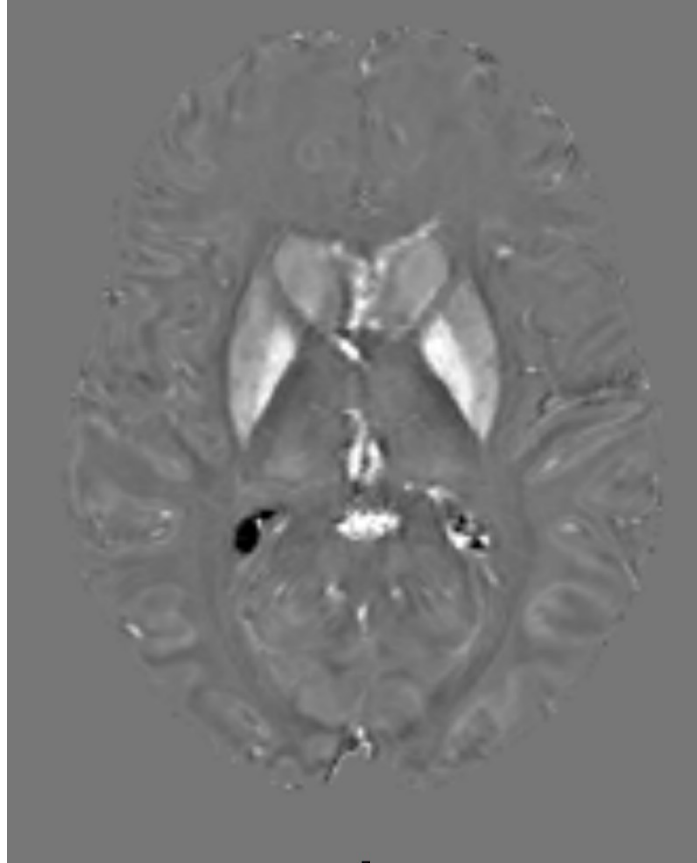
0,84, $p < 0,001$), v bílé hmotě byl korelační koeficient mnohem menší ($r_s = 0,27$, $p < 0,001$). Průběh křivky celkové lineární korelace byl v souladu s teoretickými úvahami o magnetismu ferritinu podporující teorii, že většina železa v mozku se váže na proteiny ferritinu. Ze studie vyplynulo, že železo je dominantním zdrojem magnetické susceptibility v centrální šedé hmotě a může být stanoveno pomocí QSM. V regionech bílé hmoty je stanovení železa pomocí QSM méně přesné, susceptibilita je zde více komplexní, protože na hodnotách susceptibility se podílí také úbytek myelinu – protisměrný příspěvek diamagnetických vlastností myelinových nervových vláken (Langkammer et al., 2012). Některé in vivo studie demonstrovaly, že QSM je ve strukturách centrální šedé hmoty ke změnám indikujícím depozita železa u pacientů RS, respektive CIS, senzitivnější než jiné metody (Schmalbrock et al., 2016; Zivadinov et al., 2012).

Data pro QSM jsou získávána pomocí 3D gradient echo (GRE) sekvence. Tyto sekvence jsou citlivé na nehomogenity magnetického pole, způsobené rozdílnou susceptibilitou tkání. Primárně získané fázové snímky obsahují informace o lokálních deformitách magnetického pole. Fáze tzv. „unwrappingu“ koriguje diskontinuity v původních fázových obrazech, což vede k vytvoření obrazu s kontinuální fází. Krok odstranění pozadí odděluje lokální odchylky pole způsobené tkáněmi od dalších zdrojů, jako jsou nehomogenity pole. Klíčovým krokem je dipólová inverze, která spočívá ve výpočtu susceptibility tkáně z lokálních dat pole. Výsledkem je mapa magnetické susceptibility tkáně, poskytující kvantitativní informace o jejích magnetických vlastnostech (Schweser et al., 2016).

QSM je efektivní v detekci a kvantifikaci koncentrace železa v mozkové tkáni a poskytuje vylepšený kontrast pro struktury bohaté na železo ve srovnání s běžnými MR technikami (Obrázek 17) (Liu et al., 2015; Wang et al., 2017).

Zpracování QSM dat je výpočetně náročné a složité, vyžaduje specializovaný software a odborné znalosti. QSM je také citlivé na různé artefakty, včetně těch z rozhraní vzduch-tkáň, které mohou komplikovat interpretaci výsledků (Wei et al., 2015). Další omezení spočívá v tom, že rozlišení QSM je limitováno možnostmi MR skeneru a potřebou vysokého poměru signálu k šumu pro přesné měřené fáze. V neposlední řadě chybí v algoritmech zpracování QSM standardizace, což může vést k variabilitě výsledků v různých studiích nebo institucích. Metoda QSM je stále aktivně vyvíjena, mimo jiné také z důvodu, že kromě zvýšeného železa přispívá k susceptibilitě také snížené množství myelinu, přesto je

QSM metodou dostatečně robustní a vhodnou pro mapování vysoce paramagnetického železa v mozku, které je hlavním determinantem mozkové susceptibility.



Obrázek 17. QSM – kvantitativní mapa susceptibility ukazuje ukládání železa v BG (bazálních gangliích).

1.2.4 Železo v mozku u pacientů s RS

Již předchozí histopatologické a MR studie prokázaly změny hladin železa v lézích bílé hmoty a ve strukturách hluboké šedé hmoty mozkové u pacientů s RS (Stüber et al., 2016). To může znamenat, že železo, jeden ze základních prvků pro normální fungování buněk, se podílí na patofyziologii RS. Abnormality v metabolismu železa mohou vést k smrti neuronů a ukládání železa v mozku (Stankiewicz et al., 2014).

Fenomén zvýšené akumulace železa v makrofázích a mikroglíích v časných stadiích aktivních demyelinizačních lézích zdůrazňuje potencionální roli železa při rozvoji RS, jak bylo prokázáno v různých histopatologických a MR studiích (Castellaro et al., 2017). Bylo pozorováno, že v demyelinizačních lézích jsou přítomna depozita železa, která se primárně nacházejí v makrofázích (Tham et al., 2021). Tato depozita tvoří charakteristické železné

prstence kolem plaků bílé hmoty, skládají se z makrofágů a mikroglíí. Tyto prstence jsou pozorovány u aktivních i chronických lézí a v průběhu času velikostně progredují, dokonce i několik let po jejich vzniku (Dal-Bianco et al., 2021; Y. Zhang et al., 2016). Kromě toho je přítomnost těchto prstenců s depozity železa v lézích bílé hmoty spojena s vyšším rizikem progresu onemocnění u pacientů s klinicky izolovaným syndromem do klinicky manifestní formy a tato progres se vyskytuje často dříve (Burgetova et al., 2017; Schweser et al., 2021a).

U RS je progres lézí charakterizována vyvíjejícím se složením fagocytárních buněk. Počáteční stadia demyelinizačních lézí se vyznačují převážně přítomností mikroglíí centrálního nervového systému, zatímco v pozdějších stadiích dochází ke značnému přílivu makrofágů odvozených z periferních monocytů (Zrzavy et al., 2017). Současně existují důkazy o aktivaci mikroglíí v oblastech bílé hmoty, které nejsou dle zobrazovacích či histopatologických metod postiženy. Stupeň této mikroglíální aktivity eskaluje s postupujícím onemocněním, což je fenomén, který je výraznější ve srovnání se zdravými kontrolními subjekty (Zrzavy et al., 2017).

Oligodendrocyty, které patří mezi energeticky neaktivnější buňky v mozkové tkáni a které zodpovídají za tvorbu myelinu, hrají klíčovou roli v souvislosti se zapojením železa do patogeneze RS. Tyto buňky jsou obohaceny o enzymy nezbytné pro oxidační metabolismus, pro které je železo důležitým kofaktorem. Přítomnost vysokého počtu transferinových receptorů v membránách oligodendrocytů a myelinu poukazuje na možnou cestu akumulace železa, zejména v aktivních demyelinizačních lézích, ve kterých dochází k porušení myelinového pochev nervových vláken. Pozoruhodné se zdá, že poruchy regulace železa v lézích bílé hmoty a v hlubokých strukturách šedé hmoty mozkové mají odlišné patofyziologické mechanismy (Al-Radaideh et al., 2019).

Významné změny koncentrací železa u pacientů s RS jsou nejvíce pozorovány ve strukturách hluboké šedé hmoty mozkové, jako je ncl. caudatus, ncl. dentatus a globus pallidus (Elkady et al., 2017). Zvýšená koncentrace železa v těchto strukturách byla spojena s degenerací okolní bílé hmoty (Bergsland et al., 2017) a také koreluje s klinickými příznaky, včetně alterace disability a kognice (Fujiwara et al., 2017; Schmalbrock et al., 2016). Pokročilé techniky zobrazení magnetickou rezonancí vrhly světlo na tato tvrzení a prokázaly, že rozdíly v obsahu a distribuci železa se vyskytují zřetelně napříč jednotlivými strukturami šedé hmoty mozkové (Fujiwara et al., 2017). Některé studie naznačují, že zjevné zvýšení hladin železa nemusí nutně znamenat skutečný vzestup, ale spíše se jedná o důsledek celkové atrofie mozkové tkáně, což vede k relativnímu zvyšování koncentrace železa. V této souvislosti může celkový obsah železa u pacientů s RS zůstat nezměněn, nebo může být

dokonce snížen ve srovnání se zdravými jedinci (Elkady et al., 2017; Taege et al., 2019). Podstatné snížení obsahu železa je často pozorováno v thalamu, zejména u pacientů se sekundární progresivní formou RS, přičemž tento pokles je úzce spojen se závažností onemocnění (Burgetova et al., 2017; Elkady et al., 2017; Schweser et al., 2021a).

V kontextu sérových biomarkerů většina studií neprokázala významné změny v hladinách železa a ferritinu u pacientů s RS. Tito pacienti nicméně často vykazují sníženou kapacitu pro sérové antioxidanty a zvýšené hladiny hydroxyperoxidů. Kromě toho se objevuje zvýšená aktivita enzymů jako je ceruloplasmin, feroxidáza a NADPH oxidáza 5, které jsou indikátorem probíhajícího oxidačního stresu (Doğan & Yildiz, 2019; Siotto et al., 2019). Vedle těchto nálezů je patrný výrazný pokles transferinu a lipokalinu 2 jak v séru, tak v mozkomíšním moku. Je pozoruhodné, že u posledně jmenovaných bylo zjištěno, že mají silnou korelaci s hladinami železa ve strukturách hluboké šedé hmoty mozkové (Khalil et al., 2016).

2 Změny magnetické susceptibility v podkorových strukturách mozku a v mozkové kůře v souvislosti s fyziologickým stárnutím

2.1 Úvod

Během života dochází v lidském mozku k mikrostrukturálním změnám, včetně atrofie šedé hmoty, degenerace myelinu nebo akumulaci železa, které lze zachytit in vivo různými kvantitativními technikami MR (Callaghan et al., 2014; Lorio et al., 2014; Pfefferbaum et al., 2009; Taubert et al., 2020). Znalost spektra strukturálních změn mozku a souvisejících MR parametrů asociovaných s věkem je důležitá pro pochopení neurobiologie stárnutí a pro odlišení fyziologického stárnutí od projevů nemoci.

Magnetickou susceptibilitu, což je charakteristika chování látky ve vnějším magnetickém poli, lze ve tkáních kvantifikovat pomocí MR techniky zvané kvantitativní mapování susceptibility (QSM) (Wang & Liu, 2015). Ačkoli magnetická susceptibilita mozkové tkáně může být ovlivněna myelinem, vápníkem nebo deoxyhemoglobinem, je prokázáno, že hlavním determinantem je obsah železa v bazálních gangliích a dalších strukturách šedé hmoty (Langkammer et al., 2015). QSM se proto považuje za měřítko obsahu železa v šedé hmotě (Acosta-Cabronero et al., 2018; Dusek et al., 2013).

K akumulaci nehemového železa v mozku dochází během normálního stárnutí, a to heterogenně v určitých typech buněk a oblastech mozku, jako jsou bazální ganglia, hipokampus, motorická kůra, mozečková jádra a další podkorové oblasti mozku (Burgetova et al., 2010; Connor et al., 1990; A. Daugherty & Raz, 2013; Schipper, 2012; Ward et al., 2014). Oblasti s nejvyššími depozity železa jsou globus pallidus, substantia nigra, červená jádra a putamen (Ghadery et al., 2015; Hallgren & Sourander, 1958; Ramos et al., 2014).

Železo se v mozku podílí na řadě dějů, jako je transport kyslíku, oxidativní fosforylace, syntéza DNA, mitochondriální dýchání, syntéza myelinu, aktivace antioxidantních enzymů a metabolismus neurotransmiterů (Ward et al., 2014). Na druhé straně může narušení homeostázy železa vést k neurotoxicitě mozku, a to různými mechanismy, jako je poškození membrán, bioaktivace protoxinů, aberantní buněčná signalizace, bioenergetické selhání, proteosomální a mitochondriální dysfunkce, agregace proteinů a tvorba inkluzí, elektrofyziologické poruchy a synaptolýza. Všechny tyto faktory se mohou podílet na apoptóze, nekróze nebo specifické buněčné smrti vyvolané železem zvané ferroptóza (J. Li et al., 2020; Schipper, 2004; Ward et al., 2014). Zvýšené množství

subkortikálního železa je u starší populace spojeno se snížením kognitivních a motorických funkcí (A. M. Daugherty et al., 2015; Ghadery et al., 2015; Kalpouzos et al., 2017), což naznačuje, že bazální ganglia mohou být v průběhu stárnutí zranitelnější vůči hromadění železa, což je vystavuje zvýšenému riziku neurodegenerace a/nebo neurozánětu. Pochopení vzorců akumulace železa během fyziologického stárnutí by tak mohlo pomoci při identifikaci osob, které jsou vystaveny většímu riziku urychlené neurodegenerace.

Většina předchozích studií zkoumajících akumulaci železa během normálního stárnutí byla založena na regionální analýze oblasti hluboké šedé hmoty na R2* relaxometrii a mapách magnetické susceptibility (Aquino et al., 2009; Bilgic et al., 2012; Gong et al., 2015; Haacke et al., 2010; W. Li et al., 2014; M. Liu et al., 2016; Persson et al., 2015) . Analýza celého mozku, která není omezena na předem definované oblasti, byla pro studium věkem podmíněných změn magnetické susceptibility, a tím i hladiny železa, použita jen ve dvou studiích (Acosta-Cabrero et al., 2016a; Betts et al., 2016a).

Cíl práce

Cílem této studie bylo provést podrobnou analýzu vzorců ukládání železa v mozkových strukturách u dospělých během fyziologického stárnutí pomocí voxelové analýzy na úrovni celého mozku.

Hypotéza

Během fyziologického stárnutí dochází u dospělých k akumulaci železa ve specifických mozkových strukturách.

2.2 Materiál a metodika

Design studie a výběr subjektů

Studie byla prospektivní a monocentrická. Sběr dat probíhal ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze. Studie byla vedena v souladu s Helsinskou deklarací (revidovanou v roce 2013) a schválena etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (ID1018/17). Všechny vyšetřované subjekty podepsaly informovaný souhlas.

Magnetická rezonance mozku byla provedena u 95 zdravých jedinců (57 žen a 38 mužů) ve věku 21 až 58 let (průměr \pm SD = 37 \pm 10), kteří reagovali na oznámení prezentované na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a splňovali následující kritéria pro zařazení:

- ochotni podepsat informovaný souhlas v souladu s místními regulacemi;
- věk 18-60 let (zvolený tak, aby byl srovnatelný s věkem dospělých pacientů v souběžně probíhající studii s pacienty RS).

Vylučovací kritéria byla následující:

- neschopnost podstoupit vyšetření MR;
- neschopnost být vyšetřen čtyřikrát v průběhu následujících tří let v 0, 12, 24, a 36 měsíci;
- těhotenství v době zařazení do studie či v průběhu studie;
- jakákoli onemocnění či jiné zdravotní indispozice, nebo abnormality mozku na MR, které by mohly ovlivnit zkoumané mozkové a míšní struktury.

Protokol MR

Vyšetření bylo provedeno nativně na 3T MR skeneru (Siemens Skyra 3T, Siemens Healthcare, Erlangen, Německo) s 32kanálovou hlavovou cívkou typu birdcage. Protokol MR zahrnoval anatomické T1 vážené 3D snímky s magnetizační přípravou a rychlým gradientním echem (MPRAGE) (T1WI) v sagitální rovině s následujícími akvizičními parametry: opakovací čas (TR) 2300 ms; doba echa (TE) 2,96 ms; inverzní čas (TI) 900 ms; úhel překlpení (FA) 9°; zorné pole (FOV) 176x256x256 mm; prostorové rozlišení 1,0x1,0x1,0 mm³ pro anatomické zobrazování a segmentace, a 3D obrazy s kompenzací průtoku s gradientovým echem (GRE) v axiální rovině s následujícími akvizičními parametry: opakovací čas (TR) 33 ms; první doba echa (první TE) 4,5 ms, rovnoměrný odstup echa= 5 ms, poslední doba echa (poslední TE) 29,5 ms, počet ech 6; úhel překlpení (FA) 18°; zorné pole (FOV) 195x240x164 mm; prostorové rozlišení=0,94x0,94x0,94mm³ pro QSM. Akviziční parametry jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Akviziční parametry MR

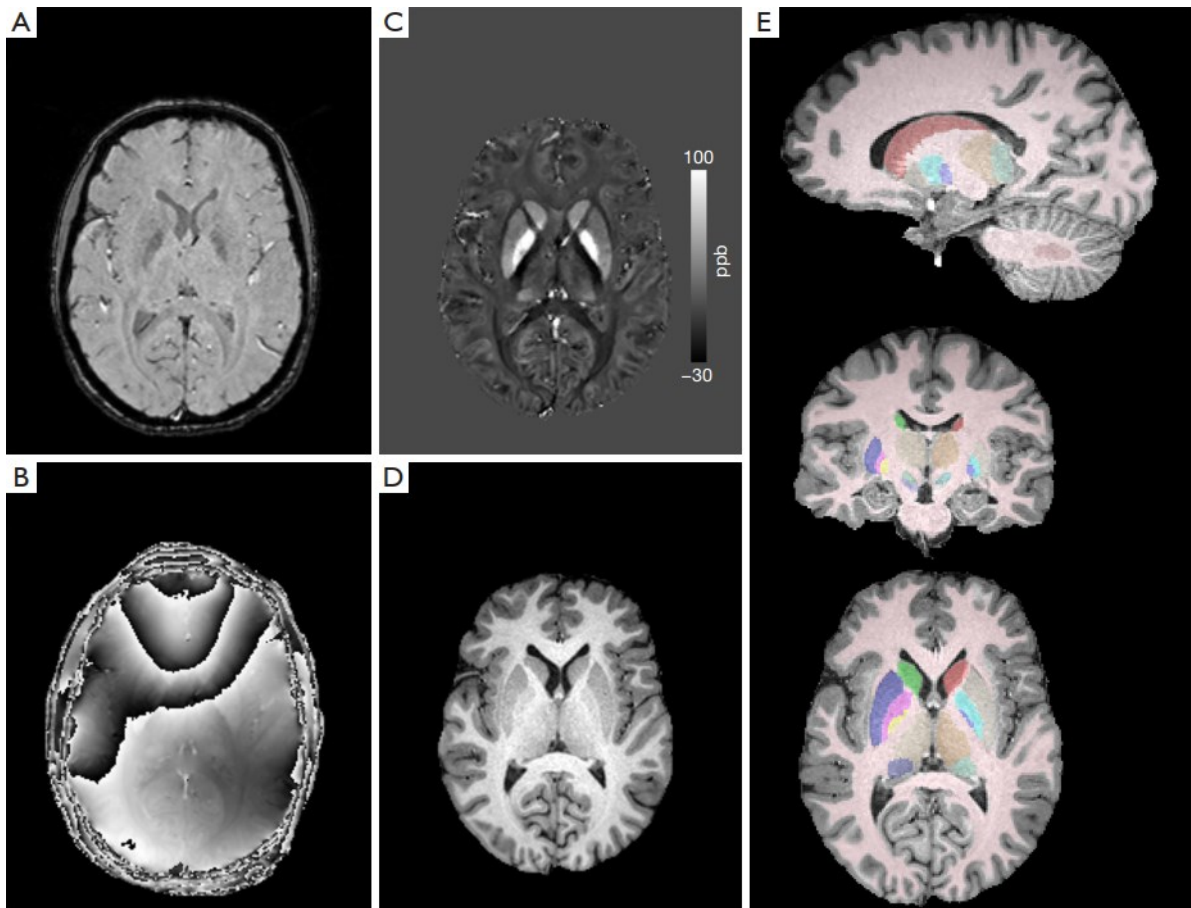
sekvence	TR (ms)	TE (ms)	TI (ms)	FA (°)	FOV (mm)	prostorové rozlišení (mm ³)
T1 MPRAGE	2300	2,96	900	9	176x256x256	1,0x1,0x1,0
T2* GRE	33	první 4,5 poslední 29,5		18	195x240x164	0,94x0,94x0,94

Zpracování QSM

QSM byl zpracován pomocí víceškálového dipólového inverzního algoritmu, implementovaného v softwarovém balíčku QSMbox (<https://gitlab.com/acostaj/QSMbox>) (Acosta-Cabronero et al., 2018; Milovic et al., 2021). Anatomické snímky T1WI (tj. MPRAGE) byly převedeny do QSM prostoru registrací rigidního tělesa na obraz s velikostí prvního echa z pulzní sekvence GRE pomocí nástroje SPM12 (Statistical Parametric Mapping, www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm12) (Huhdanpaa et al., 2014). Odstranění skeletu lebky bylo provedeno násobením binární mozkovou maskou, generovanou pomocí SPM a QSMboxu. Koregistrované obrazy QSM a T1WI, zbavené skeletu lebky, byly následně podrobeny automatizované multiatlasové segmentaci na cloudové platformě (www.mricloud.org) (Mori et al., 2016), využívající duální kontrast (např. QSM/T1) pro vymezení jader hluboké šedé hmoty mozkové (X. Li et al., 2019). Oblasti zájmu zahrnovaly následující struktury:

- globus pallidus internus
- globus pallidus externus,
- putamen,
- ncl. caudatus
- thalamus
- pulvinar thalami,
- substantia nigra,
- ncl. ruber,
- ncl. dentatus
- ncl. subthalamicus
- celková bílá hmota mozková.

Segmentované objemy byly následně transformovány a poté byly extrahovány střední hodnoty objemové susceptibility jednotlivých ROI (viz výše). Ilustrace zpracování dat je znázorněna na obrázku (Obrázek 18).



Obrázek 18. Zpracování MR. Magnitudové (a) a fázové (b) obrazy gradientního echa; rekonstruovaný obraz QSM (c); koregistrovaný T1 vážený obraz po odstranění kalvy (d); segmentace mozkových struktur (e).

Hodnoty magnetické susceptibilitě z obou mozkových hemisfér byly zprůměrovány. Dále byly analyzovány jako a) hrubé nekorigované hodnoty a b) hodnoty vztažené k průměrné objemové magnetické susceptibilitě celkové bílé hmoty mozkové. Segmentace celkové bílé hmoty byla provedena pomocí automatizovaného algoritmu, což poskytlo vysoce reprodukovatelné a nezávislé měření pro porovnání.

Zpracování map T2*

Relaxační mapy T2* byly vypočteny ze snímků GRE magnitudy pomocí nelineární metody nejmenších čtverců založené Levenberg-Marquardtově algoritmu, implementovaném v softwaru MRI Processor (verze 1.1.6, ImageJ 1.51k; T2* hodnoty byly omezeny na 100ms, maximální počet iterací byl nastaven na 100). Pro analýzu na úrovni celého mozku byly použity relaxační mapy T2*.

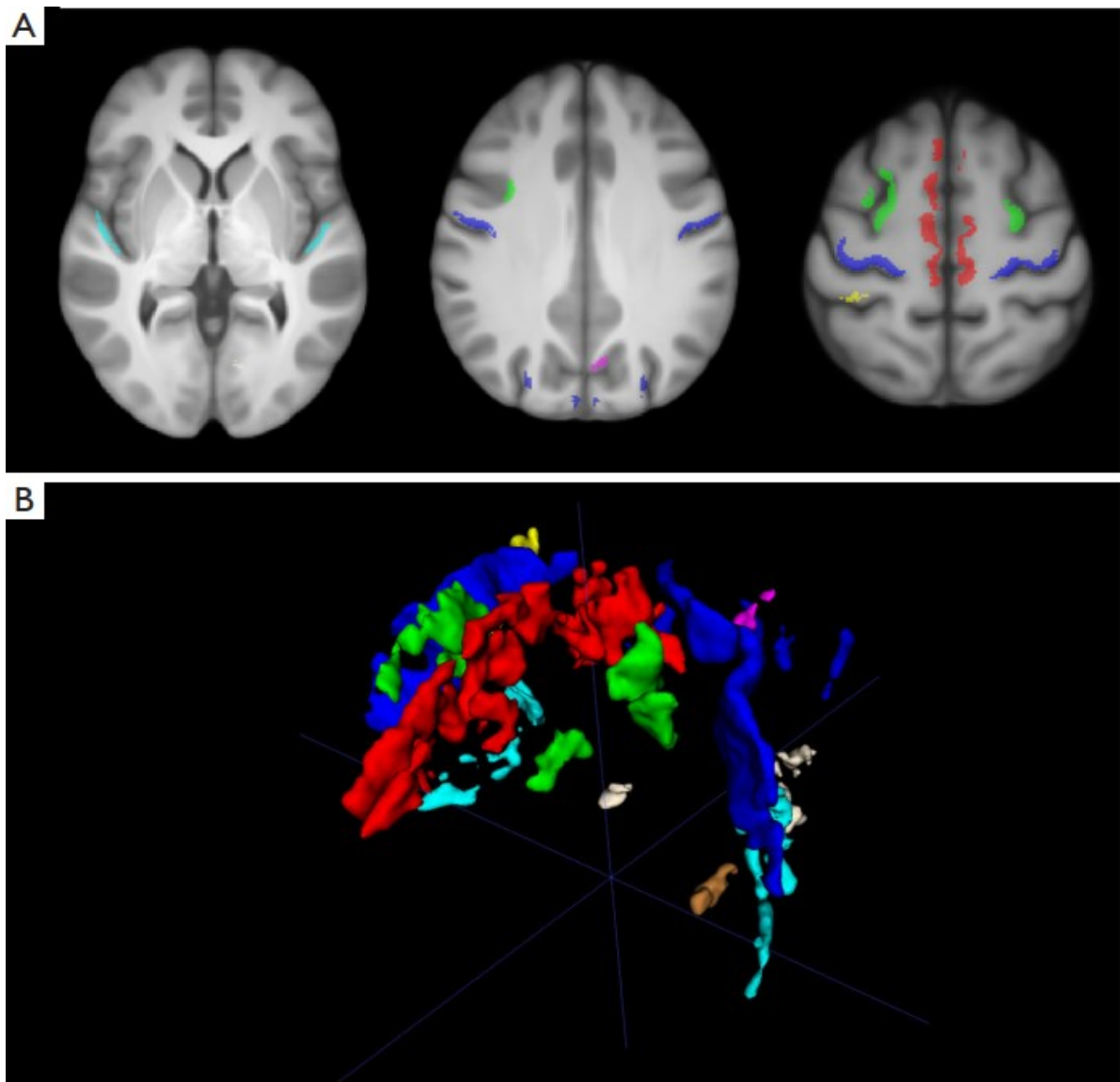
Analýza na úrovni celého mozku

Analýza byla provedena podle již dříve publikované metodiky (Acosta-Cabronero et al., 2016b). Nejprve byla provedena lineární předregistrace (antsRegistration) a nelineární transformace (antsApplyTransformation) map magnetické susceptibility a T2* relaxačních map do standardního MNI prostoru (MNI152 „ICBM 2009c Nonlinear Symmetric“) pomocí balíčků ANTS (verze 2.1.0) (Avants et al., 2009). Ke kompenzaci menších nesrovnalostí v registraci byl použit střední filtr a filtr maximální intenzity, oba vypočítané přes kouli o průměru 3 mm. Tento postup byl vybrán na základě empirického vizuálního pozorování a poskytl nejlepší výsledky z hlediska nastavení šumu a zachování detailu obrazu - vizuálně jsme porovnali výstupní obrazy po aplikaci jedenácti různých kombinací filtrů (mediánový sférický, mediánový kubický, Gaussův sférický) s různou velikostí jádra. Zvolená kombinace filtrů poskytla obrazy s přiměřenou úrovní šumu a detailů a jevila se jako nejvhodnější postup pro koregistraci map susceptibility a T2* relaxačních map; mediánový filtr odstranil pozitivní i negativní hodnoty signálu způsobené cévami, zatímco sférický filtr s maximální intenzitou (průměr 3 voxely) kompenzoval nedokonalosti v koregistraci úzkých struktur (zejména gyrů) se šablonou MNI152.

V post-hoc analýze byla vytvořena maska kortikálních voxelů, ve kterých byla zjištěna významná asociace magnetické susceptibility a věku. Tato maska byla aplikována na anatomickou T1 šablonou a bylo vybráno devět oblastí zájmu (region of interest - ROI) (Obrázek 19), které byly manuálně segmentovány pomocí ITK-SNAP (www.itksnap.org) (Yushkevich et al., 2006):

- gyrus precentralis,
- gyrus postcentralis,
- dorzolaterální prefrontální kortex,
- insulární kortex,
- precuneus,
- okcipitální kortex,
- okcipito-temporální kortex,
- cerebellární vermis (Figure S1).

Pro každou z těchto ROI byly získány průměrné hodnoty magnetické susceptibility, které byly následně podrobeny další analýze.



Obrázek 19. Kortikální oblasti, které vykazují významnou korelaci mezi magnetickou susceptibilitou a věkem na základních řezech v transverzální rovině (a) a na třírozměrné rekonstrukci (b) – gyrus precentralis (červeně), gyrus postcentralis (světle modrá), dorzolaterální prefrontální kortex (zelená), mediální prefrontální kortex (tmavě modrá), insulární kortex (žlutá), precuneus (purpurová).

Statistika

Pro hodnocení regionálních změn magnetické susceptibility v závislosti na věku byla použita jednorozměrná regresní analýza. Byly testovány lineární, kvadratické a exponenciální regresní modely. K určení nejvhodnějšího modelu bylo použito informačního kritéria Akaike s korekcí pro malé velikosti vzorků (AICc), spolu s hodnocením koeficientu determinace (R^2) a střední kvadratickou chybou (RMSE).

V lineárním modelu byl regresní sklon vyjádřen v jednotkách part per billion (ppb) na rok. Statistická významnost tohoto sklonu byla testována F-testem.

Exponenciální model byl založen na principu jednofázové asociace, přičemž byla použita následující rovnice pro modelování závislosti susceptibility na věku:

$$\text{susceptibilita} = A * (1 - \exp(-B * \text{age})) + C,$$

kde A, B a C jsou tkáňově specifické parametry (W. Li et al., 2014).

Pro korekci při testování více hypotéz byla použita Holm-Bonferroniho metoda. Statistické analýzy byly provedeny v softwaru Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

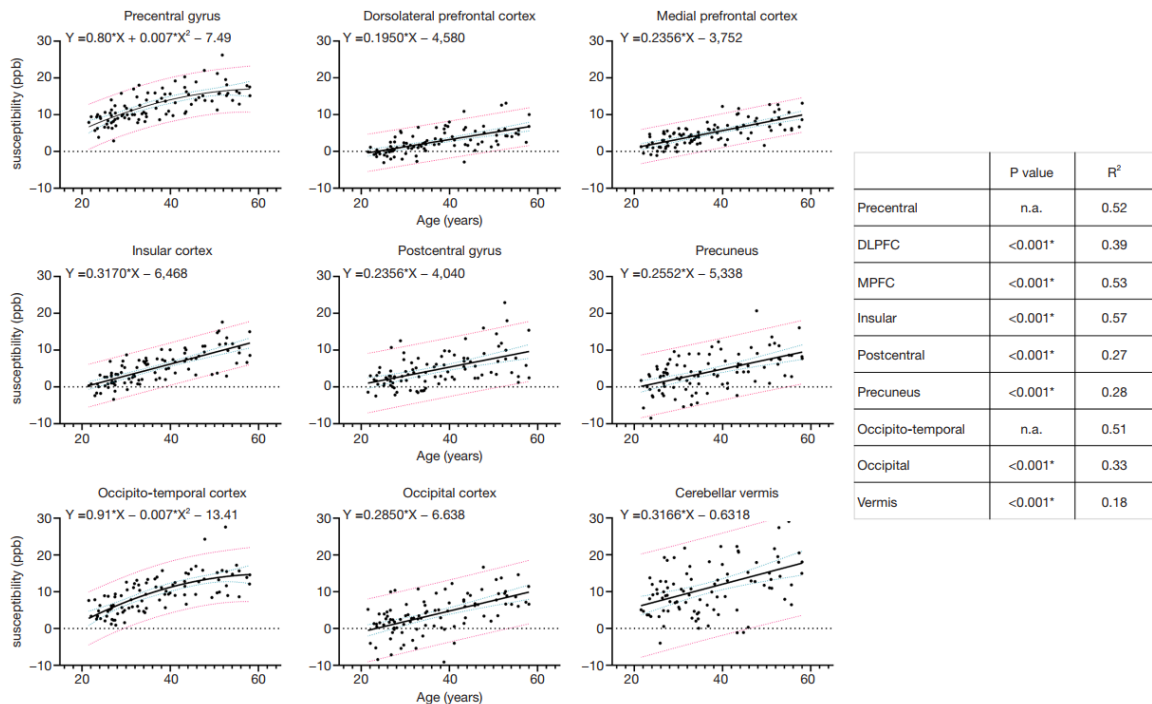
Pro analýzu vztahu mezi změnami magnetické susceptibility a $T2^*$ relaxačního času byl použit softwarový balíček SPM12. Výsledné statistické mapy byly generovány s využitím definice clusterů a prahových hodnot $P < 0,005$ (bez korekce) a $P < 0,05$ (po korekci).

Voxelové mapy sklonů lineární regrese β byly vizualizovány pomocí nástroje MRICroGL (<http://www.nitrc.org/projects/mricrogl>). Anatomicky signifikantní změny byly lokalizovány s využitím tzv. Atlas of Intrinsic Connectivity of Homotopic Areas (AICHA) (Joliot et al., 2015).

2.3 Výsledky

Analýza ROI

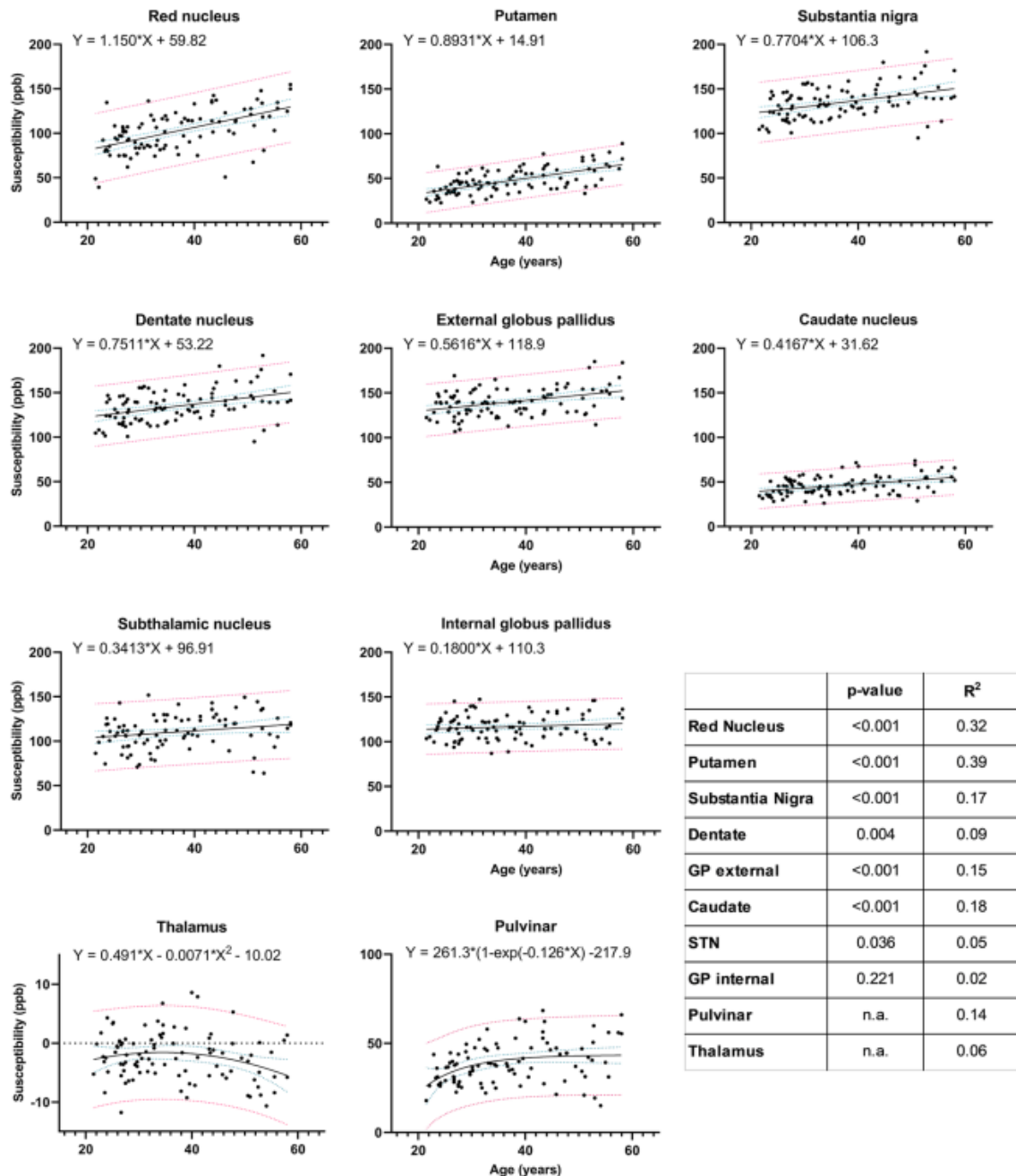
Akumulace železa se vzrůstajícím věkem v bazálních gangliích roste lineárně. To je v kontrastu s thalamem, kde byl pozorován vzor kvadratický, a s pulvinarem, kde byl zaznamenán vzor exponenciální (Obrázek 20).



Obrázek 20. Korelace magnetické susceptibilitě (ppb) v strukturách hluboké šedi v závislosti na věku včetně regresních rovnic, 95% intervalů spolehlivosti.

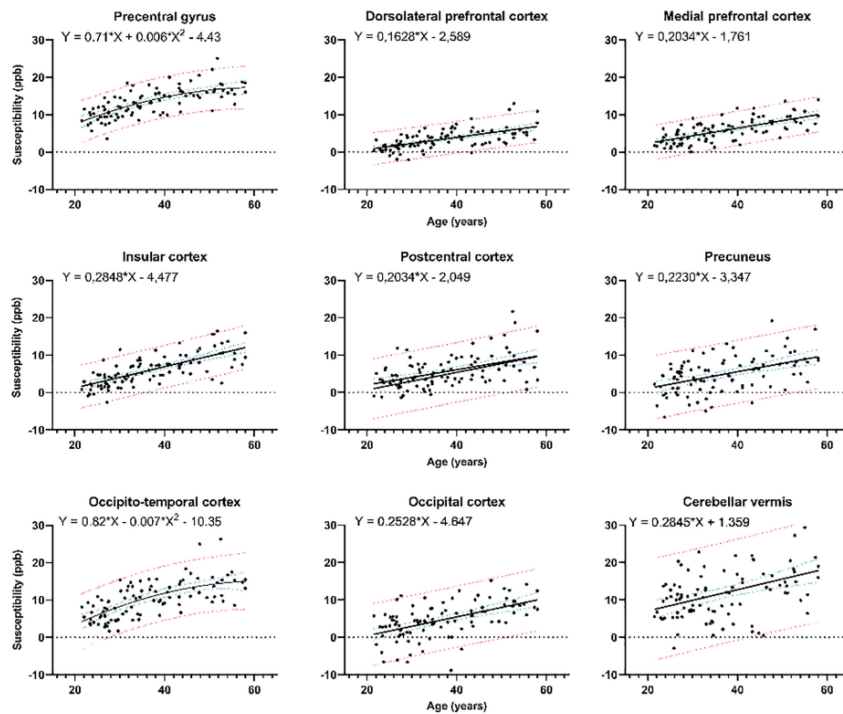
Při podrobnější analýze struktur hluboké šedé hmoty mozkové jsme zjistili významný lineární nárůst hrubé magnetické susceptibilitě v několika oblastech. Tyto oblasti zahrnovaly ncl. ruber ($\beta = 1,30$, $p < 0,001$), putamen ($\beta = 0,89$, $p < 0,001$), substantia nigra ($\beta = 0,76$, $p < 0,001$), ncl. dentatus ($\beta = 0,73$, $p = 0,002$), globus pallidus externus ($\beta = 0,62$, $p < 0,001$), ncl. caudatus ($\beta = 0,46$, $p < 0,001$) a subthalamické jádro ($\beta = 0,43$, $p = 0,024$). Naopak, efekt věku nebyl významný pro globus pallidus internus ($\beta = 0,20$, $p = 0,15$). V thalamu bylo zjištěno, že magnetická susceptibilita narůstala až do věku 40 let, po kterém následoval pokles. V pulvinaru byl naopak pozorován nárůst susceptibilitě, který se od věku 40 let ustálil.

Dále jsme provedli analýzu magnetické susceptibility v mozkové tkáni vztaženou na hodnoty celkové bílé hmoty mozkové. Tato analýzy přinesla podobné výsledky (Obrázek 21). Bylo zjištěno, že průměrná magnetická susceptibilita v celkové bílé hmotě vykazuje mírný lineární pozitivní vliv věku ($\beta = 0,03$, $p < 0,002$).



Obrázek 21. Korelace magnetické susceptibility (ppb) v strukturách hluboké šedi v závislosti na věku včetně regresních rovnic, 95% intervalů spolehlivosti, s hodnotami normalizovanými na susceptibilitu v bílé hmotě.

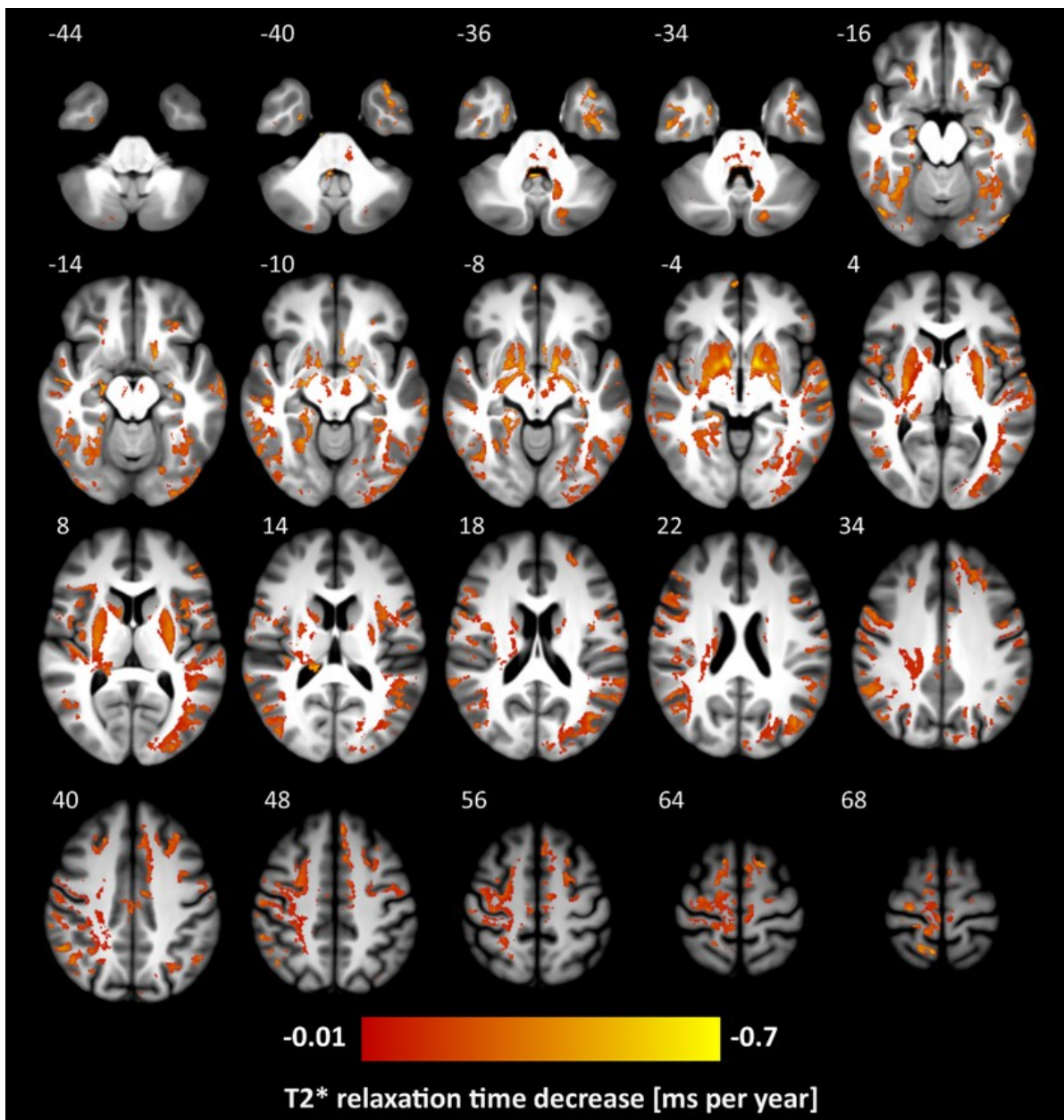
Analýza na úrovni celého mozku



	p-value	R ²
Precentral	n.a.	0.50
DLPFC	<0.001	0.39
MPFC	<0.001	0.46
Insular	<0.001	0.52
Postcentral	<0.001	0.24
Precuneus	<0.001	0.23
Occipito-temporal	n.a.	0.45
Occipital	<0.001	0.29
Vermis	<0.001	0.16

Obrázek 22. Korelace magnetické susceptibilitu (ppb) v kortikální šedi v závislosti na věku včetně regresních rovnic, 95% intervalů spolehlivosti, s hodnotami normalizovanými na susceptibilitu v bílé hmotě.

Výsledky analýzy na úrovni celé mozkové tkáně dokumentující změny magnetické susceptibilitu vyjádřené v ppb za rok jsou prezentovány na obrázcích (Obrázek 22, Obrázek 23). Mimo struktury hluboké šedé hmoty mozkové bylo identifikováno několik dalších regionů, kde byl pozorován pozitivní vztah mezi magnetickou susceptibilitou a věkem. Tyto oblasti zahrnují precentrální a postcentrální gyrus, mediální a dorzolaterální prefrontální kortex, superioriorní temporální gyrus a insulu, zadní části okcipitálního gyrus, precuneus, cuneus, zadní cingulární gyrus a linguální gyrus ($p < 0,05$). V mozečku byla u vermis a mozečkových tonsil pozorována významná pozitivní korelace s věkem ($p < 0,05$). Prostorové souřadnice a anatomické označení clusterů s významným věkově souvisejícím nárůstem magnetické susceptibilitu jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2).



Obrázek 23. Mapa korelačních koeficientů změny magnetické susceptibilitě z analýzy na úrovni celého mozku v závislosti na věku.

Několik regionů naopak vykazovalo snížení magnetické susceptibilitě s věkem, ačkoliv byl tento efekt mnohem menší ve srovnání s oblastmi, kde došlo k nárůstu susceptibilitě. Změny β nebyly vyšší než $-0,2$ ppb za rok ($p < 0,05$). Mezi tyto oblasti patří rostrum corporis callosi, capsula externa, tectum a tegmentum mesencephali, frontální a temporální subkortikální oblasti. Některé extracerebrální struktury, plexus choroideus, falx cerebri, venozní siny vykazovaly pokles magnetické susceptibilitě s věkem s β do $-1,0$ ppb za rok ($p < 0,05$).

Tabulka 2. Oblasti s významnými změnami T2* relaxačního času v závislosti na věku.

Cluster volume [mm ³]	Peak susceptibility change [ppb/year]	Peak T value	MNI coordinates [mm]			Peak Structure	Anatomical structures within cluster
			X	Y	Z		
10,477	1.7	10.7	16	1	-5	Putamen*	Right Putamen, Pallidum, Caudate, Substantia Nigra, Red Nucleus*
10,018	1.5	10.3	-14	1	-4	Putamen*	Left Putamen, Pallidum, Caudate, Substantia Nigra, Red Nucleus*
464	0.8	5.1	-15	-60	-37	Dentate*	Left Dentate*
369	0.7	4.9	15	-58	-37	Dentate*	Right Dentate*
3,126	0.5	7.0	-41	-11	56	Precentral gyrus	Left Precentral gyrus, Paracentral lobule
685	0.5	4.9	-23	-68	7	Calcarine gyrus	Left Calcarine, Lingual, Fusiform gyri, Parietooccipital sulcus
914	0.4	4.8	-41	-21	4	Superior Temporal gyrus	Left Superior Temporal gyrus, Posterior Insula
3,628	0.4	6.4	23	-22	63	Precentral gyrus	Right Precentral gyrus, Paracentral lobule
811	0.4	4.8	45	-16	0	Superior Temporal gyrus	Right Superior Temporal, Supramarginal gyri, Posterior Insula
1,902	0.4	5.0	-8	-35	47	Cingulate sulcus	Left Cingulate sulcus, Superior Frontal gyrus, Paracentral lobule
252	0.3	6.4	29	-54	-16	Fusiform gyrus	Right Fusiform, Lateral Occipital gyri
303	0.3	4.7	5	-88	30	Superior Occipital gyrus	Right Superior Occipital, Calcarine gyri, Cuneus
3,779	0.3	6.3	4	-26	66	Paracentral lobule	Right Paracentral lobule, Cingulate sulcus, Superior frontal gyri
210	0.3	4.7	-25	-76	28	Middle Occipital gyrus	Left Middle Occipital, Angular gyri, Intraoccipital sulcus
442	0.3	3.8	13	-30	0	Thalamic pulvinar*	Right Thalamus*
485	0.3	5.3	2	-55	-36	Cerebellum	Cerebellar vermis
1,503	0.3	5.4	23	11	63	Superior Frontal sulcus	Right Superior Frontal gyrus and sulcus, Precentral sulcus
193	0.3	4.9	-4	-81	26	Cuneus	Left Cuneus, Calcarine, Superior Occipital gyri
383	0.3	4.1	35	11	25	Inferior Frontal gyrus	Right Inferior Frontal gyrus, Precentral sulcus
326	0.3	4.9	-2	-74	34	Parietooccipital sulcus	Left Parietooccipital sulcus, Precuneus
635	0.2	4.6	45	-25	43	Postcentral sulcus	Right Postcentral sulcus and gyrus
1,241	0.2	4.7	-33	-4	54	Superior Frontal gyrus	Left Superior Frontal sulcus and gyrus, Precentral sulcus
427	0.2	4.2	26	-73	29	Middle Occipital gyrus	Right Middle Occipital, Angular gyri, Intraoccipital, Intraparietal sulci
239	0.2	3.9	-50	-47	32	Supramarginal gyrus	Left Supramarginal, Inferior Parietal gyri
373	0.2	4.1	-6	-66	-58	Cerebellum	Left and right Cerebellar tonsils

Post-hoc analýza magnetické susceptibilitě v kortikálních oblastech s významným vlivem věku ukázala její lineární nárůst v postcentrálním, dorzolaterálním prefrontálním, mediálním prefrontálním kortexu, insule, v kortexu okcipitálním, precuneu a vermis ($\beta \approx 0,2$, $P < 0,001$). V gyrus precentralis a temporo-occipitalis magnetická susceptibilita vykazovala exponenciální růst s relativně prudkým vzestupem do věku 40 let s následným oploštěním křivky (Obrázek 23).

2.4 Diskuze

V této studii jsme kvantifikovali změny magnetické susceptibility související s věkem ve strukturách hluboké šedé hmoty mozkové a mozkovém kortexu u kohorty dospělých zdravých jedinců pomocí analýzy na úrovni celého mozku a regionální analýzy (ROI).

V rámci naší studie jsme pozorovali lineární souvislost mezi věkem a magnetickou susceptibilitou v různých strukturách šedé hmoty mozkové. Tato souvislost byla zvláště výrazná v několika oblastech a to ncl. ruber, putamen, substantia nigra, ncl. dentatus, globus pallidus externus a ncl. caudatus. Od těchto struktur se lišil thalamus, kde byla pozorována kvadratická asociace mezi věkem a magnetickou susceptibilitou rostoucí před a klesající po dosažení věku 40 let.

Analýza QSM dále ukázala významnou pozitivní korelaci mezi věkem a magnetickou susceptibilitou v rozsáhlých oblastech mozkové kůry – ve frontálních lalocích, v area Rolandi, v insulárním kortexu, v precuneu a cuneu, v zadním cingulu a linguálním gyru. Paralelní analýza T2* relaxačních map na úrovni celého mozku odhalila obdobný vzorec změn magnetické susceptibility v souvislosti s věkem.

Na rozdíl od susceptibility, u které jsme prokázali pozitivní efekt stoupajícího věku primárně ve strukturách šedé hmoty mozkové, oblasti, kde bylo zaznamenáno zkrácení T2* relaxačního času v závislosti na věku, se překrývaly jak s šedou hmotou mozkovou, tak se strukturami bílé hmoty. Tento rozdíl může být zapříčiněn skutečností, že v QSM se paramagnetický účinek akumulace železa a diamagnetický účinek myelinu v bílé hmotě vzájemně vyvažují, zatímco v T2* relaxačních mapách akumulace železa a zrání myelinu s postupujícím věkem způsobují místní nehomogenity magnetického pole, což vede ke zkrácení relaxačních časů T2*. Tento efekt byl zvláště patrný v subkortikálních oblastech bílé hmoty, kde je známo, že k akumulaci železa dochází.

Srovnání výsledků mapových analýz QSM a T2* ukazuje, že QSM může být vhodnější metodou pro hodnocení změn koncentrace železa v souvislosti s věkem v kortikálních oblastech.

Je všeobecně známo, že proces akumulace železa v mozku v průběhu života není lineární. Zaznamenali jsme, že během prvních dvou dekád života dochází k prudkému nárůstu koncentrace tkáňového železa (Hallgren & Sourander, 1958), což má za následek zvýšení magnetické susceptibility, jak již bylo popsáno v předchozích studiích (W. Li et al., 2014; Persson et al., 2015; van der Weijden et al., 2019). Po tomto rychlém nárůstu dochází ve věku 20-60 let k oploštění křivky, v některých případech dokonce k jejímu poklesu ve stáří.

Pro většinu struktur hluboké šedé hmoty mozkové a kortexu jsme ve věkovém rozmezí 20 až 60 let pozorovali lineární vývoj hodnot magnetické susceptibility. Zajímavé je, že některé oblasti, jako je pulvinar, motorická a okcipito-temporální kůra, vykazovaly v naší studii exponenciální vztah mezi věkem a magnetickou susceptibilitou. To naznačuje méně výraznou počáteční akumulaci železa v těchto oblastech, následovanou postupným oploštěným křivky s přibývajícím věkem.

Naše zjištění ukazují, že největší vliv věku na magnetickou susceptibilitu (nejstrmější sklon regresní křivky) byl zaznamenán v ncl. rubber a putamen. Toto pozorování je v souladu s dřívějšími studii (A. Daugherty & Raz, 2013; C. Liu, Wei, et al., 2015b; Persson et al., 2015). Ačkoliv ncl. rubber bylo obecně méně zkoumáno, v některých současnějších studiích, podobně jako v naší studii, bylo absolutní zvýšení magnetické susceptibility v ncl. rubber vyšší než v putamen (Betts et al., 2016b; Bilgic et al., 2012; Persson et al., 2015).

Pozorovaný pozvolný a mírnější vzestup magnetické susceptibility v ncl. caudatus, substantia nigra a ncl. dentatus je také v souladu s dřívějšími studii, ať už prováděnými post mortem in vitro (Ramos et al., 2014) či in vivo (Acosta-Cabronero et al., 2016a; Burgetova et al., 2010; Persson et al., 2015; Ward et al., 2014).

V případě globus pallidus byly dřívější studie nejednoznačné, uváděly buď žádné změny magnetické susceptibility v souvislosti s věkem (Acosta-Cabronero et al., 2016a; Gong et al., 2015; Persson et al., 2015) nebo pouze mírnou akumulaci železa v průběhu stárnutí (Bilgic et al., 2012). Metaanalýza, která zahrnovala 20 MR studií a která odhadovala obsah železa v ncl. caudatus, globus pallidus, putamen, ncl. rubber a substantia nigra, zdokumentovala nejnižší rozdíly související s věkem u globus pallidus, ačkoli byla tato struktura v absolutních hodnotách bohatá na železo (Daugherty & Raz, 2013). Studie, které zahrnovaly kojence, zaznamenaly exponenciální vzorec se strmě rostoucí koncentrací železa a také magnetickou susceptibilitou od narození s následným oploštěním křivky od počátku 3. dekády dále (Ghadery et al., 2015; Ning et al., 2019; Peterson et al., 2019; Ramos et al., 2014; Ward et al., 2014). Tyto studie si však nekladly za cíl specificky analyzovat trajektorii obsahu železa v globus pallidus během dospělého života. Naše výsledky naznačují, že důvodem protichůdných zjištění může být rozdílný příspěvek globus pallidus externum a internum v závislosti na strategii segmentace. Narozdíl od vnitřní části, vnější část, která přiléhá k putamen, vykazovala v současné studii lineární nárůst susceptibility v průběhu fyziologického stárnutí. Podobný účinek byl pozorován u R2* příčné relaxivity v jiné studii, která segmentovala vnitřní a vnější část globus pallidus (Betts et al., 2016a). Tyto výsledky poukazují na zřetelnou regulaci koncentrace železa v podoblastech pallida a naznačují, že

vnitřní a vnější globus pallidus by měly být pro správné posouzení změn v této struktuře analyzovány odděleně.

Výzkumy ukazují, že thalamus má celkově nízký obsah železa. Předpokládá se, že přítomnost myelinu v thalamu má významný vliv na změny magnetické susceptibility, což může maskovat efekt nízkého obsahu železa na susceptibilitu této struktury, zejména ve vztahu k věku (Hagemeier et al., 2013). Zajímavým jevem je pozorovaný vzorec, kdy do věku 40 let dochází k nárůstu susceptibility, následovanému pozdějším poklesem, což koresponduje s věkem souvisejícími změnami v koncentraci železa v thalamu, jak bylo zjištěno v post mortem studiích (Hallgren & Sourander, 1958). Tento jev naznačuje, že susceptibilita thalamu je pravděpodobně primárně ovlivňována množstvím železa, podobně jako u bazálních ganglií.

Na rozdíl od některých předchozích výzkumů (Persson et al., 2015) jsme v našem výzkumu, stejně jako některé další studie, identifikovali pozitivní nárůst magnetické susceptibility s narůstajícím věkem v pulvinaru thalamu. Je jistě zajímavé poukázat na rozdíl mezi pulvinarem a dalšími thalamickými jádry. Pulvinar, ačkoli je umístěn v zadní části thalamu, je vizuálně rozpoznatelný na QSM a vykazuje odlišný vzorec chování ve srovnání s ostatními thalamickými jádry. Zhang a kol. (Y. Zhang et al., 2018) poukázali na to, že v mediálních a laterálních jádrech thalamu dochází k bidirekčnímu vzorci susceptibility, zatímco anteriorní jádra a pulvinar vykazují postupný nárůst susceptibility s věkem. Tato zjištění naznačují potřebu rozlišovat mezi různými oblastmi thalamu při analýze magnetické susceptibility, zejména ve vztahu k obsahu železa. Výzkum tak podporuje teorii, že pulvinar a ostatní thalamická jádra by měla být analyzována odděleně.

Změny distribuce železa související s věkem v cerebrálním a cerebelárním kortexu in vivo, jsou prozkoumány mnohem méně. Tento fakt může souviset s komplexnější a variabilnější anatomii mozkové kůry ve srovnání s jádry hluboké šedé hmoty mozkové. Pro přesnou analýzu na úrovni skupiny je třeba provést nelineární transformaci, aby bylo možné korelovat odpovídající oblasti mezi jednotlivými subjekty.

Mezi další výzvy patří ztenčení kortexu a rozšíření subarachnoidálních likvorových prostor v cerebrálních sulcích jako doprovodný jev mozkové atrofie, která doprovází v určité míře i fyziologické stárnutí. Naše analýza na úrovni celého mozku potvrzuje nálezy z předchozích voxel-based QSM studií, které ukázaly, že vývoj kortikální magnetické susceptibility v průběhu stárnutí je nerovnoměrný (Acosta-Cabronero et al., 2016a; Betts et al., 2016a).

Nejsilnější vliv věku byl zaznamenán v oblastech zapojených do motorických, kognitivních a vizuálních funkcí, včetně area Rolandi, premotorické kůry, cerebelárního vermis, dorzolaterálního prefrontálního kortexu, insulárních oblastí, precuneu, cuneu, zadního cingula a linguálních a fusiformních gyrů. Tato zjištění jsou v souladu s přímým měřením koncentrace železa v post mortem tkáních (Hallgren & Sourander, 1958), což naznačuje, že železo významně přispívá k magnetické susceptibilitě v kůře.

Struktury, které akumulují železo v průběhu stárnutí, obsahují dopaminergní dráhy závislé na železe. Byla vyslovena hypotéza, že jak změny v obsahu železa, tak změny v dopaminergním přenosu, mohou být zodpovědné za změny chování během stárnutí (Acosta-Cabronero et al., 2016b; Persson et al., 2015)(Steiger et al., 2016).

V bílé hmotě je magnetická susceptibilita převážně ovlivněna diamagnetickým myelinem. Bylo zjištěno, že trajektorie magnetické susceptibility bílé hmoty prochází počátečním poklesem, dosahujícím minima mezi 25. a 45. rokem života. Po něm následuje zvýšení, které souvisí s dozráváním a rozpadem myelinu v průběhu normálního vývoje mozku (W. Li et al., 2014).

Zjistili jsme malý, ale statisticky signifikantní pozitivní vliv věku na magnetickou susceptibilitu celkové bílé hmoty, což koresponduje s předchozí studií (Milovic et al., 2021), která naznačuje, že susceptibilita ve většině oblastí bílé hmoty byla za tímto minimem ve zkoumané věkové skupině.

Prostřednictvím QSM analýzy na úrovni celého mozku jsme dále identifikovali oblasti bílé hmoty s mírnou negativní asociací mezi věkem a magnetickou susceptibilitou, což bylo doprovázeno snížením T2* relaxačních časů v těchto regionech. Jednalo se zejména o frontotemporální subkortikální oblast a rostrální corpus callosum. Tyto nálezy jsou v souladu s poznatkem, že myelin v těchto oblastech dozrává v pozdní dospělosti (Branson, 2013).

Tato studie má několik limitací. Zaprvé, jedná se o průřezovou studii, což neumožňuje přímou analýzu vývoje jednotlivých regionálních hodnot magnetické susceptibility v průběhu stárnutí. Pro potvrzení vztahu mezi stárnutím a magnetickou susceptibilitou bude nezbytná longitudinální studie.

Věkové spektrum subjektů v rozmezí 20-60 let nezahrnuje adolescenty a seniory, výsledky tak nelze zobecnit na celou populaci. Primárním cílem této studie bylo poskytnout referenční hodnoty pro pacienty s roztroušenou sklerózou, ale výsledky mohou být použity i pro jiná onemocnění s počátkem v dospělosti, např. Huntingtonovo onemocnění, Wilsonova choroba nebo neuromyelitis optica (Dezortova et al., 2020; Pudlac et al., 2020).

Magnetická susceptibilita je pouze zástupným ukazatelem koncentrace železa a je také ovlivněna jinými látkami, jako je např. diamagnetický myelin. Nicméně jasná shoda hodnot susceptibility s dříve publikovanými přímo naměřenými koncentracemi železa však poukazuje, že u struktur šedé hmoty mozkové je magnetická susceptibilita dominantně ovlivněna koncentrací železa a účinek myelinu je malý.

Tzv. voxel based analýza zahrnuje nerigidní deformaci anatomických struktur, aby odpovídala šabloně. To je neodmyslitelně spojeno s chybami, které mohou vést s falešně negativním asociacím souvisejícím s věkem pro některé oblasti mozku.

Závěrem, změny susceptibility jsou pravděpodobně ovlivněny nejen absolutním obsahem železa, ale také změnami relativní koncentrace železa, které jsou způsobeny sekundárně snížením objemu hodnocených struktur v souvislosti s věkem (Schweser et al., 2021b). Z této průřezové studie však nelze odvodit takto složité vztahy.

2.5 Závěr

Naše studie ukázala, že se železo ukládá ve specifických oblastech mozku během fyziologického stárnutí na základě různých vzorců. Nejvíce akumulují železo oblasti, které jsou zapojené do motorických, vizuálních a kognitivních funkcí. Lineární vzorec akumulace železa v průběhu fyziologického stárnutí v dospělosti je v bazálních gangliích a většině kortikálních oblastí. Na rozdíl od toho v thalamu, pulvinarech, precentrálních oblastech a v okcipito-temporálním kortexu, sleduje akumulace železa kvadratický nebo exponenciální vzorec.

Změny obsahu železa během stárnutí se odlišují v pulvinaru a ve zbytku thalamu. Z toho vyplývá výhodnost použití analýzy na úrovni celého mozku se segmentací subregionů thalamu a globus pallidus pro správné stanovení změny v akumulaci železa souvisejících s fyziologickým stárnutím či nemocí.

Stanovení odchylky změn koncentrace železa v mozku v průběhu stárnutí by mohly být užitečné při odhalování časných změn provázejících neurodegenerativní a neurozánětlivé procesy.

Hypotéza

Naše studie ukázala, že se železo během fyziologického stárnutí ukládá ve specifických oblastech mozku, a to na základě různých vzorců. Hypotéza byla potvrzena.

3 Longitudinální sledování pacientů s RS se zaměřením na kvantifikaci biomarkerů oxidačního stresu v mozkomíšním moku a séru a zkoumání jejich vztahu k mozkové atrofii a akumulaci železa v mozku na začátku onemocnění a za 2 roky

3.1 Úvod

Velkou výzvou pro management pacientů s RS je potřeba stratifikace pacientů na počátku nemoci a identifikace prediktorů progresu onemocnění a odpovědi na léčbu. V ČR je asi 20-25 tisíc pacientů, věk počátku nemoci se pohybuje nejčastěji mezi 20-40 lety, tedy se jedná spíše o mladší dospělé, kteří jsou pak na léčbě dlouhodobě. Překotný vývoj možností léčby, zejména léčby biologické, která patří mezi léčbu modifikující onemocnění využívanou k dlouhodobé stabilizaci onemocnění, cena za terapii a zároveň její nežádoucí účinky nás nutí hledat prediktivní biomarkery progresu onemocnění, které by umožnily posun k personalizované a efektivní terapii.

Cíl práce

Identifikace biomarkerů pro sledování a detekci časně progresu onemocnění, stratifikace pacientů s de novo diagnostikovanou RS, identifikace prediktorů progresu onemocnění a odpovědi na léčbu s využitím kvantitativní multiparametrické MR pro longitudinální sledování pacientů. V prospektivní studii jsme se zaměřili na kvantifikaci hladiny biomarkerů oxidačního stresu, antioxidační kapacity a stanovení lehkých řetězců neurofilament jako markeru neuroaxonální léze v mozkomíšním moku a séru u pacientů s nově diagnostikovanou RS a hledali jsme jejich souvislost s mozkovou atrofií a depozity železa v mozkové tkáni na počátku onemocnění a poté při kontrolním vyšetření za 2 roky.

Hypotéza

Oxidační stres se podílí na buněčném poškození již v časných fázích RS, což se může odrážet na zvýšených hladinách biomarkerů oxidačního stresu v likvoru a séru, a zvýšenou magnetickou susceptibilitou ve strukturách hluboké šedé hmoty mozkové společně s atrofií mozkové tkáně.

3.2 Materiál a metodika

Design studie a výběr subjektů

Naše studie byla prospektivní, longitudinální. Sběr dat probíhal ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze. Studie byla vedena v souladu s Helsinskou deklarací (revidovanou v roce 2013). Tato studie byla schválena etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (ID1018/17), všechny subjekty podepsali informovaný souhlas.

První částí studie (tzn. baseline vyšetření) se zúčastnilo 103 subjektů ve věkovém rozmezí 33 ± 9 let. Jednalo se o pacienty, kteří byli v období srpen 2017–leden 2020 nově diagnostikováni s onemocněním RS, před zahájením léčby. Tito pacienti podstoupili komplexní neurologická vyšetření, vč. určení tzv. Expanded Disability Status Scale (EDSS), MR mozku a odběr a vyhodnocení markerů v likvoru.

Kritéria pro zařazení do studie byla:

- věk nad 18 let,
- diagnóza RS stanovena na základě McDonaldových kritérií revidovaných v roce 2017.

Vylučovací kritéria byla následující:

- další závažná onemocnění či jiné zdravotní indispozice nebo abnormality na MR mozku, které by mohly ovlivnit zkoumané mozkové a míšní struktury,
- těhotenství v průběhu studie;

Jako zdravé kontroly byly použity dvě skupiny subjektů – jedna skupina pro MR mozku, druhá skupina pro porovnání biochemických změn v likvoru.

Zdravé kontroly MR mozku byly použity subjekty z předchozí studie, kteří reagovali na výzvu 1.LF UK a VFN v Praze, a zároveň splňovaly následující kritéria:

- ochotni podepsat informovaný souhlas v souladu s místními regulacemi;
- aby věkově odpovídaly jako kontroly pacientům ve studii RS).

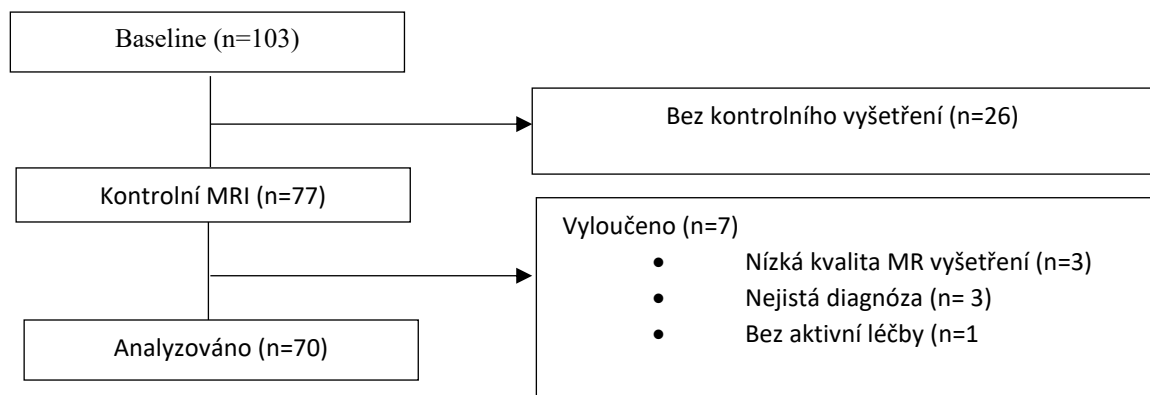
Vylučovací kritéria byla následující:

- nemožnost podstoupit vyšetření MR;
- nemožnost být vyšetřen čtyřikrát v průběhu následujících tří let v 0., 12., 24., a 36. měsíci;
- těhotenství v průběhu studie;
- jakákoli onemocnění či jiné zdravotní indispozice, nebo abnormality mozku na MR, které by mohly ovlivnit zkoumané mozkové a míšní struktury.

Z původní skupiny 111 subjektů jsme vybrali 99 s věkovým rozpětím, který odpovídal pacientům s RS.

Pro zdravé kontroly likvoru bylo použito 45 vzorků pacientů s neurologickým onemocněním nezánettivého charakteru, které byly vybrány z likvorové banky. Skupina těchto kontrol zahrnovala 37 pacientů s nezánettivým neurologickým onemocněním a 8 pacientů, kteří podstoupili spinální anestezii před urologickým zákrokem.

Z původního počtu 103 pacientů s de novo diagnostikovanou RS, v dalším průběhu studie 26 pacientů nepodstoupilo kontrolní MR vyšetření. Další 3 pacienti byli vyřazení pro nekvalitní MR zobrazení, 3 pacienti vyřazení pro nejistou diagnózu (susp. spektrum onemocnění typu neuromyelitis optica nebo překryv s nimi) a 1 pacient, protože neobdržel terapii modifikující onemocnění. Pro finální longitudinální analýzu nám zbylo 70 pacientů (Obrázek 24).



Obrázek 24. Flowchart studie.

Kontrolní MR vyšetření bylo provedeno v časovém rozmezí duben 2020 – únor 2022. Časové rozmezí mezi baseline a kontrolním vyšetřením, které zhruba odpovídalo i trvání samotného onemocnění, bylo 25,1 měsíce (IQR 24,4 – 26,2 měsíce). Z celkového počtu 70 pacientů bylo 48 žen a 22 mužů průměrného věku 31 (IQR 26–41) let.

Pacienti v mezidobí absolvovali léčbu modifikující onemocnění. Časové rozmezí mezi léčbou kortikosteroidy a MR vyšetřením bylo u všech pacientů delší než 30 dnů.

Zdravých kontrol bylo 58 taktéž s baseline a následným kontrolním vyšetřením v obdobném časovém intervalu.

Protokol MR

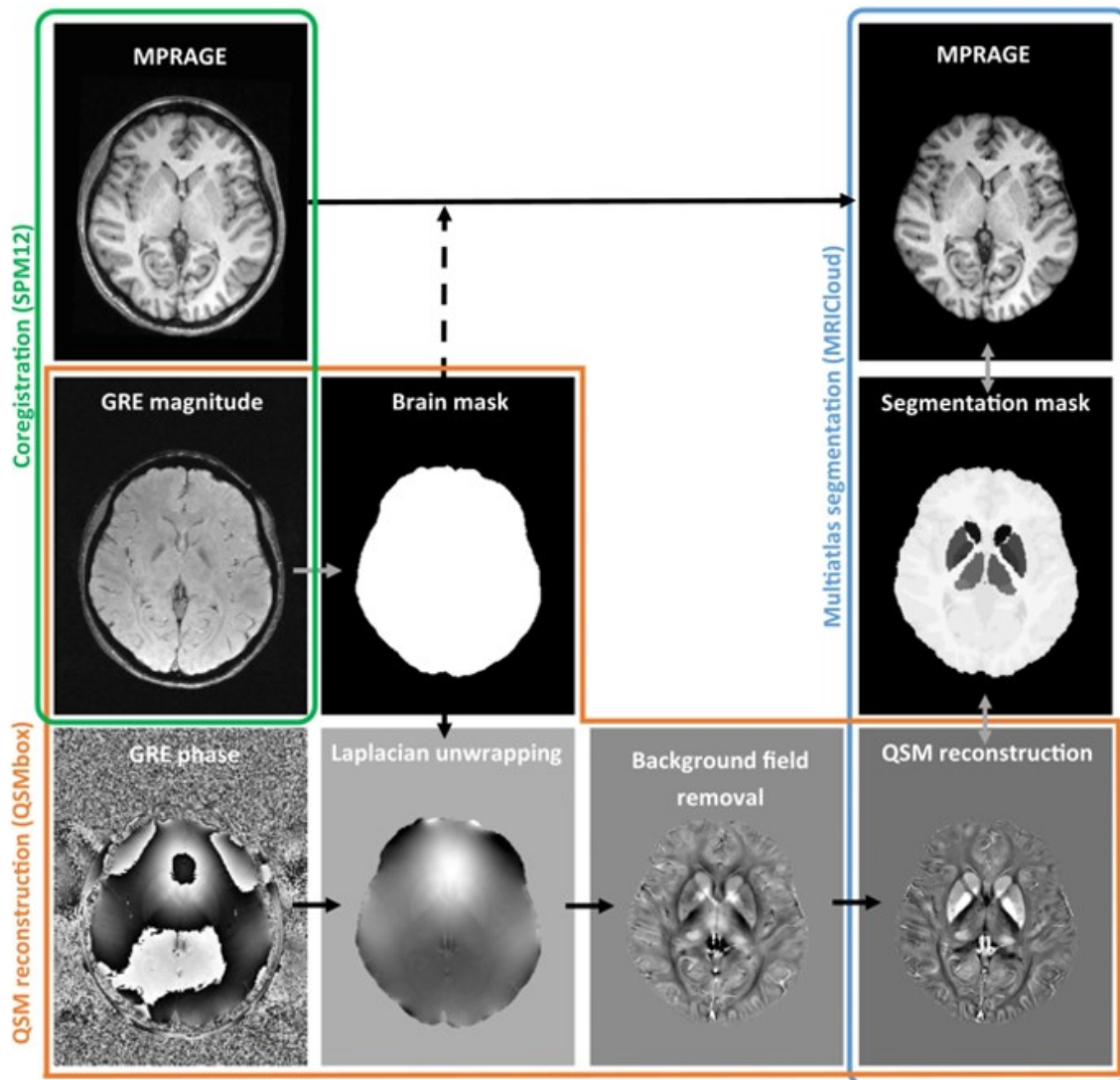
Vyšetření bylo provedeno nativně na 3T MR skeneru (Siemens Skyra 3T, Siemens Healthcare, Erlangen, Německo) s 20kanálovou hlavovou cívkou typu birdcage. Protokol MR zahrnoval následující sekvence: T1 vážené 3D snímky s magnetizační přípravou a rychlým gradientním echem (MPRAGE) (T1WI) v sagitální rovině s následujícími akvizičními parametry: opakovací čas (TR) 2300 ms; doba echa (TE) 2,96 ms; inverzní čas (TI) 900 ms; úhel překlopení (FA) 9°; zorné pole (FOV) 176x256x256 mm; prostorové rozlišení 1,0x1,0x1,0 mm³ pro anatomické zobrazování a segmentace, a 3D obrazy s kompenzací průtoku s gradientovým echem (GRE) v axiální rovině s následujícími akvizičními parametry: opakovací čas (TR) 33 ms; první doba echa (první TE) 4,5 ms, rovnoměrný odstup echa= 5 ms, poslední doba echa (poslední TE) 29,5 ms, počet ech 6; úhel překlopení (FA) 18°; zorné pole (FOV) 195x240x164 mm; prostorové rozlišení=0,94x0,94x0,94mm³ pro QSM. Akviziční parametry jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 3).

Tabulka 3: Akviziční parametry MR

sekvence	TR (ms)	TE (ms)	TI (ms)	FA (°)	FOV (mm)	prostorové rozlišení (mm ³)
T1 MPRAGE	2300	2,96	900	9	176x256x256	1,0x1,0x1,0
T2* GRE	33	první 4,5 poslední 29,5		18	195x240x164	0,94x0,94x0,94

Zpracování MR obrazů

Pro získání map QSM byly využity snímky GRE. Pro tento účel byl použit software QSMbox (<https://gitlab.com/acostaj/QSMbox>, přístup z 20.června 2022) (Acosta-Cabronero et al., 2018). Pro zpracování T1WI (MPRAGE) a jejich koregistraci byly použity softwary Statistické parametrické mapování (SPM12, verze 7771; <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>, zpřístupněno 1.února 2020) a Computational Anatomy Toolbox software (CAT 12, verze 12.8.1; www.neuro.uni-jena.de/cat12/, zpřístupněno 20.října 2020), běžící pod Matlab v.2022a (The Math Works, Inc., Natick, MA, USA). Nejdříve byly T1WI individuálně zbaveny šumu, prošly korekcí a pomocí CAT12 koregistrovány. Odpovídající FLAIR snímky byly následně registrovány podle T1WI a léze bílé hmoty segmentovány s použitím algoritmu predikce lézí v LST toolboxu verze 3.0.0 (www.statistical-modeling.de/lst.html, přístupný 1.června 2022) pro SMP. Výsledná mapa lézí byla použita jako maska aplikovaná na T1WI snímky (Schmidt et al., 2012). T1WI byly segmentovány pomocí CAT12 k získání celkových objemů šedé a bílé hmoty a frakce mozkového parenchymu (BPF). Následně byly snímky QSM převedeny do prostoru T1WI. Z T1WI byl odstraněn skelet lebky pomocí mozkové binární masky založené na SMP12, která byla vypočítána pomocí softwaru QSMbox. Koregistrované QSM a T1WI zbavené lebky byly poté vloženy do plně automatizované multiatlasové segmentace, využívající dvojí kontrast pro vymezení jader hluboké šedé hmoty mozkové, implementované v cloudové platformě (www.mricloud.org, přístupná z 30.října 2022) (Mori et al., 2016). Kvalita segmentace byla ověřena vyškoleným výzkumníkem, aby bylo zajištěno správné vykreslení struktur. Objemy ncl.caudatus, globus pallidus, putamen, thalamus, subthalamické jádro, ncl. rubber, ncl. dentatus byly určeny jakou součet bilaterálních struktur. Hodnoty magnetické susceptibility byly vztaženy k průměrné susceptibilitě celého mozku, aby se předešlo potencionálním zkreslením, která mohou být způsobena změnami susceptibility souvisejícími s onemocněním konkrétních anatomických oblastí nebo chybami při manuálním vykreslení skstruktur. K omezení vlivu zvýšené hladiny železa při současné atrofii struktur byla susceptibilita každé struktury vypočítána zvlášť násobením jejího objemu střední hodnotou susceptibility (Hernández-Torres et al., 2019; Schweser et al., 2021b). Ilustrace zpracování dat je znázorněna na obrázku (Obrázek 25).



Obrázek 25. Zpracování MR.

Analýza likvoru a séra

Likvor byl odebrán pouze při baseline vyšetření. Odběr se standardně prováděl z meziobratlových prostor L5/S1, L4/L5 nebo L3/L4 u pacientů vsedě ve vzpřímené poloze v ranních hodinách za sterilních podmínek. Byla použita 20G atraumatická jehla. Celkově bylo získáno 20ml likvoru. Z tohoto množství byl 1ml použit pro rutinní analýzu, která zahrnovala měření hladin albuminu a celkové hladiny proteinů v CSF, analýzu bílých krvinek, IgG indexu, oligoklonálních pásů a poměru albumin v CSF a séru. Souběžně s lumbální punkcí bylo odebráno 5ml krve. CSF a sérum byly okamžitě centrifugovány při rychlosti 3000 otáček za minutu po dobu 10 minut při teplotě 4°C. Supernatant byl následně rozdělen do alikvot a zmrazen při teplotě -80°. Pro analýzu CSF a séra byly vzorky po rozmrazení znovu centrifugovány a uchovávány na ledu. Všechny vzorky byly testovány v duplikátech.

Kromě běžných biochemických parametrů se navíc stanovovaly hladiny:

- 8-iso prostaglandin F2a (8-isoPG, 8-isoprostan)
- Lipokalin spojený s neutrofilní gelatinázou (NGAL, lipocalin-2)
- Peroxiredoxin-2 (PRDX2)
- Produkty peroxidace lipidů (malondialdehyd a 4-hydroxyalkenal, MDA + HAE)
- 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG)

8-iso prostaglandin F2a (8-isoPG, 8-isoprostan) Hodnoty 8-isoPG byly stanoven imunochemicky nekompetitivní ELISA metodou s biotinylovanou anti-humenní 8-isoPG protilátkou. Použita byla ELISA souprava pro lidský 8-iso prostaglandin (kat. č. MBS 160287, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA). Rozsah kalibrace byl od 0 do 640ng/l, přičemž byl lineárním ve všech hodnotách.

Lipokalin spojený s neutrofilní gelatinázou (NGAL, lipocalin-2) Koncentrace NGAL byly měřeny nekompetitivního ELISA- metodou (kat.č. MBS5644140, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA). Vzorky byly před analýzou 10x naředěny. Kalibrace se pohybovala od 0 do 10ng/ml a byla lineární v celém rozsahu.

Peroxiredoxin-2 (PRDX2): Hodnoty PRDX2 byly stanoveny pomocí nekompetitivní ELISA metody s biotinylovanou protilátkou pro humánnímu PRDX2 (kat.č. ELH-PRDX2, RayBiotech, Norcross, GA, USA). Vzorky byly před použitím 5x naředěny. Kalibrace se pohybovala od 0 do 12,8 ng/ml. Pro odhad koncentrací vzorků byla použita polynomická regrese 2.řádu.

Produkty peroxidace lipidů: Testování bylo provedeno kolorimetrickým testem na bázi N-methyl-2-fenylindolu (souprava Bioxytech LPO-586, kat. č. 21012, OXIS International, Inc., Foster City, CA, USA). V postupu pro současné stanovení malondialdehydu a 4-hydroxyalkenalů (MDA + HAE) byla jako kyselé rozpouštědlo použita kyselina methansulfonová. Vzorky pro test MDA+HAE byly stabilizovány butylovaným hydroxytoluenem (BHT; 20 μ l 0,2% BHT bylo přidáno do 200 μ l CSF bezprostředně po odběru vzorků, před zmrazením na -80°C). V testu byl jako kalibrátor použit tetramethoxypropan v koncentracích od 0 do 4 μ mol/l.

8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG): Byl testován kompetitivní ELISA metodou (Bioxytech 8-OHdG EIA Kit, kat.č. 21026 OXIS International, Inc., Foster City, CA, USA). Kalibrace byla provedena pro koncentrace 0,5 až 8 ng/ml a byla v tomto rozmezí lineární. U pacientů s RS byly vzorky CSF v dostatečném množství pro analýzu 8-OHdG, 8-isoPG, NGAL a PRDX2 dostupné u 62 pacientů a pro analýzu MDA + HAE u 37 pacientů.

Statistika

Baseline

Statistické zpracování dat bylo realizováno v softwaru SPSS (IBM, Armonk, NY). Analýza zahrnovala porovnání dichotomických a spojitých proměnných. K tomuto účelu byly využity různé statistické testy jako Fisherův test, t-test, Mann-Whitneyho test a zobecněný lineární model (GLM), v závislosti na distribuci dat. Pro identifikaci statisticky významných odlehklých hodnot byl použit Grubbův test s hranicí významnosti stanovenou na $p < 0,05$. V dalším kroku byly vypočteny parciální korelační koeficienty. Tyto koeficienty byly upraveny pro věk a pohlaví a sloužily k posouzení vztahů mezi biochemickými markery a objemy struktur hluboké šedé hmoty mozkové, jakož i hodnotami magnetické susceptibility. Tato analýza byla provedena u nově diagnostikovaných pacientů s RS a porovnávána se zdravými kontrolami. Hodnoty p byly upraveny podle věku a pohlaví. P -hodnota pod 0,05 byla považována za významnou.

Kontrolní vyšetření

Ve fázi prvního kontrolní vyšetření byla statistická analýza provedena s využitím softwaru SPSS 19 (IBM, Armonk, NY, USA) a programovacího jazyka R (R Core Team, Vienna, Austria). Pro porovnání proměnných byly aplikovány párový Wilcoxonův testu a Mann-Whitneyho test. Dále byly vypočteny Spearmanovy hodnotní korelační koeficienty, které byly upraveny s ohledem na věk a pohlaví účastníků, aby bylo možné posoudit vztahy mezi biochemickými markery a objemy struktur hluboké šedé hmoty mozkové a magnetickou susceptibilitou. Tyto koeficienty byly vypočítány pomocí funkce `pcor` v programovém jazyce R. Pro úpravu výsledků za účelem omezení family-wise chybovosti byla použita Bonferroniho korekce, také implementovaná v R. Binární multivariabilní analýza byla provedena pomocí dopředného modelu (forward model). Aby bylo možné efektivně porovnat kvantitativní analýzu mezi pacienty s RS a zdravými kontrolami, byly provedeny úpravy pro kompenzaci rozdílů v časových intervalech mezi základními a kontrolními vyšetřeními. Statistická významnost byla definovaná hranice hodnoty nižší než $p < 0,05$.

3.3 Výsledky

3.3.1 Baseline

Srovnání MR pacientů s RS a zdravými kontrolami

Mozková volumetrie a kvantifikace magnetické susceptibility ve strukturách hluboké šedé hmoty mozkové jsou uvedena v tabulce (Tabulka 4). Ve srovnání se zdravými kontrolami měli pacienti s RS nižší frakci mozkové tkáně ($p = 0,001$), menší objem thalamu ($p < 0,001$) a putamen ($p = 0,002$) a vyšší hodnoty magnetické susceptibility v ncl. caudatus ($p = 0,041$) a globus pallidus internus ($p = 0,015$).

Tabulka 4. Porovnání objemu a susceptibility ve strukturách hluboké mozkové šedi mezi pacienty s RS a zdravými kontrolami.

	MS ($n = 103$)		MRI Controls ($n = 99$)		<i>p</i> -Value
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	
Sex (male/female)	28/75		38/61		0.090
Age (years)	32.5	8.0	33.7	8.3	0.305
EDSS (median, IQR)	2	1.5–2.5	-	-	-
Lesion load (cm ³)	2.7	5.3	-	-	-
Lesion count (median, IQR)	7	4–20	-	-	-
Brain parenchymal fraction (%)	80.3	3.4	81.5	2.8	0.001
DGM Volumes (cm³)					
caudate	8.0	0.7	8.1	0.6	0.240
GPI	1.1	0.1	1.1	0.1	0.230
GPE	3.1	0.3	3.2	0.3	0.528
putamen	8.7	0.7	9.0	0.8	0.002
thalamus	9.6	0.6	9.9	0.6	<0.001
pulvinar	2.3	0.3	2.5	0.3	<0.001
subthalamic nucleus	0.3	0.1	0.4	0.1	0.310
substantia nigra	1.3	0.1	1.4	0.2	0.163
red nucleus	0.6	0.1	0.6	0.1	0.710
dentate	1.8	0.4	1.8	0.3	0.711
DGM Susceptibilities (ppb)					
Caudate	24.5	5.8	23.0	4.7	0.041
GPI	53.1	6.4	50.9	5.7	0.015
GPE	62.8	7.7	62.2	6.8	0.594
Putamen	23.6	6.7	23.6	6.1	0.977
Thalamus	0.9	2.3	1.0	2.0	0.728
Pulvinar	17.9	5.2	18.3	5.2	0.582
subthalamic nucleus	41.9	7.3	43.2	6.9	0.214
substantia nigra	53.4	7.3	52.2	6.6	0.099
red nucleus	39.2	7.8	39.7	8.1	0.639
Dentate	37.4	8.6	36.9	9.8	0.693

Srovnání biochemických markerů u pacientů s RS a zdravých kontrol

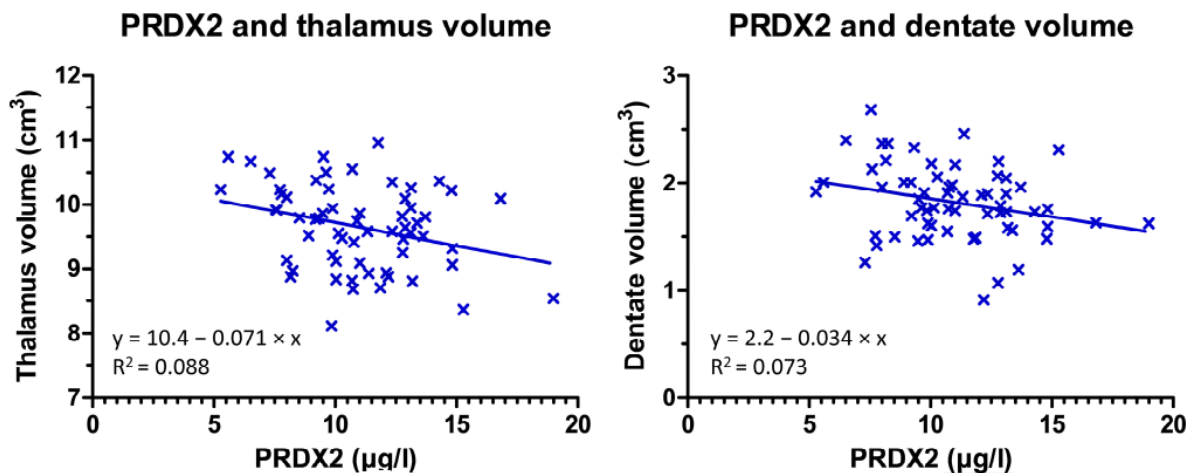
CSF byl dostupný u 62 nově diagnostikovaných pacientů s RS. Kontrolní skupina byla starší ve srovnání s pacienty s RS (33 ± 9 vs. 40 ± 12 let, $p < 0,001$). Pacienti s RS měli vyšší hodnoty 8-OHdG ($p = 0,041$), PRDX2 ($p = 0,015$) a lipoperoxičních markerů (MDA + HAE; $p = 0,009$) ve srovnání se zdravými kontrolami (Tabulka 5).

Tabulka 5. Srovnání biochemických markerů v likvoru mezi pacienty s RS a zdravými kontrolami

	MS ($n = 62$)		CSF Controls ($n = 45$)		<i>p</i> -Value
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	
Sex (male/female)	19/43		20/25		0.143
Age (years)	33.3	8.6	40.2	11.6	<0.001
CSF sampling to MRI interval (months)	1.1	3.9	n.d.	n.d.	n.d.
Cerebrospinal Fluid Analysis					
8-OHdG (ng/mL)	0.112 (median = 0)	0.310 (IQR = 0 to 0)	0.026 (median = 0)	0.122 (IQR = 0 to 0)	0.041 ¹
8-isoPG (ng/L)	44.319	13.611	41.071	9.679	0.447
NGAL (ng/mL)	4.366	2.085	4.968	2.226	0.473
PRDX2 (ng/mL)	10.966	2.961	9.437	3.945	0.015
MDA + HAE (μ mol/L)	0.605 ²	0.264 ²	0.448	0.153	0.003

Korelace mezi biochemickými markery v CSF a MR parametry

U pacientů s RS byly korelace mezi parametry CSF a MR slabé až středně silné. Z parametrů MR s významnými rozdíly mezi skupinami RS a zdravými kontrolami byly parametry CSF významně spojeny pouze se změnami magnetické susceptibility ncl. caudatu a objemu thalamu. Hladina 8-isoPG negativně korelovala s magnetickou susceptibilitou v globus pallidus externus. Hladina NGAL negativně korelovala se susceptibilitou a objemem thalamu a susceptibilitou a objemem ncl. dentatus (Obrázek 26).



Obrázek 26. Regresní křivky ukazují negativní korelaci mezi PRDX2 a objemem thalamu (vlevo) a objemem dentata (vlevo).

Mezi markery lipoperoxidace a objemem globus pallidus a subthalamického jádra byla negativní korelace (Tabulka 6). Žádný z biochemických markerů nebyl významně spojen s objemem lézí T2, počtem lézí nebo EDSS.

Tabulka 6. Parciální korelační koeficienty mezi biochemickými markery a objemy nebo susceptibilitou hluboké mozkové šedi.

Structure	8-OHdG		8-isoPG		NGAL		PRDX2		MDA + HAE	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Volume										
caudate	0.017	0.899	-0.147	0.271	-0.170	0.195	-0.236	0.069	-0.328	0.055
globus pallidus int.	0.175	0.181	-0.020	0.879	0.039	0.765	-0.005	0.971	-0.459	0.006
globus pallidus ext.	0.195	0.136	-0.199	0.134	-0.081	0.539	-0.083	0.529	-0.433	0.009
putamen	0.115	0.380	0.022	0.869	-0.137	0.297	-0.069	0.602	-0.008	0.963
thalamus	0.074	0.575	-0.028	0.833	-0.045	0.733	-0.341	0.008	0.025	0.886
pulvinar thalami	0.129	0.328	0.036	0.786	-0.067	0.613	-0.240	0.064	0.020	0.909
subthalamic nucleus	0.032	0.806	-0.189	0.155	0.008	0.950	0.011	0.934	-0.374	0.027
substantia nigra	0.002	0.990	-0.115	0.391	-0.145	0.268	-0.112	0.393	-0.229	0.187
red nucleus	0.046	0.724	-0.152	0.256	-0.036	0.786	-0.034	0.795	-0.299	0.081
dentate	-0.014	0.916	-0.097	0.471	-0.292	0.023	-0.291	0.024	-0.261	0.130
Susceptibility										
caudate	-0.283	0.026	-0.098	0.450	0.009	0.942	-0.042	0.747	0.200	0.234
globus pallidus int	0.029	0.821	-0.141	0.276	0.120	0.352	0.124	0.339	0.207	0.220
globus pallidus ext	-0.037	0.777	-0.276	0.030	0.017	0.894	0.097	0.452	0.283	0.089
putamen	-0.396	0.001	-0.095	0.462	0.031	0.808	-0.058	0.654	0.213	0.205
thalamus	0.139	0.280	0.103	0.426	-0.055	0.669	-0.099	0.446	-0.088	0.603
pulvinar thalami	-0.172	0.181	-0.016	0.900	-0.129	0.317	-0.245	0.055	0.024	0.888
subthalamic nucleus	-0.141	0.275	-0.215	0.093	0.016	0.899	0.092	0.476	0.285	0.088
substantia nigra	-0.101	0.433	-0.107	0.407	0.052	0.686	0.190	0.139	0.296	0.076
red nucleus	-0.309	0.015	-0.075	0.561	0.016	0.904	-0.010	0.941	0.295	0.077
dentate	-0.067	0.604	-0.154	0.231	-0.314	0.013	-0.293	0.021	0.011	0.947

3.3.2 První kontrola

V průběhu sledovaného období mezi základním vyšetřením a prvním kontrolním vyšetřením byl u pacientů s RS pozorován pokles frakce mozkové tkáně. Byl zaznamenán statisticky významný pokles objemu jak v celkové bílé hmotě mozkové, tak i v šedé hmotě, zejména v ncl. caudatus, thalamu, substantia nigra a putamen. Současně bylo zjištěno významné zvýšené střední hodnoty magnetické susceptibility v ncl. caudatus, globus pallidus, putamen a ncl. dentatus, zatímco v thalamu došlo k poklesu. I po korekci k atrofii zůstaly změny magnetické susceptibility signifikantní ve všech jmenovaných jádrech kromě ncl. dentatus (Tabulka 6). U 19 pacientů došlo ke zvýšení skóre EDSS v porovnání s baseline vyšetřením, které bylo provedeno před dvěma roky. Binární multivariační analýza, zahrnující kvantitativní MR a biochemické hodnoty, neposkytla významný prediktivní model pro pochopení změn v EDSS.

Při longitudinálním sledování byly zjištěny podobné změny v lokálních objemech a susceptibilitách u zdravých kontrol, jako u pacientů s RS. Ve srovnání se zdravými kontrolami, u pacientů s RS byla zaznamenána výraznější atrofie thalamu a celkového

objemu bílé hmoty, stejně jako významnější nárůst susceptibility v ncl. caudatus, putamen a globus pallidus a výraznější pokles susceptibility v thalamu (Tabulka 7).

Tabulka 7. Změny objemu a magnetické susceptibility struktur hluboké šedi mozkové a celého mozku v porovnání mezi pacienty s RS a zdravými kontrolami.

	MS patients		Healthy controls		p
	Change	IQR	change	IQR	
Volume [%]					
Caudate	-0.82	-2.13 to 0.05	-0.4	-0.79 to 0	0.069
Putamen	-0.62	-2.72 to 0.6	-0.56	-1.04 to -0.16	0.71
Globus pallidus	-0.01	-1.1 to 1.64	0.31	-0.09 to 1	0.26
Thalamus	-1.52	-2.42 to -0.41	-0.46	-0.79 to -0.12	<0.0001
Subthalamic nucleus	-0.49	-4.18 to 3.15	0.07	-1.19 to 2.3	0.14
Substantia nigra	-1.11	-3.98 to 1.15	-0.25	-1.5 to 0.53	0.16
Red nucleus	-0.52	-3.31 to 2.27	0.01	-1.28 to 0.96	0.18
Dentate	-0.21	-1.7 to 1.21	0.01	-0.67 to 1.15	0.17
Total grey matter	-0.59	-1.27 to -0.06	-0.38	-0.65 to -0.19	0.075
Total white matter	-0.61	-1.31 to -0.11	-0.03	-0.21 to 0.14	<0.0001
Brain parenchymal fraction [%]	-0.59	-1.24 to -0.16	-0.22	-0.37 to -0.09	0.0004
Susceptibility [ppb]					
Caudate	0.53	-0.15 to 0.98	0.19	-0.06 to 0.4	0.032
Putamen	0.62	0.09 to 1.11	0.33	0.08 to 0.64	0.018
Globus pallidus	0.29	-0.24 to 1.2	0.04	-0.34 to 0.46	0.027
Thalamus	-0.25	-0.58 to 0.02	-0.09	-0.22 to 0.05	0.0071
Subthalamic nucleus	0.04	-0.92 to 1.14	0.12	-0.69 to 0.68	0.77
Substantia nigra	0.26	-0.96 to 1.35	0.1	-0.62 to 0.61	0.31
Red nucleus	-0.08	-1.04 to 0.83	0.24	-0.18 to 0.8	0.15
Dentate	0.34	-0.22 to 1.07	0.17	-0.08 to 0.54	0.35
Susceptibility mass [ppb·cm³] ¹⁾					
Caudate	2.22	-1.84 to 6.46	0.79	-1.36 to 2.75	0.16
Putamen	3.94	-0.66 to 7.35	1.88	-0.69 to 4.64	0.066
Globus pallidus	2.91	-1.64 to 6.79	1.13	-1.03 to 4.71	0.17
Thalamus	-2.77	-6.06 to 0.57	-1.02	-2.04 to 0.58	0.0094
Subthalamic nucleus	0.02	-0.55 to 0.46	0.05	-0.29 to 0.48	0.35
Substantia nigra	-0.74	-2.64 to 2.36	0.44	-1.24 to 1.77	0.21
Red nucleus	-0.29	-0.97 to 0.79	0.25	-0.25 to 0.79	0.012
Dentate	0.61	-1.1 to 2.35	1.00	-0.26 to 2.29	0.17

Při korelaci magnitudy změn (objem, susceptibilita) u pacientů s RS s úrovní biochemických parametrů zaznamenaných na počátku studie, byly zjištěny pozitivní asociace mezi snížením frakce mozkového parenchymu a úbytkem objemu bílé hmoty a thalamu s vyššími hladinami Nfl v mozkomíšním moku a séru (Tabulka 6). Dále bylo zjištěno, že nižší hladiny PRDX2 v likvoru na začátku studie byly spojeny s větším nárůstem magnetické susceptibility v substantia nigra. Stejně tak nižší hladiny MDA+HAE v mozkomíšním moku

na počátku studie korelovaly s větším nárůstem magnetické susceptibility v ncl. dentatus (Tabulka 6).

3.4 Diskuze

3.4.1 Baseline

V této studii jsme zjistili, že pacienti s de novo diagnostikovanou RS vykazují vyšší magnetickou susceptibilitu v ncl. caudatus a globus pallidus internus než u zdravých kontrol, což je v souladu s nadměrnou akumulací železa u pacientů s RS. Tito pacienti mají vyšší hladiny markerů oxidačního stresu v CSF, což koreluje se susceptibilitou a objemem struktur hluboké šedé hmoty mozkové.

Vybrané markery oxidačního stresu v CSF

Peroxiredoxiny, přesněji PRDX2. Tento protein je primárně exprimována v astrocytech, přičemž jeho výraznější přítomnost byla zaznamenána v okrajových oblastech lézí lézích RS (Voigt et al., 2017). V naší studii bylo pozorováno, že zvýšené hladiny PRDX2 v CSF u pacientů s RS korelují se stupněm zánětu a oxidačního stresu. Ačkoli PRDX2 má ochrannou roli proti oxidačnímu poškození neuronů a zánětlivému postižení, jeho zvýšené hladiny v CSF mohou být vnímány jako negativní prognostický marker, odrážející probíhající oxidační stres. Negativní korelace mezi PRDX2 a objemem thalamu tak může indikovat přispění oxidačního stresu k atrofii thalamu u pacientů s RS, což je také silný prediktor progresu disability (Solomon et al., 2017).

8-hydroxy-2-deoxyguanosin (8-OHdG). Tento marker je známý jako hlavní produkt oxidativního poškození DNA. V naší studii byly zjištěny vyšší koncentrace 8-OHdG v CSF u nově diagnostikovaných pacientů s RS, což podporuje teorii, že je oxidativní poškození DNA spojeno s rozvojem RS.

Isoprostan 8-iso-PGF2 α . Tento biomarker slouží jako indikátor peroxidace lipidů (Miller et al., 2014; Mir et al., 2014). Předchozí studie již zaznamenaly zvýšené hladiny 8-isoPG v likvoru u pacientů s RS, přičemž byla prokázána korelace mezi zvýšenými hladinami tohoto biomarkeru a stupněm závažnosti onemocnění (Lam et al., 2016; Mir et al., 2014). Domníváme se, že neprokázání vztahu mezi hladinami 8-isoPG a dalšími markery v CSF a EDSS v naší studii je pravděpodobně způsobeno časnou fází a velmi mírným stupněm závažnosti onemocnění naší skupiny pacientů RS.

Lipocalin asociovaný s neutrofilní gelatinázou. Tento biomarker hraje roli v různých zánětlivých drahách. V naší studii jsme nezaznamenali významné rozdíly v hladinách NGAL mezi pacienty s RS a zdravými kontrolami. Byla však zjištěna negativní korelace hladin NGAL s magnetickou susceptibilitou v ncl. dentatus. Tyto rozdílné nálezy mohou být důsledkem rozdílů v metodách měření železa. Zvýšená magnetická susceptibilita u pacientů s RS, která se liší od výsledků získaných pomocí relaxometrie R2*, může odrážet nejen akumulaci železa, ale také demyelinizaci. Tento faktor může ovlivnit analýzy asociací mezi NGAL a dalšími vyšetřovanými parametry v CSF a železem ve strukturách hluboké šedé hmoty mozkové. Kromě toho může široké spektrum účinků NGAL přispívat k jeho různým patogenetickým vlivům v závislosti na stadiu onemocnění. Tyto účinky zahrnují indukci smrti neuronových buněk, modulaci koncentrace železa a jeho ukládání v buňkách, což je jeden z rysů neurodegenerace u RS, jak již dříve ukázala naše studijní skupina (Burgetova et al., 2017; Pudlac et al., 2020) a další (Khalil et al., 2015).

Malondialdehyd i hydroxyalkenaly. Jedná se o markery peroxidace lipidů (Ayala et al., 2014a). Zjistili jsme vyšší hladiny MDA+HAE v CSF u pacientů s RS ve srovnání se zdravými kontrolami a souvislost s menším objemem globus pallidus internus, globus pallidus externus a subthalamického jádra. Přesto jsme v naší kohortě pacientů s RS nenašli významnou atrofii těchto struktur. Toto zjištění tak může být v souladu s prodromální neurodegenerací globus pallidus a subthalamického jádra u podskupiny pacientů s RS se zvýšenou peroxidací lipidů. Na druhou stranu nebyla pozorována žádná souvislost mezi MDA-HAE a hladinami železa, což by hovořilo proti teorii, že paramagnetické železo měřené pomocí QSM se přímo podílí na ferroptóze.

V souladu s předchozími studiemi naše MR data ukazují, že pacienti s nově diagnostikovanou RS již mají atrofii thalamu, pulvinaru a putamen (Andravizou et al., 2019). Ncl. caudatus a globus pallidus vykazují signifikantně vyšší magnetickou susceptibilitu u pacientů s RS, což souvisí s akumulací železa v těchto strukturách (Burgetova et al., 2010). Dále jsme prokázali, že zvýšená susceptibilita v globus pallidus u nově diagnostikovaných RS je řízena zejména změnami ve vnitřním pallidu.

Naše studie má určité limitace. Zvýšení hladiny 8-OHdG, PRDX2, MDA + HAE v CSF může být také způsobeno narušením hematoencefalické bariéry a nejen jejích zvýšeným obsahem v CSF z důvodu samotného onemocnění. Kromě toho jsou známy cirkadiální fluktuace hladin zkoumaných biomarkerů v CSF. Na druhou stranu byly lumbální punkce prováděny v obdobnou denní dobu, což by mělo tento účinek omezit. Magnetická susceptibilita je sice markerem koncentrace železa, ale ovlivňují ji i další látky, jako je např.

myelin. V neposlední řadě, ačkoliv byl věkový rozdíl mezi pacienty s RS a kontrolami CSF významný, žádnou věkovou závislost parametrů CSF jsme nezaznamenali, a upravili jsme statistické analýzy podle věku tam, kde to bylo vhodné.

3.4.2 První kontrola

V této longitudinální studii jsme prokázali významnou atrofii thalamických jader a bílé hmoty mozkové, spolu s akumulací železa ve striatu a globus pallidus u pacientů v časně fázi RS ve srovnání se zdravými kontrolami. Žádná z těchto abnormalit nekorelovala s markery oxidačního stresu v CSF. Ztráta objemu bílé hmoty a thalamu byla však pozitivně korelována se zvýšením hladin NfL v CSF a séru při baseline vyšetření. Přestože se celkově magnetická susceptibilita na úrovni skupiny neměnila, zvýšení magnetické susceptibiliti v substantia nigra a ncl. dentatus korelovalo s nižšími základními hladinami PRDX2 a produktů peroxidace lipidů (MDA + HAE) u pacientů s RS.

Naše studie také potvrzuje dřívější zjištění o globální atrofii šedé a bílé hmoty mozkové spolu s atrofií thalamu a striata u pacientů RS mezi baseline vyšetřením a kontrolním vyšetřením za 2 roky (Hänninen et al., 2020). Z těchto změn byla významná zejména ztráta objemu thalamu a bílé hmoty v porovnání s fyziologickým stárnutím. Tato neurodegenerativní složka onemocnění RS byla již dříve považována jako silný prediktivní faktor pro budoucí dysfunkci kognice a disability (Bergsland et al., 2021; Rocca et al., 2021).

Významným biomarkerem, který předpovídá atrofii mozkové tkáně a může pomoci identifikovat pacienty s vyšším rizikem progresu onemocnění, se ukázal být NfL v CSF a séru (Martin et al., 2019; Steffen et al., 2023; Uher et al., 2020; Ziemssen et al., 2022). Konkrétněji byla silná korelace mezi základními hodnoty NfL a atrofií thalamu, jak již bylo popsáno dříve (van Lierop et al., 2022). Thalamus je jeden z prvních mozkových struktur, kde lze u pacientů s RS pozorovat snížení objemu, a jeho atrofie má silnou klinickou korelaci s prognózou disability (Hänninen et al., 2020; Zivadinov et al., 2022). Jakimovsky et al. uvedli souvislost mezi vyššími hladinami NfL a nižší perfuzí thalamu. Tyto změny perfuze, stejně jako atrofie, mohou být přičteny k patofyziologickým mechanismům RS (Jakimovski et al., 2019).

V rámci naší studie bylo pozorováno zvýšení magnetické susceptibiliti ve strukturách hluboké šedé hmoty mozkové u pacientů s RS, nejvíce v ncl. caudatus, putamen a globus pallidus. Tento nárůst magnetické susceptibiliti byl významnější než změny zaznamenané u zdravých kontrol během sledovacího období. Toto pozorování podporuje předchozí studie o zvýšené magnetické susceptibilitě nebo zvýšeném T2* relaxačním času v bazálních gangliích, což se dá interpretovat jako důsledek zvýšené akumulace železa (Bagnato et al.,

2011; Hagemeyer et al., 2018). Vzestup magnetické susceptibility byl patrný i po korekci na atrofii, což naznačuje, že zvýšené hladiny železa nejsou způsobeny pouze atrofií samotnou (Schweser et al., 2021b). Nejpravděpodobněji byl tento jev způsoben kombinací influxu paramagnetického železa během neurodegenerace a současně ztrátou paramagnetického myelinu. Histopatologické studie ukazují, že železo je primárně uloženo v oligodendrocytech a myelinových vláknech, odkud je uvolněno při demyelinizaci (Burgetova et al., 2017; Langkammer et al., 2012). Naopak v thalamu byl u pacientů s RS zaznamenán pokles magnetické susceptibility ve srovnání se zdravými kontrolami. Tento nálezn je v souladu s dřívějšími studiemi a naznačuje rozdílnou patofyziologii thalamu v kontextu RS (Bagnato et al., 2011; Hagemeyer et al., 2018).

Výsledky naší longitudinální studie nepotvrzují hypotézu, že markery oxidačního stresu v CSF by mohly předpovídat ztrátu objemu nebo akumulaci železa v mozkových strukturách postižených u pacientů s RS. Přestože je oxidační stres obecně považován za klíčový faktor v demyelinizaci a axonálním poškození u RS, a očekávalo by se, že se tyto změny projeví zvýšením hladin antioxidantních enzymů, jako je glutathionperoxidaza, peroxiredoxin nebo zvýšené markery peroxidace lipidů (Ghonimi et al., 2021; Haider et al., 2011; Voigt et al., 2017; S.-Y. Zhang et al., 2020), v naší studii jsme tuto korelaci nezaznamenali. V naší předchozí cross-sekční studii na této kohortě pacientů s RS byly pozorovány zvýšené hladiny PRDX2 v CSF, což korelovalo s atrofií thalamu. Tento nálezn zdůraznil možnou roli antioxidantních cytoprotektivních enzymů v reakci na záněť (Burgetova et al., 2022; Uzawa et al., 2020). Nedostatečná asociace mezi PRDX2 a dalšími markery oxidativního stresu se stupněm ztráty objemu struktur mozkové tkáně v longitudinální studii může být teoreticky zapříčiněna pozitivním efektem protizánětlivé terapie (Haider et al., 2011; Keles et al., 2001).

Významná asociace mezi markery oxidativního stresu a magnetickou susceptibilitou byla prokázána v substantia nigra a ncl. dentatus. Tyto struktury byly v předchozích studiích o RS zkoumány pouze okrajově. Je zajímavé, že bylo popsáno několik sítí susceptibility v mozkových strukturách s nezávislou regulací homeostázy železa během stárnutí, která se liší u zdravých jedinců a jedinců s RS (Maciejczyk et al., 2018). Naše zjištění, že selektivní asociace mezi markery oxidačního stresu a zvýšením magnetické susceptibility, byla pozorována pouze v podskupině struktur hluboké šedé hmoty mozkové, podporují teorii, že akumulace železa v mozku je řízena několika nezávislými mechanismy. Zejména negativní korelace PRDX2 s akumulací železa v substantia nigra, která však v průběhu dvou let nebyla výrazně zvýšena na úrovni celé skupiny v naší studii, je významným nálezem. V jiné studii

byla prokázána zvýšená akumulace železa v substantia nigra, což navrhovalo to, že může docházet k akumulaci železa v této struktuře u RS pacientů, kteří mají nízké hladiny PRDX2 v CSF (Andravizou et al., 2019). PRDX2 je vysoce reaktivní peroxidáza s cytoprotektivní funkcí. V mozku je dominantně exprimována v astrocytech bílé hmoty, a její největší koncentrace byly pozorovány v periférii demyelinizačních lézí bílé hmoty (Moezzi et al., 2022) To naznačuje, že PRDX2 může mít protektivní efekt proti akumulaci železa v substantia nigra, což je aspekt, jehož role v patogenezi RS by mohla být podceňována. Recentní studie navíc naznačují, že zejména únava, která je častým příznakem RS, je specificky asociovaná s aktivací mikroglíí v substantia nigra (Singhal et al., 2020) Můžeme pouze spekulovat o důvodech, proč ze všech zkoumaných markerů oxidačního stresu byla pouze PRDX2 asociovaná s obsahem železa v substantia nigra.

V ncl. dentatus magnetická susceptibilita negativně korelovala s baseline hladinami MDA + HAE. Toto pozorování je v souladu s dřívějšími studiemi, které popisovaly strukturální změny ncl. dentatus u pacientů s RS, včetně redukce aferentních synapsí a reakce astroglíí (Albert et al., 2017)MDA + HAE, jako markery peroxidace lipidů, jsou obzvláště relevantní v mozkové tkáni s vysokou spotřebou kyslíku a vysokou koncentrací nenasycených mastných kyselin (Ayala et al., 2014b)Peroxidace lipidů je navíc i součástí procesu demyelinizace (Ferretti & Bacchetti, 2011). V tomto kontextu je inverzní vztah mezi zvýšenou magnetickou suseptibilitou v ncl. dentatus, která může být důsledkem jak akumulace železa, tak nadměrné demyelinizace, a baseline hladinami MDA + HAE kontraintuitivní (Ghonimi et al., 2021). Tento náleznaznačuje potřebu dalších výzkumů pro potvrzení a lepší pochopení vztahů mezi peroxidací lipidů, akumulací železa, poškozením myelinu a reparačními procesy u pacientů s RS.

Naše studie má několik limitací. Nezjišťovali jsme dynamiku biomarkerů v CSF při kontrolních vyšetřeních v léčbě z důvodu neochoty pacientů podstoupit další lumbální punkci. Zároveň se jedná o invazivní vyšetření, které jsme po pacientech ani vyžadovat nemohli. Ztráta subjektů ve studii v porovnání s baseline vyšetřením (25%) snižuje výpovědní hodnotu. Dva roky jsou relativně krátká doba ke zhodnocení progresu onemocnění. Nemohli jsme identifikovat prediktory disability, jelikož u sledovaných subjektů nedošlo v průběhu těchto dvou let k výraznějšímu zhoršení klinického stavu. Pacienti s RS byli mladší než zdravé kontroly. Tato bias je nicméně zmírněna longitudinálním designem studie. V neposlední řadě, časový interval mezi MR vyšetřeními byl u zdravých kontrol delší než u pacientů s RS.

3.5 Závěr

3.5.1 Baseline

Již pacienti s nově diagnostikovanou RS vykazují atrofii thalamu, pulvinaru thalamu a putamen, spolu se zvýšenou akumulací železa v ncl. caudatus a globus pallidus internus. Přítomnost zvýšených hladin PRDX2, MDA + HAE a 8-OHdG v CSF mohou naznačovat roli oxidačního stresu v patogenezi RS. Korelace mezi hladinami PRDX2 a sníženým objemem thalamu, stejně jako mezi 8-OHdG a zvyšující se magnetickou susceptibilitou v ncl. caudatus zdůrazňují souvislost mezi neuroinflamací, oxidačním stresem a ztrátou tkáně u RS. Tyto nálezy naznačují, že PRDX2 a 8-OHdG mohou sloužit jako biomarkery ve výzkumu RS, zejména v kontextu longitudinálních studií. Z důvodu potencionálního významu těchto biomarkerů oxidačního stresu pro predikci a monitorování průběhu RS, stejně jako pro hodnocení reakce na terapii, je nezbytné provést další výzkum v této oblasti.

3.5.2 První kontrola

Hladiny NfL (neurofilament light chain) v séru a mozkomíšním moku, které jsou považovány za biomarkery axonálního poškození, mohou předpovídat brzký pokles frakce mozkového parenchymu. Tento pokles souvisí především s atrofií thalamu a ztrátou objemu bílé hmoty. Markery oxidačního stresu v likvoru nebyly spojeny s úbytkem tkáně ani s poruchami metabolismu železa ve striatu, globus pallidus nebo thalamu, což naznačuje, že oxidační stres nemá v raném stadiu RS u léčených pacientů primární roli v progresi onemocnění. Snížení hladiny PRDX2 v likvoru koreluje s akumulací železa v substantia nigra a snížené hladiny MDA+HAE v likvoru korelují s akumulací železa v ncl. dentatus. Tyto nálezy poukazují na rozdílné mechanismy akumulace železa v těchto mozkových strukturách, které mohou být spojeny s oxidačním stresem. Identifikace nových biomarkerů aktivity onemocnění, které by predikovaly progresi RS, je klíčová pro lepší porozumění patofyziologie tohoto onemocnění a má potenciál vylepšit strategii léčby pro pacienty.

Hypotéza

Přestože je oxidační stres obecně považován za klíčový faktor v demyelinizaci a axonálním poškození u pacientů s RS, výsledky naší longitudinální studie překvapivě nepotvrdily hypotézu, že oxidační stres hraje významnou roli v časně progresi onemocnění u

léčených pacientů s RS a že markery oxidačního stresu v CSF by mohly předpovídat ztrátu objemu nebo akumulaci železa v mozkových strukturách postižených u pacientů s RS. Hypotéza byla zamítnuta.

4 Souhrn

Tato práce se zaměřuje na využití pokročilých zobrazovacích technik magnetické rezonance (MR) jako neinvazivních metod pro sledování přirozeného stárnutí mozku a progresu roztroušené sklerózy (RS) v korelaci s klinickými a biochemickými markery. Výzkum zahrnuje dvě kohorty: zdravé subjekty a pacienty s nově diagnostikovanou RS, kteří jsou sledováni longitudinálně.

Výsledky ukazují, že v průběhu stárnutí, stejně jako u pacientů s nově diagnostikovanou RS, dochází v mozkových strukturách k akumulaci železa a atrofii. Významné rozdíly byly zaznamenány při srovnání zdravé populace s pacienty s RS, přičemž tyto změny vykazují korelaci s biochemickými markery oxidativního stresu a klinickou progresí onemocnění.

Naše výsledky ukázaly, že již u nově diagnostikovaných pacientů s RS dochází k větší akumulaci železa a atrofii mozku v porovnání se zdravými subjekty, což se nadále zvýraznilo po 2 letech sledování. To naznačuje, že mozek pacientů s RS, ačkoliv dobře léčených, stárne rychleji, a že MR může sloužit jako citlivý marker pro sledování a detekci časně progresu onemocnění. Prokázali jsme prediktivní hodnotu hladin NfL v likvoru a séru, které předpovídaly budoucí úbytek mozkové tkáně. Naopak se nepotvrdil předpoklad, že oxidační stres hraje významnou roli v časně progresu onemocnění u léčených pacientů s RS.

Summary

This work focuses on the use of advanced magnetic resonance imaging (MRI) techniques as non-invasive methods for monitoring physiological brain aging and the progression of multiple sclerosis (MS) in correlation with clinical and biochemical markers. The research includes two cohorts: healthy volunteers and newly diagnosed MS patients, who are followed longitudinally.

The results indicate that during aging, as well as in newly diagnosed MS patients, there is an accumulation of iron and atrophy in brain structures. Significant differences were observed when comparing the healthy population with MS patients, with these changes correlating with biochemical markers of oxidative stress and clinical disease progression.

Our results showed that newly diagnosed MS patients already exhibit greater iron accumulation and brain atrophy compared to healthy subjects, which became more pronounced after 2 years of follow-up. This suggests that the brains of MS patients, even those well-treated, age faster and that MRI can serve as a sensitive marker for monitoring and detecting early disease progression. We demonstrated the predictive value of NfL levels in cerebrospinal fluid and serum, which predicted future brain tissue loss. On the other hand, the assumption that oxidative stress plays a significant role in the early progression of the disease in treated MS patients was not confirmed.

Literatura

- Acosta-Cabronero, J., Betts, M. J., Cardenas-Blanco, A., Yang, S., & Nestor, P. J. (2016a). *In Vivo* MRI Mapping of Brain Iron Deposition across the Adult Lifespan. *The Journal of Neuroscience*, *36*(2), 364–374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1907-15.2016>
- Acosta-Cabronero, J., Betts, M. J., Cardenas-Blanco, A., Yang, S., & Nestor, P. J. (2016b). *In Vivo* MRI Mapping of Brain Iron Deposition across the Adult Lifespan. *The Journal of Neuroscience*, *36*(2), 364–374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1907-15.2016>
- Acosta-Cabronero, J., Milovic, C., Mattern, H., Tejos, C., Speck, O., & Callaghan, M. F. (2018). A robust multi-scale approach to quantitative susceptibility mapping. *NeuroImage*, *183*, 7–24. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.07.065>
- Albert, M., Barrantes-Freer, A., Lohrberg, M., Antel, J. P., Prineas, J. W., Palkovits, M., Wolff, J. R., Brück, W., & Stadelmann, C. (2017). Synaptic pathology in the cerebellar dentate nucleus in chronic multiple sclerosis. *Brain Pathology*, *27*(6), 737–747. <https://doi.org/10.1111/bpa.12450>
- Al-Radaideh, A., Athamneh, I., Alabadi, H., & Hbahbih, M. (2019). Cortical and Subcortical Morphometric and Iron Changes in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis and Their Association with White Matter T2 Lesion Load. *Clinical Neuroradiology*, *29*(1), 51–64. <https://doi.org/10.1007/s00062-017-0654-0>
- Andravizou, A., Dardiotis, E., Artemiadis, A., Sokratous, M., Siokas, V., Tsouris, Z., Aloizou, A.-M., Nikolaidis, I., Bakirtzis, C., Tsivgoulis, G., Deretzi, G., Grigoriadis, N., Bogdanos, D. P., & Hadjigeorgiou, G. M. (2019). Brain atrophy in multiple sclerosis: mechanisms, clinical relevance and treatment options. *Autoimmunity Highlights*, *10*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13317-019-0117-5>
- Aquino, D., Bizzi, A., Grisoli, M., Garavaglia, B., Bruzzone, M. G., Nardocci, N., Savoiardo, M., & Chiapparini, L. (2009). Age-related Iron Deposition in the Basal Ganglia: Quantitative Analysis in Healthy Subjects. *Radiology*, *252*(1), 165–172. <https://doi.org/10.1148/radiol.2522081399>
- Avants, B., Tustison, N. J., & Song, G. (2009). Advanced Normalization Tools: V1.0. *The Insight Journal*. <https://doi.org/10.54294/uvnhin>

- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014a). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014b). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bagnato, F., Hametner, S., Yao, B., van Gelderen, P., Merkle, H., Cantor, F. K., Lassmann, H., & Duyn, J. H. (2011). Tracking iron in multiple sclerosis: a combined imaging and histopathological study at 7 Tesla. *Brain*, 134(12), 3602–3615. <https://doi.org/10.1093/brain/awr278>
- Beard, J. L., Connor, J. R., & Jones, B. C. (2009). Iron in the Brain. *Nutrition Reviews*, 51(6), 157–170. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1993.tb03096.x>
- Bergsland, N., Benedict, R. H. B., Dwyer, M. G., Fuchs, T. A., Jakimovski, D., Schweser, F., Tavazzi, E., Weinstock-Guttman, B., & Zivadinov, R. (2021). Thalamic Nuclei Volumes and Their Relationships to Neuroperformance in Multiple Sclerosis: A Cross-Sectional Structural <scp>MRI</scp> Study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 53(3), 731–739. <https://doi.org/10.1002/jmri.27389>
- Bergsland, N., Tavazzi, E., Laganà, M. M., Baglio, F., Cecconi, P., Viotti, S., Zivadinov, R., Baselli, G., & Rovaris, M. (2017). White Matter Tract Injury is Associated with Deep Gray Matter Iron Deposition in Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroimaging*, 27(1), 107–113. <https://doi.org/10.1111/jon.12364>
- Betts, M. J., Acosta-Cabronero, J., Cardenas-Blanco, A., Nestor, P. J., & Düzel, E. (2016a). High-resolution characterisation of the aging brain using simultaneous quantitative susceptibility mapping (QSM) and R2* measurements at 7 T. *NeuroImage*, 138, 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.05.024>
- Betts, M. J., Acosta-Cabronero, J., Cardenas-Blanco, A., Nestor, P. J., & Düzel, E. (2016b). High-resolution characterisation of the aging brain using simultaneous quantitative susceptibility mapping (QSM) and R2* measurements at 7 T. *NeuroImage*, 138, 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.05.024>

- Bilgic, B., Pfefferbaum, A., Rohlfing, T., Sullivan, E. V., & Adalsteinsson, E. (2012). MRI estimates of brain iron concentration in normal aging using quantitative susceptibility mapping. *NeuroImage*, *59*(3), 2625–2635. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.08.077>
- Branson, H. M. (2013). Normal Myelination. *Neuroimaging Clinics of North America*, *23*(2), 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2012.12.001>
- Burgetova, A., Dusek, P., Uher, T., Vaneckova, M., Vejrazka, M., Burgetova, R., Horakova, D., Srpova, B., Krasensky, J., & Lambert, L. (2022). Oxidative Stress Markers in Cerebrospinal Fluid of Newly Diagnosed Multiple Sclerosis Patients and Their Link to Iron Deposition and Atrophy. *Diagnostics*, *12*(6), 1365. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061365>
- Burgetova, A., Dusek, P., Vaneckova, M., Horakova, D., Langkammer, C., Krasensky, J., Sobisek, L., Matras, P., Masek, M., & Seidl, Z. (2017). Thalamic Iron Differentiates Primary-Progressive and Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *American Journal of Neuroradiology*, *38*(6), 1079–1086. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5166>
- Burgetova, A., Seidl, Z., Krasensky, J., Horakova, D., & Vaneckova, M. (2010). Multiple Sclerosis and the Accumulation of Iron in the Basal Ganglia: Quantitative Assessment of Brain Iron Using MRI T₂* Relaxometry. *European Neurology*, *63*(3), 136–143. <https://doi.org/10.1159/000279305>
- Callaghan, M. F., Freund, P., Draganski, B., Anderson, E., Cappelletti, M., Chowdhury, R., Diedrichsen, J., FitzGerald, T. H. B., Smittenaar, P., Helms, G., Lutti, A., & Weiskopf, N. (2014). Widespread age-related differences in the human brain microstructure revealed by quantitative magnetic resonance imaging. *Neurobiology of Aging*, *35*(8), 1862–1872. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.008>
- Castellaro, M., Magliozzi, R., Palombit, A., Pitteri, M., Silvestri, E., Camera, V., Montemezzi, S., Pizzini, F. B., Bertoldo, A., Reynolds, R., Monaco, S., & Calabrese, M. (2017). Heterogeneity of Cortical Lesion Susceptibility Mapping in Multiple Sclerosis. *American Journal of Neuroradiology*, *38*(6), 1087–1095. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5150>

- Connor, J. R., & Benkovic, S. A. (1992). Iron regulation in the brain: Histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Annals of Neurology*, *32*(S1), S51–S61. <https://doi.org/10.1002/ana.410320710>
- Connor, J. R., Menzies, S. L., Martin, S. M. St., & Mufson, E. J. (1990). Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *Journal of Neuroscience Research*, *27*(4), 595–611. <https://doi.org/10.1002/jnr.490270421>
- Dal-Bianco, A., Grabner, G., Kronnerwetter, C., Weber, M., Kornek, B., Kasprian, G., Berger, T., Leutmezer, F., Rommer, P. S., Trattinig, S., Lassmann, H., & Hametner, S. (2021). Long-term evolution of multiple sclerosis iron rim lesions in 7 T MRI. *Brain*, *144*(3), 833–847. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa436>
- Daugherty, A. M., Haacke, E. M., & Raz, N. (2015). Striatal Iron Content Predicts Its Shrinkage and Changes in Verbal Working Memory after Two Years in Healthy Adults. *The Journal of Neuroscience*, *35*(17), 6731–6743. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4717-14.2015>
- Daugherty, A., & Raz, N. (2013). Age-related differences in iron content of subcortical nuclei observed in vivo: A meta-analysis. *NeuroImage*, *70*, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.12.040>
- de Rochefort, L., Liu, T., Kressler, B., Liu, J., Spincemaille, P., Lebon, V., Wu, J., & Wang, Y. (2010). Quantitative susceptibility map reconstruction from MR phase data using bayesian regularization: Validation and application to brain imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, *63*(1), 194–206. <https://doi.org/10.1002/mrm.22187>
- Deoni, S. C. L. (2010). Quantitative Relaxometry of the Brain. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, *21*(2), 101–113. <https://doi.org/10.1097/RMR.0b013e31821e56d8>
- Dezortova, M., Lescinskij, A., Dusek, P., Herynek, V., Acosta-Cabronero, J., Bruha, R., Jiru, F., Robinson, S. D., & Hajek, M. (2020). Multiparametric Quantitative Brain MRI in Neurological and Hepatic Forms of Wilson’s Disease. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, *51*(6), 1829–1835. <https://doi.org/10.1002/jmri.26984>
- Doğan, H. O., & Yildiz, Ö. K. (2019). Serum NADPH oxidase concentrations and the associations with iron metabolism in relapsing remitting multiple sclerosis. *Journal of*

Trace Elements in Medicine and Biology, 55, 39–43.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.011>

- Dringen, R., Bishop, G. M., Koeppe, M., Dang, T. N., & Robinson, S. R. (2007). The Pivotal Role of Astrocytes in the Metabolism of Iron in the Brain. *Neurochemical Research*, 32(11), 1884–1890. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9375-0>
- Dusek, P., Dezortova, M., & Wuerfel, J. (2013). *Imaging of Iron* (pp. 195–239). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410502-7.00010-7>
- Elkady, A. M., Cobzas, D., Sun, H., Blevins, G., & Wilman, A. H. (2017). Progressive iron accumulation across multiple sclerosis phenotypes revealed by sparse classification of deep gray matter. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 46(5), 1464–1473. <https://doi.org/10.1002/jmri.25682>
- Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.*, 65(0), 899–910. <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>
- Ferretti, G., & Bacchetti, T. (2011). Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 311(1–2), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.09.004>
- Fujiwara, E., Kmech, J. A., Cobzas, D., Sun, H., Seres, P., Blevins, G., & Wilman, A. H. (2017). Cognitive Implications of Deep Gray Matter Iron in Multiple Sclerosis. *American Journal of Neuroradiology*, 38(5), 942–948. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5109>
- Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., & Youdim, M. B. H. (1994). Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases? *Journal of Neurochemistry*, 63(3), 793–807. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63030793.x>
- Gerlach, M., Youdim, M. B. H., & Riederer, P. (2000). Brain Iron and other Trace Metals in Neurodegenerative Diseases. In *Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders* (pp. 259–276). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1269-1_25
- Ghadery, C., Pirpamer, L., Hofer, E., Langkammer, C., Petrovic, K., Loitfelder, M., Schwingenschuh, P., Seiler, S., Duering, M., Jouvent, E., Schmidt, H., Fazekas, F., Mangin, J.-F., Chabriat, H., Dichgans, M., Ropele, S., & Schmidt, R. (2015). R2*

mapping for brain iron: associations with cognition in normal aging. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 925–932. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.013>

- Ghonimi, N. A. M., Elsharkawi, K. A., Khyal, D. S. M., & Abdelghani, A. A. (2021). Serum malondialdehyde as a lipid peroxidation marker in multiple sclerosis patients and its relation to disease characteristics. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 51, 102941. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.102941>
- Gong, N.-J., Wong, C.-S., Hui, E. S., Chan, C.-C., & Leung, L.-M. (2015). Hemisphere, gender and age-related effects on iron deposition in deep gray matter revealed by quantitative susceptibility mapping. *NMR in Biomedicine*, 28(10), 1267–1274. <https://doi.org/10.1002/nbm.3366>
- Govindarajan, V., de Rivero Vaccari, J. P., & Keane, R. W. (2020). Role of inflammasomes in multiple sclerosis and their potential as therapeutic targets. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 260. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01944-9>
- Haacke, E. M., Miao, Y., Liu, M., Habib, C. A., Katkuri, Y., Liu, T., Yang, Z., Lang, Z., Hu, J., & Wu, J. (2010). Correlation of putative iron content as represented by changes in R2* and phase with age in deep gray matter of healthy adults. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 32(3), 561–576. <https://doi.org/10.1002/jmri.22293>
- Hagemeyer, J., Dwyer, M. G., Bergsland, N., Schweser, F., Magnano, C. R., Heininen-Brown, M., Ramasamy, D. P., Carl, E., Kennedy, C., Melia, R., Polak, P., Deistung, A., Geurts, J. J. G., Reichenbach, J. R., & Zivadinov, R. (2013). Effect of Age on MRI Phase Behavior in the Subcortical Deep Gray Matter of Healthy Individuals. *American Journal of Neuroradiology*, 34(11), 2144–2151. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3569>
- Hagemeyer, J., Zivadinov, R., Dwyer, M. G., Polak, P., Bergsland, N., Weinstock-Guttman, B., Zalis, J., Deistung, A., Reichenbach, J. R., & Schweser, F. (2018). Changes of deep gray matter magnetic susceptibility over 2 years in multiple sclerosis and healthy control brain. *NeuroImage: Clinical*, 18, 1007–1016. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.04.008>
- Haider, L., Fischer, M. T., Frischer, J. M., Bauer, J., Hoftberger, R., Botond, G., Esterbauer, H., Binder, C. J., Witztum, J. L., & Lassmann, H. (2011). Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*, 134(7), 1914–1924. <https://doi.org/10.1093/brain/awr128>

- Hallgren, B., & Sourander, P. (1958). THE EFFECT OF AGE ON THE NON-HAEMIN IRON IN THE HUMAN BRAIN. *Journal of Neurochemistry*, 3(1), 41–51. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1958.tb12607.x>
- Hänninen, K., Viitala, M., Paavilainen, T., Karhu, J. O., Rinne, J., Koikkalainen, J., Lötjönen, J., & Soilu-Hänninen, M. (2020). Thalamic Atrophy Predicts 5-Year Disability Progression in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00606>
- Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(4), 273–300. <https://doi.org/10.1080/10715769900300851>
- Hernández-Torres, E., Wiggermann, V., Machan, L., Sadovnick, A. D., Li, D. K. B., Traboulsee, A., Hametner, S., & Rauscher, A. (2019). Increased mean R2* in the deep gray matter of multiple sclerosis patients: Have we been measuring atrophy? *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 50(1), 201–208. <https://doi.org/10.1002/jmri.26561>
- Huhdanpaa, H., Hwang, D. H., Gasparian, G. G., Booker, M. T., Cen, Y., Lerner, A., Boyko, O. B., Go, J. L., Kim, P. E., Rajamohan, A., Law, M., & Shiroishi, M. S. (2014). Image Coregistration: Quantitative Processing Framework for the Assessment of Brain Lesions. *Journal of Digital Imaging*, 27(3), 369–379. <https://doi.org/10.1007/s10278-013-9655-y>
- Hurrell, R., & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1461S-1467S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674F>
- Jakimovski, D., Kuhle, J., Ramanathan, M., Barro, C., Tomic, D., Hagemeyer, J., Kropshofer, H., Bergsland, N., Leppert, D., Dwyer, M. G., Michalak, Z., Benedict, R. H. B., Weinstock-Guttman, B., & Zivadinov, R. (2019). Serum neurofilament light chain levels associations with gray matter pathology: a 5-year longitudinal study. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 6(9), 1757–1770. <https://doi.org/10.1002/acn3.50872>
- Jhelum, P., Santos-Nogueira, E., Teo, W., Haumont, A., Lenoël, I., Stys, P. K., & David, S. (2020). Ferroptosis Mediates Cuprizone-Induced Loss of Oligodendrocytes and Demyelination. *The Journal of Neuroscience*, 40(48), 9327–9341. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1749-20.2020>

- Joliot, M., Jobard, G., Naveau, M., Delcroix, N., Petit, L., Zago, L., Crivello, F., Mellet, E., Mazoyer, B., & Tzourio-Mazoyer, N. (2015). AICHA: An atlas of intrinsic connectivity of homotopic areas. *Journal of Neuroscience Methods*, 254, 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.07.013>
- Kajarabille, & Latunde-Dada. (2019). Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4968. <https://doi.org/10.3390/ijms20194968>
- Kalpouzou, G., Garzón, B., Sitnikov, R., Heiland, C., Salami, A., Persson, J., & Bäckman, L. (2017). Higher Striatal Iron Concentration is Linked to Frontostriatal Underactivation and Poorer Memory in Normal Aging. *Cerebral Cortex*, 27(6), 3427–3436. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx045>
- Katsarou, A., & Pantopoulos, K. (2020). Basics and principles of cellular and systemic iron homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 75, 100866. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100866>
- Katz, D., Taubenberger, J. K., Cannella, B., McFarlin, D. E., Raine, C. S., & McFarland, H. F. (1993). Correlation between magnetic resonance imaging findings and lesion development in chronic, active multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 34(5), 661–669. <https://doi.org/10.1002/ana.410340507>
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6)
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akçay, F. (2001). Effect of Corticosteroid Therapy on Serum and CSF Malondialdehyde and Antioxidant Proteins in Multiple Sclerosis. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 28(2), 141–143. <https://doi.org/10.1017/S0317167100052823>
- Khalil, M., Langkammer, C., Pichler, A., Pinter, D., Gattringer, T., Bachmaier, G., Ropele, S., Fuchs, S., Enzinger, C., & Fazekas, F. (2015). Dynamics of brain iron levels in multiple sclerosis. *Neurology*, 84(24), 2396–2402. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001679>
- Khalil, M., Renner, A., Langkammer, C., Enzinger, C., Ropele, S., Stojakovic, T., Scharnagl, H., Bachmaier, G., Pichler, A., Archelos, J., Fuchs, S., Seifert-Held, T., & Fazekas, F.

- (2016). Cerebrospinal fluid lipocalin 2 in patients with clinically isolated syndromes and early multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 22(12), 1560–1568. <https://doi.org/10.1177/1352458515624560>
- Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle – 70 years later. *Redox Report*, 6(4), 229–234. <https://doi.org/10.1179/135100001101536373>
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1–2), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.004>
- Lam, M. A., Maghzal, G. J., Khademi, M., Piehl, F., Ratzler, R., Romme Christensen, J., Sellebjerg, F. T., Olsson, T., & Stocker, R. (2016). Absence of systemic oxidative stress and increased CSF prostaglandin F_{2α} in progressive MS. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 3(4). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000256>
- Langkammer, C., Bredies, K., Poser, B. A., Barth, M., Reishofer, G., Fan, A. P., Bilgic, B., Fazekas, F., Mainero, C., & Ropele, S. (2015). Fast quantitative susceptibility mapping using 3D EPI and total generalized variation. *NeuroImage*, 111, 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.02.041>
- Langkammer, C., Krebs, N., Goessler, W., Scheurer, E., Ebner, F., Yen, K., Fazekas, F., & Ropele, S. (2010). Quantitative MR Imaging of Brain Iron: A Postmortem Validation Study. *Radiology*, 257(2), 455–462. <https://doi.org/10.1148/radiol.10100495>
- Langkammer, C., Schweser, F., Krebs, N., Deistung, A., Goessler, W., Scheurer, E., Sommer, K., Reishofer, G., Yen, K., Fazekas, F., Ropele, S., & Reichenbach, J. R. (2012). Quantitative susceptibility mapping (QSM) as a means to measure brain iron? A post mortem validation study. *NeuroImage*, 62(3), 1593–1599. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.05.049>
- Li, J., Cao, F., Yin, H., Huang, Z., Lin, Z., Mao, N., Sun, B., & Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death & Disease*, 11(2), 88. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>
- Li, W., Wu, B., Batrachenko, A., Bancroft-Wu, V., Morey, R. A., Shashi, V., Langkammer, C., De Bellis, M. D., Ropele, S., Song, A. W., & Liu, C. (2014). Differential developmental trajectories of magnetic susceptibility in human brain gray and white

matter over the lifespan. *Human Brain Mapping*, 35(6), 2698–2713. <https://doi.org/10.1002/hbm.22360>

- Li, X., Chen, L., Kuttan, K., Ceritoglu, C., Li, Y., Kang, N., Hsu, J. T., Qiao, Y., Wei, H., Liu, C., Miller, M. I., Mori, S., Yousem, D. M., van Zijl, P. C. M., & Faria, A. V. (2019). Multi-atlas tool for automated segmentation of brain gray matter nuclei and quantification of their magnetic susceptibility. *NeuroImage*, 191, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.02.016>
- Liu, C., Li, W., Tong, K. A., Yeom, K. W., & Kuzminski, S. (2015). Susceptibility-weighted imaging and quantitative susceptibility mapping in the brain. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 42(1), 23–41. <https://doi.org/10.1002/jmri.24768>
- Liu, C., Wei, H., Gong, N.-J., Cronin, M., Dibb, R., & Decker, K. (2015a). Quantitative Susceptibility Mapping: Contrast Mechanisms and Clinical Applications. *Tomography*, 1(1), 3–17. <https://doi.org/10.18383/j.tom.2015.00136>
- Liu, C., Wei, H., Gong, N.-J., Cronin, M., Dibb, R., & Decker, K. (2015b). Quantitative Susceptibility Mapping: Contrast Mechanisms and Clinical Applications. *Tomography*, 1(1), 3–17. <https://doi.org/10.18383/j.tom.2015.00136>
- Liu, M., Liu, S., Ghassaban, K., Zheng, W., Diccio, D., Miao, Y., Habib, C., Jazmati, T., & Haacke, E. M. (2016). Assessing global and regional iron content in deep gray matter as a function of age using susceptibility mapping. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 44(1), 59–71. <https://doi.org/10.1002/jmri.25130>
- Lopez, J. A., Denkova, M., Ramanathan, S., Dale, R. C., & Brilot, F. (2021). Pathogenesis of autoimmune demyelination: from multiple sclerosis to neuromyelitis optica spectrum disorders and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease. *Clinical & Translational Immunology*, 10(7). <https://doi.org/10.1002/cti2.1316>
- Lorio, S., Lutti, A., Kherif, F., Ruef, A., Dukart, J., Chowdhury, R., Frackowiak, R. S., Ashburner, J., Helms, G., Weiskopf, N., & Draganski, B. (2014). Disentangling in vivo the effects of iron content and atrophy on the ageing human brain. *NeuroImage*, 103, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.09.044>
- Maciejczyk, M., Żebrowska, E., Zalewska, A., & Chabowski, A. (2018). Redox Balance, Antioxidant Defense, and Oxidative Damage in the Hypothalamus and Cerebral Cortex

of Rats with High Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/6940515>

Martin, S.-J., McGlasson, S., Hunt, D., & Overell, J. (2019). Cerebrospinal fluid neurofilament light chain in multiple sclerosis and its subtypes: a meta-analysis of case–control studies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(9), 1059–1067. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-319190>

Miller, E., Morel, A., Saso, L., & Saluk, J. (2014). Isoprostanes and Neuroprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/572491>

Milovic, C., Prieto, C., Bilgic, B., Uribe, S., Acosta-Cabronero, J., Irarrazaval, P., & Tejos, C. (2021). Comparison of parameter optimization methods for quantitative susceptibility mapping. *Magnetic Resonance in Medicine*, 85(1), 480–494. <https://doi.org/10.1002/mrm.28435>

Mir, F., Lee, D., Ray, H., & Sadiq, S. A. (2014). CSF isoprostane levels are a biomarker of oxidative stress in multiple sclerosis. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 1(2). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000021>

Moezzi, D., Dong, Y., Jain, R. W., Lozinski, B. M., Ghorbani, S., D’Mello, C., & Wee Yong, V. (2022). Expression of antioxidant enzymes in lesions of multiple sclerosis and its models. *Scientific Reports*, 12(1), 12761. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16840-w>

Mori, S., Wu, D., Ceritoglu, C., Li, Y., Kolasny, A., Vaillant, M. A., Faria, A. V., Oishi, K., & Miller, M. I. (2016). MRICloud: Delivering High-Throughput MRI Neuroinformatics as Cloud-Based Software as a Service. *Computing in Science & Engineering*, 18(5), 21–35. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2016.93>

Ning, N., Liu, C., Wu, P., Hu, Y., Zhang, W., Zhang, L., Li, M., Gho, S., Kim, D., Guo, H., Yang, J., & Jin, C. (2019). Spatiotemporal variations of magnetic susceptibility in the deep gray matter nuclei from 1 month to 6 years: A quantitative susceptibility mapping study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 49(6), 1600–1609. <https://doi.org/10.1002/jmri.26579>

Paty, D. W., Li, D. K. B., Oger, J. J.-F., Kastrukoff, L., Koopmans, R., Tanton, E., & Zhao, G. J. (1994). Magnetic resonance imaging in the evaluation of clinical trials in multiple

sclerosis. *Annals of Neurology*, 36(S1), S95–S96.
<https://doi.org/10.1002/ana.410360721>

Persson, N., Wu, J., Zhang, Q., Liu, T., Shen, J., Bao, R., Ni, M., Liu, T., Wang, Y., & Spincemaille, P. (2015). Age and sex related differences in subcortical brain iron concentrations among healthy adults. *NeuroImage*, 122, 385–398.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.07.050>

Peterson, E. T., Kwon, D., Luna, B., Larsen, B., Prouty, D., De Bellis, M. D., Voyvodic, J., Liu, C., Li, W., Pohl, K. M., Sullivan, E. V., & Pfefferbaum, A. (2019). Distribution of brain iron accrual in adolescence: Evidence from cross-sectional and longitudinal analysis. *Human Brain Mapping*, 40(5), 1480–1495. <https://doi.org/10.1002/hbm.24461>

Pfefferbaum, A., Adalsteinsson, E., Rohlfing, T., & Sullivan, E. V. (2009). MRI estimates of brain iron concentration in normal aging: Comparison of field-dependent (FDRI) and phase (SWI) methods. *NeuroImage*, 47(2), 493–500.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.05.006>

Pudlac, A., Burgetova, A., Dusek, P., Nytrova, P., Vaneckova, M., Horakova, D., Krasensky, J., & Lambert, L. (2020). Deep Gray Matter Iron Content in Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis. *BioMed Research International*, 2020, 1–6.
<https://doi.org/10.1155/2020/6492786>

Ramos, P., Santos, A., Pinto, N. R., Mendes, R., Magalhães, T., & Almeida, A. (2014). Iron levels in the human brain: A post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(1), 13–17.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.08.001>

Rocca, M. A., Valsasina, P., Meani, A., Gobbi, C., Zecca, C., Rovira, A., Sastre-Garriga, J., Kearney, H., Ciccarelli, O., Matthews, L., Palace, J., Gallo, A., Biseco, A., Lukas, C., Bellenberg, B., Barkhof, F., Vrenken, H., Preziosa, P., Filippi, M., ... Yousry, T. (2021). Association of Gray Matter Atrophy Patterns With Clinical Phenotype and Progression in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 96(11).
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011494>

Roskams, A. J. I., & Connor, J. R. (1994). Iron, Transferrin, and Ferritin in the Rat Brain During Development and Aging. *Journal of Neurochemistry*, 63(2), 709–716.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63020709.x>

- Rouault, T. A., & Cooperman, S. (2006). Brain Iron Metabolism. *Seminars in Pediatric Neurology*, 13(3), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2006.08.002>
- Sadrzadeh, S. M. H., & Saffari, Y. (2004). Iron and Brain Disorders. *Pathology Patterns Reviews*, 121(suppl_1), S64–S70. <https://doi.org/10.1309/EW0121LG9N3N1YL4>
- Schenck, J. F. (2003). Magnetic resonance imaging of brain iron. *Journal of the Neurological Sciences*, 207(1–2), 99–102. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(02\)00431-8](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(02)00431-8)
- Schipper, H. M. (2004). Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing. *Ageing Research Reviews*, 3(3), 265–301. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.02.001>
- Schipper, H. M. (2012). Neurodegeneration with brain iron accumulation — Clinical syndromes and neuroimaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(3), 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.06.016>
- Schmalbrock, P., Prakash, R. S., Schirda, B., Janssen, A., Yang, G. K., Russell, M., Knopp, M. V., Boster, A., Nicholas, J. A., Racke, M., & Pitt, D. (2016). Basal Ganglia Iron in Patients with Multiple Sclerosis Measured with 7T Quantitative Susceptibility Mapping Correlates with Inhibitory Control. *American Journal of Neuroradiology*, 37(3), 439–446. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4599>
- Schmidt, P., Gaser, C., Arsic, M., Buck, D., Förchler, A., Berthele, A., Hoshi, M., Ilg, R., Schmid, V. J., Zimmer, C., Hemmer, B., & Mühlau, M. (2012). An automated tool for detection of FLAIR-hyperintense white-matter lesions in Multiple Sclerosis. *NeuroImage*, 59(4), 3774–3783. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.11.032>
- Schweser, F., Deistung, A., Lehr, B. W., & Reichenbach, J. R. (2011). Quantitative imaging of intrinsic magnetic tissue properties using MRI signal phase: An approach to in vivo brain iron metabolism? *NeuroImage*, 54(4), 2789–2807. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.10.070>
- Schweser, F., Deistung, A., & Reichenbach, J. R. (2016). Foundations of MRI phase imaging and processing for Quantitative Susceptibility Mapping (QSM). *Zeitschrift Für Medizinische Physik*, 26(1), 6–34. <https://doi.org/10.1016/j.zemedi.2015.10.002>
- Schweser, F., Hagemeyer, J., Dwyer, M. G., Bergsland, N., Hametner, S., Weinstock-Guttman, B., & Zivadinov, R. (2021a). Decreasing brain iron in multiple sclerosis: The

difference between concentration and content in iron <scp>MRI</scp>. *Human Brain Mapping*, 42(5), 1463–1474. <https://doi.org/10.1002/hbm.25306>

Schweser, F., Hagemeier, J., Dwyer, M. G., Bergsland, N., Hametner, S., Weinstock-Guttman, B., & Zivadinov, R. (2021b). Decreasing brain iron in multiple sclerosis: The difference between concentration and content in iron <scp>MRI</scp>. *Human Brain Mapping*, 42(5), 1463–1474. <https://doi.org/10.1002/hbm.25306>

Singhal, T., Cicero, S., Pan, H., Carter, K., Dubey, S., Chu, R., Glanz, B., Hurwitz, S., Tauhid, S., Park, M.-A., Kijewski, M., Stern, E., Bakshi, R., Silbersweig, D., & Weiner, H. L. (2020). Regional microglial activation in the substantia nigra is linked with fatigue in MS. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 7(5). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000854>

Siotto, M., Filippi, M. M., Simonelli, I., Landi, D., Ghazaryan, A., Vollaro, S., Ventriglia, M., Pasqualetti, P., Rongioletti, M. C. A., Squitti, R., & Vernieri, F. (2019). Oxidative Stress Related to Iron Metabolism in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients With Low Disability. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00086>

Solomon, A. J., Watts, R., Dewey, B. E., & Reich, D. S. (2017). MRI evaluation of thalamic volume differentiates MS from common mimics. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 4(5). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000387>

Stankiewicz, J. M., Neema, M., & Ceccarelli, A. (2014). Iron and multiple sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 35, S51–S58. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.039>

Steffen, F., Uphaus, T., Ripfel, N., Fleischer, V., Schraad, M., Gonzalez-Escamilla, G., Engel, S., Groppa, S., Zipp, F., & Bittner, S. (2023). Serum Neurofilament Identifies Patients With Multiple Sclerosis With Severe Focal Axonal Damage in a 6-Year Longitudinal Cohort. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 10(1). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000200055>

Steiger, T. K., Weiskopf, N., & Bunzeck, N. (2016). Iron Level and Myelin Content in the Ventral Striatum Predict Memory Performance in the Aging Brain. *The Journal of Neuroscience*, 36(12), 3552–3558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3617-15.2016>

- Stüber, C., Pitt, D., & Wang, Y. (2016). Iron in Multiple Sclerosis and Its Noninvasive Imaging with Quantitative Susceptibility Mapping. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(1), 100. <https://doi.org/10.3390/ijms17010100>
- Taege, Y., Hagemeyer, J., Bergsland, N., Dwyer, M. G., Weinstock-Guttman, B., Zivadinov, R., & Schweser, F. (2019). Assessment of mesoscopic properties of deep gray matter iron through a model-based simultaneous analysis of magnetic susceptibility and R2* - A pilot study in patients with multiple sclerosis and normal controls. *NeuroImage*, *186*, 308–320. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.11.011>
- Taubert, M., Roggenhofer, E., Melie-Garcia, L., Muller, S., Lehmann, N., Preisig, M., Vollenweider, P., Marques-Vidal, P., Lutti, A., Kherif, F., & Draganski, B. (2020). Converging patterns of aging-associated brain volume loss and tissue microstructure differences. *Neurobiology of Aging*, *88*, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.01.006>
- Tham, M., Frischer, J. M., Weigand, S. D., Fitz-Gibbon, P. D., Webb, S. M., Guo, Y., Adiele, R. C., Robinson, C. A., Brück, W., Lassmann, H., Furber, K. L., Pushie, M. J., Parisi, J. E., Lucchinetti, C. F., & Popescu, B. F. (2021). Iron Heterogeneity in Early Active Multiple Sclerosis Lesions. *Annals of Neurology*, *89*(3), 498–510. <https://doi.org/10.1002/ana.25974>
- Uher, T., Schaedelin, S., Srpova, B., Barro, C., Bergsland, N., Dwyer, M., Tyblova, M., Vodehnalova, K., Benkert, P., Oechtering, J., Leppert, D., Naegelin, Y., Krasensky, J., Vaneckova, M., Kubala Havrdova, E., Kappos, L., Zivadinov, R., Horakova, D., Kuhle, J., & Kalincik, T. (2020). Monitoring of radiologic disease activity by serum neurofilaments in MS. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *7*(4). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000714>
- Uzawa, A., Mori, M., Masuda, H., Ohtani, R., Uchida, T., Aoki, R., & Kuwabara, S. (2020). Peroxiredoxins are involved in the pathogenesis of multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Clinical and Experimental Immunology*, *202*(2), 239–248. <https://doi.org/10.1111/cei.13487>
- van der Weijden, M. C. M., van Laar, P. J., Lambrechts, R. A., Verbeek, D. S., & Tijssen, M. A. J. (2019). Cortical pencil lining on SWI MRI in NBIA and healthy aging. *BMC Neurology*, *19*(1), 233. <https://doi.org/10.1186/s12883-019-1471-7>

- van Lierop, Z. Y., Noteboom, S., Steenwijk, M. D., van Dam, M., Toorop, A. A., van Kempen, Z. LE, Moraal, B., Barkhof, F., Uitdehaag, B. M., Schoonheim, M. M., Teunissen, C. E., & Killestein, J. (2022). Neurofilament-light and contactin-1 association with long-term brain atrophy in natalizumab-treated relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 28(14), 2231–2242. <https://doi.org/10.1177/13524585221118676>
- Voigt, D., Scheidt, U., Derfuss, T., Brück, W., & Junker, A. (2017). Expression of the Antioxidative Enzyme Peroxiredoxin 2 in Multiple Sclerosis Lesions in Relation to Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 760. <https://doi.org/10.3390/ijms18040760>
- Wang, Y., & Liu, T. (2015). Quantitative susceptibility mapping (QSM): Decoding <scp>MRI</scp> data for a tissue magnetic biomarker. *Magnetic Resonance in Medicine*, 73(1), 82–101. <https://doi.org/10.1002/mrm.25358>
- Wang, Y., Spincemaille, P., Liu, Z., Dimov, A., Deh, K., Li, J., Zhang, Y., Yao, Y., Gillen, K. M., Wilman, A. H., Gupta, A., Tsiouris, A. J., Kovanlikaya, I., Chiang, G. C., Weinsaft, J. W., Tanenbaum, L., Chen, W., Zhu, W., Chang, S., ... Prince, M. R. (2017). Clinical quantitative susceptibility mapping (QSM): Biometal imaging and its emerging roles in patient care. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 46(4), 951–971. <https://doi.org/10.1002/jmri.25693>
- Ward, R. J., Zucca, F. A., Duyn, J. H., Crichton, R. R., & Zecca, L. (2014). The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *The Lancet Neurology*, 13(10), 1045–1060. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70117-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70117-6)
- Wei, H., Dibb, R., Zhou, Y., Sun, Y., Xu, J., Wang, N., & Liu, C. (2015). Streaking artifact reduction for quantitative susceptibility mapping of sources with large dynamic range. *NMR in Biomedicine*, 28(10), 1294–1303. <https://doi.org/10.1002/nbm.3383>
- Yushkevich, P. A., Piven, J., Hazlett, H. C., Smith, R. G., Ho, S., Gee, J. C., & Gerig, G. (2006). User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage*, 31(3), 1116–1128. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.01.015>

- Zhang, S.-Y., Gui, L.-N., Liu, Y.-Y., Shi, S., & Cheng, Y. (2020). Oxidative Stress Marker Aberrations in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis Study. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00823>
- Zhang, Y., Gauthier, S. A., Gupta, A., Chen, W., Comunale, J., Chiang, G. C.-Y., Zhou, D., Askin, G., Zhu, W., Pitt, D., & Wang, Y. (2016). Quantitative Susceptibility Mapping and R2* Measured Changes during White Matter Lesion Development in Multiple Sclerosis: Myelin Breakdown, Myelin Debris Degradation and Removal, and Iron Accumulation. *American Journal of Neuroradiology*, *37*(9), 1629–1635. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4825>
- Zhang, Y., Wei, H., Cronin, M. J., He, N., Yan, F., & Liu, C. (2018). Longitudinal atlas for normative human brain development and aging over the lifespan using quantitative susceptibility mapping. *NeuroImage*, *171*, 176–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.01.008>
- Ziemssen, T., Arnold, D. L., Alvarez, E., Cross, A. H., Willi, R., Li, B., Kukkaro, P., Kropshofer, H., Ramanathan, K., Merschhemke, M., Kieseier, B., Su, W., Häring, D. A., Hauser, S. L., Kappos, L., & Kuhle, J. (2022). Prognostic Value of Serum Neurofilament Light Chain for Disease Activity and Worsening in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis: Results From the Phase 3 ASCLEPIOS I and II Trials. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.852563>
- Zivadinov, R., Bergsland, N., Jakimovski, D., Weinstock-Guttman, B., Benedict, R. H. B., Riolo, J., Silva, D., & Dwyer, M. G. (2022). Thalamic atrophy measured by artificial intelligence in a multicentre clinical routine real-world study is associated with disability progression. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *93*(10), 1128–1136. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-329333>
- Zivadinov, R., Brown, M. H., Schirda, C. V., Poloni, G. U., Bergsland, N., Magnano, C. R., Durfee, J., Kennedy, C., Carl, E., Hagemeyer, J., Benedict, R. H. B., Weinstock-Guttman, B., & Dwyer, M. G. (2012). Abnormal subcortical deep-gray matter susceptibility-weighted imaging filtered phase measurements in patients with multiple sclerosis. *NeuroImage*, *59*(1), 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.07.045>

Zrzavy, T., Hametner, S., Wimmer, I., Butovsky, O., Weiner, H. L., & Lassmann, H. (2017). Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain*, *140*(7), 1900–1913. <https://doi.org/10.1093/brain/awx113>

Seznam publikací doktoranda

Odborné publikace vzniklé v souvislosti s touto prací (řazeno sestupně)

Burgetova, R., Dusek, P., Burgetova, A., Pudlac, A., Vaneckova, M., Horakova, D., Krasensky, J., Varga, Z., & Lambert, L. (2021). Age-related magnetic susceptibility changes in deep grey matter and cerebral cortex of normal young and middle-aged adults depicted by whole brain analysis. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, *11*(9), 3906–3919. <https://doi.org/10.21037/qims-21-87>. (IF 2,9)

Burgetova, A., Dusek, P., Uher, T., Vaneckova, M., Vejrazka, M., **Burgetova, R.**, Horakova, D., Srpova, B., Krasensky, J., & Lambert, L. (2022). Oxidative Stress Markers in Cerebrospinal Fluid of Newly Diagnosed Multiple Sclerosis Patients and Their Link to Iron Deposition and Atrophy. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *12*(6), 1365. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061365>. (IF 3,9)

Burgetova, A., Dusek, P., Uher, T., Vaneckova, M., Vejrazka, M., **Burgetova, R.**, Horakova, D., Srpova, B., Kalousova, M., Noskova, L., Levova, K., Krasensky, J., & Lambert, L. (2023). CSF Markers of Oxidative Stress Are Associated with Brain Atrophy and Iron Accumulation in a 2-Year Longitudinal Cohort of Early MS. *International journal of molecular sciences*, *24*(12), 10048. <https://doi.org/10.3390/ijms241210048>. (IF 4,9)

Ostatní publikace

Burgetova A., Dusek P., **Burgetova R.**, Pudlac A., Lambert L. (2021). Příznak centrální žíly a železného prstence u roztroušené sklerózy. *Česká radiologie*, *75*(4), 285-288.

Original Article

Age-related magnetic susceptibility changes in deep grey matter and cerebral cortex of normal young and middle-aged adults depicted by whole brain analysis

Romana Burgetova^{1,2}, Petr Dusek^{1,3}, Andrea Burgetova¹, Adam Pudlac¹, Manuela Vaneckova¹, Dana Horakova³, Jan Krasensky¹, Zsoka Varga³, Lukas Lambert¹

¹Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic;

²Department of Radiology, Third Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Královské Vinohrady, Prague, Czech Republic;

³Department of Neurology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Contributions: (I) Conception and design: P Dusek, A Burgetova, L Lambert; (II) Administrative support: A Burgetova, L Lambert, A Pudlac; (III) Provision of study materials or patients: D Horakova, Z Varga, P Dusek, M Vaneckova, J Krasensky; (IV) Collection and assembly of data: R Burgetova, M Vaneckova, P Dusek, J Krasensky, D Horakova; (V) Data analysis and interpretation: P Dusek, L Lambert, R Burgetova, A Burgetova; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: Assoc. prof. Andrea Burgetova, MD, PhD. First Faculty of Medicine Charles University and General Faculty Hospital in Prague, U nemocnice 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Email: andrea.burgetova@vfn.cz.

Background: Iron accumulates in brain tissue in healthy subjects during aging. Our goal was to conduct a detailed analysis of iron deposition patterns in the cerebral deep grey matter and cortex using region-based and whole-brain analyses of brain magnetic susceptibility.

Methods: Brain MRI was performed in 95 healthy individuals aged between 21 and 58 years on a 3T scanner. MRI protocol included T1-weighted (T1W) magnetization-prepared rapid acquisition with gradient echo images and 3D flow-compensated multi-echo gradient-echo images for quantitative susceptibility mapping (QSM). In the region-based analysis, QSM and T1W images entered an automated multi-atlas segmentation pipeline and regional mean bulk susceptibility values were calculated. The whole-brain analysis included a non-linear transformation of QSM images to the standard MNI template. For the whole-brain analysis voxel-wise maps of linear regression slopes β and P values were calculated. Regional masks of cortical voxels with a significant association between susceptibility and age were created and further analyzed.

Results: In cortical regions, the highest increase of susceptibility values with age was found in areas involved in motor functions (precentral and postcentral areas, premotor cortex), in cognitive processing (prefrontal cortex, superior temporal gyrus, insula, precuneus), and visual processing (occipital gyri, cuneus, posterior cingulum, fusiform, calcarine and lingual gyrus). Thalamic susceptibility increased until the fourth decade and decreased thereafter with the exception of the pulvinar where susceptibility increase was observed throughout the adult lifespan. Deep grey matter structures with the highest increase of susceptibility values with age included the red nucleus, putamen, substantia nigra, dentate nucleus, external globus pallidus, caudate nucleus, and the subthalamic nucleus in decreasing order.

Conclusions: Accumulation of iron in basal ganglia follows a linear pattern whereas in the thalamus, pulvinar, precentral cortex, and precuneus, it follows a quadratic or exponential pattern. Age-related changes of iron content are different in the pulvinar and the rest of the thalamus as well as in internal and external globus pallidus. In the cortex, areas involved in motor and cognitive functions and visual processing show the highest iron increase with aging. We suggest that the departure from normal patterns of regional brain iron trajectories during aging may be helpful in the detection of subtle neurodegenerative and neuroinflammatory processes.

Keywords: Magnetic susceptibility; iron; aging; brain; deep grey matter; cerebral cortex

Submitted Jan 23, 2021. Accepted for publication Apr 19, 2021.

doi: 10.21037/qims-21-87

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/qims-21-87>

Introduction

During the lifespan, the human brain undergoes microstructural changes including grey matter atrophy, myelin degeneration, or iron accumulation that can be picked *in vivo* by various quantitative MRI techniques (1-4). Knowledge about the spectrum of age-related changes in brain structure and associated MR parameters is important for understanding the neurobiology of aging and for differentiating physiological aging from disease.

Magnetic susceptibility, a measure that indicates the extent to which a material may be magnetized in external magnetic field, can be quantified in tissues by a recent MR technique called quantitative susceptibility mapping (QSM) (5). While magnetic susceptibility of cerebral tissue may be influenced by myelin, calcium, or deoxyhemoglobin, it is mainly determined by ferritin-iron content in the basal ganglia and other grey matter structures (6). QSM is thus considered as a surrogate measure of iron content in the grey matter (7,8).

Cerebral accumulation of non-heme iron occurs during normal aging. This increase occurs heterogeneously in certain cell types and brain regions such as basal ganglia, hippocampus, motor cortex, cerebellar nuclei, and other subcortical brain regions (9-13). Globus pallidus, substantia nigra, red nuclei, and putamen are regions with the highest iron deposition (14-16).

Iron is involved in numerous pathways in the brain such as oxygen transportation, oxidative phosphorylation, DNA synthesis, mitochondrial respiration, myelin synthesis, antioxidant enzyme activation, and metabolism of neurotransmitters (13). On the other hand, disturbance of iron homeostasis can lead to brain neurotoxicity by different mechanisms such as membrane damage, protoxin bioactivation, aberrant cell signaling, bioenergetic failure, proteosomal and mitochondrial dysfunction, protein aggregation and inclusion formation, electrophysiological derangements, and synaptolysis, conveying all of these factors on apoptosis, necrosis or a specific cell death triggered by iron called ferroptosis (13,17,18). Increased subcortical iron is associated with decreased cognitive and motor functions in the elderly population (14,19,20)

suggesting that basal ganglia may be more vulnerable to iron accumulation throughout aging, exposing them to an increased risk of neurodegeneration or/and neuroinflammation. Understanding normal patterns of iron accumulation with aging might thus assist in identifying subjects who are at greater risk of accelerated neurodegeneration.

The majority of previous studies examining iron accumulation during normal aging were based on region-of-interest analysis of deep grey matter on R2* relaxometry and magnetic susceptibility maps (21-27). Whole-brain analysis, which is not limited to a priori predefined regions, has been used only sparsely for studying age-related changes of magnetic susceptibility and, by extension, of iron levels (28,29).

The objective of this study was to conduct a detailed analysis of iron deposition patterns not only in the cerebral deep grey matter but also in the cortex by a voxel-wise analysis of QSM at the whole-brain level and using region-based analysis.

Methods

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (as revised in 2013). This study was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague (ID1018/17), and all subjects signed informed consent.

Study participants

Brain MRI was performed in 95 healthy individuals (57 females and 38 males) aged between 21 and 58 (mean \pm SD = 37 \pm 10) years, who responded to an announcement presented at the First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague and met the following inclusion criteria: (I) willing to sign an informed consent in accordance with local regulations, (II) age 18–60 years (chosen to be comparable to that of adult patients with multiple sclerosis). The exclusion criteria were: (I) unable to undergo MRI examination, (II) unable to be examined 4 times during the next three years at 0, 12, 24,

36 months, (III) pregnancy at the time of enrollment into the study, (IV) any diseases, medical conditions, or brain MRI abnormalities that could influence the structure of the brain or spinal cord.

Imaging protocol

The examination was performed on a 3T MRI scanner (Siemens Skyra 3T, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) with a 32-channel birdcage head coil. MRI protocol included T1-weighted 3D Magnetization-Prepared Rapid Acquisition with Gradient Echo (MPRAGE) images (T1WI) in sagittal plane with the following acquisition parameters: repetition time (TR), 2,300 ms; echo time (TE), 2.96 ms; inversion time (TI) 900 ms; flip angle (FA) 9°; field of view (FOV) 176×256×256 mm; spatial resolution 1.0×1.0×1.0 mm³ for anatomical imaging, and segmentation and 3D flow-compensated multi-echo gradient-echo (GRE) images in axial plane (TR =33 ms; first TE =4.5 ms, uniform echo spacing =5 ms, last TE =29.5 ms, number of echoes =6; FA =18°; FOV =195×240×164 mm; spatial resolution =0.94×0.94×0.94 mm³) for QSM.

QSM processing

QSM was processed by a multi-scale dipole inversion algorithm implemented in QSMbox software package (<https://gitlab.com/acostaj/QSMbox>) (7,30). T1WI (i.e., MPRAGE) images were transferred into the QSM space by rigid-body registering to the first echo magnitude image from the GRE pulse sequence, using the SPM12 (Statistical Parametric Mapping) tool, (www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm12) (31) and skull stripped by multiplying with an SPM-based brain binary mask calculated by QSMbox. Co-registered skull-stripped QSM and T1WI entered an automated multi-atlas segmentation pipeline using dual, i.e., QSM/T1, contrast for delineation of DGM nuclei (32) implemented at a cloud-based platform (www.mricloud.org) (33). Subsequently, segmented volumes were eroded by one voxel, and mean bulk susceptibility values of the following regions of interest (ROI) were extracted: internal globus pallidus, external globus pallidus, putamen, caudate nucleus, thalamus, pulvinar, substantia nigra, red nucleus, dentate nucleus, subthalamic nucleus, and total white matter (Figure 1). Magnetic susceptibility values from both hemispheres were averaged and further analyzed as (I) raw uncorrected values and (II) values referenced to the mean

bulk magnetic susceptibility of the total white matter. Notably, the total white matter was segmented by the automatic algorithm and its mean bulk susceptibility thus represents a highly reproducible operator independent measurement.

T2 maps processing*

T2* relaxation maps were calculated from multi-echo GRE magnitude images using non-linear least squares fitting according to the Levenberg-Marquardt algorithm (MRI Processor v.1.1.6, ImageJ 1.51k; T2* values were capped at 100 ms, the maximum number of iterations was 100, and forced no bias). T2* relaxation maps were used for whole-brain analysis.

Whole-brain analysis

The analysis was based on a procedure described previously (28). Briefly, a linear pre-registration (antsRegistration) and non-linear transformation (antsApplyTransformation) of susceptibility and T2* relaxation maps to the standard MNI template (MNI152 “ICBM 2009c Nonlinear Symmetric”) was performed using ANTS package ver. 2.1.0 (34). To compensate for a small mismatch in registration, we applied a median filter followed by a maximum intensity filter, both calculated across a sphere with a diameter of 3 mm. This approach was chosen empirically—we have visually compared the output images after eleven different combinations of filters (median spherical, median cubic, Gaussian spherical) with different kernel sizes applied. The selected combination of filters yielded images with a reasonable level of noise and detail and it appeared to be the most suitable approach for co-registration of susceptibility and T2* relaxation maps; the median filter removed both positive and negative signal values caused by vessels while the maximum intensity spherical filter (3 voxels in diameter) compensated for imperfections in co-registration of narrow structures (especially the gyri) to the MNI152 template.

In a post-hoc analysis, a mask of cortical voxels with a significant association of magnetic susceptibility and age was created. This mask was overlaid onto an anatomical T1 template and nine ROIs consisting of voxels from this mask were manually segmented using ITK-SNAP (www.itksnap.org) (35): precentral gyrus, postcentral gyrus, dorsolateral prefrontal cortex, medial prefrontal cortex, insular cortex,

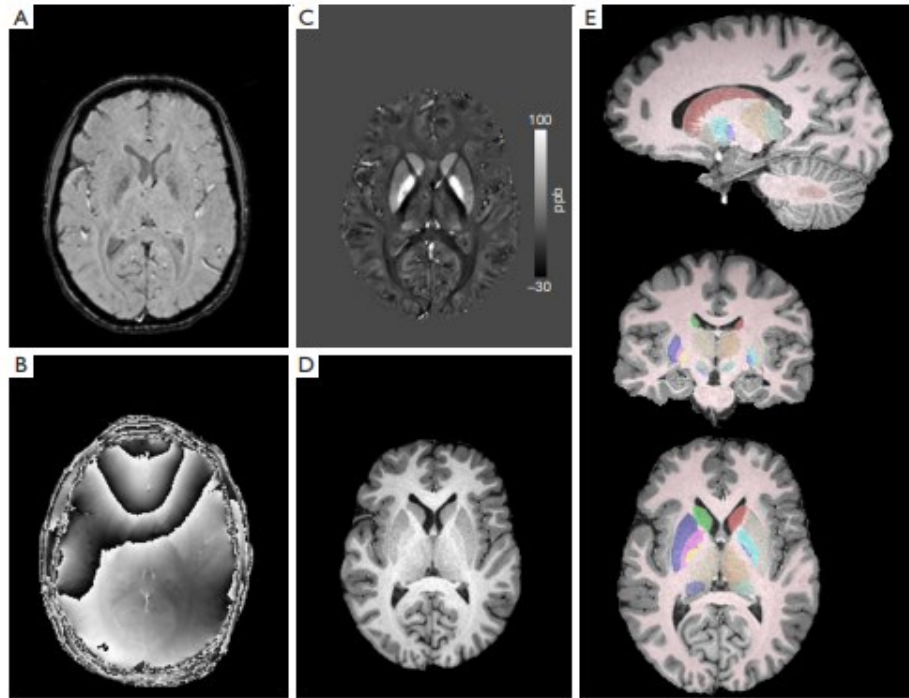


Figure 1 Illustration of MRI data processing. Example (A) magnitude and (B) raw phase (TE =24.5 ms) GRE images; (C) reconstructed QSM image and (D) coregistered skull-stripped T1-weighted anatomical image that were used for automatic multiatlas segmentation; (E) automatically segmented regions of interest overlaid onto anatomical image. ppb, parts per billion; GRE, gradient recalled echo; TE, echo time; QSM, quantitative susceptibility mapping.

precuneus, occipital cortex, occipito-temporal cortex, and cerebellar vermis (Figure S1). Individual mean bulk magnetic susceptibility values from these ROIs were retrieved and further analyzed as described for deep grey matter ROIs (25).

Statistics

Univariate regression analysis for regional age-related magnetic susceptibility changes was performed with linear and non-linear (quadratic and exponential) models and the model with the best fit based on Akaike information criterion with correction for small sample sizes (AICc), R^2 , and root mean squared error (RMSE) was selected. For linear relationships, regression slope (β) was expressed in

parts per billion (ppb)/year and its difference from zero was tested by the F test.

The exponential model was based on one-phase association and the susceptibility values were fitted with the following equation: $\text{susceptibility} = A \cdot (1 - \exp[-B \cdot \text{age}]) + C$, where A, B, and C are tissue-specific parameters (25). Holm-Bonferroni method was applied to correct for multiple hypothesis testing. Statistical analyses were carried out using Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Whole-brain analyses of age-related magnetic susceptibility and $T2^*$ relaxation time changes were performed using SPM12. Statistical maps were generated using a cluster definition threshold of $P < 0.005$ (uncorrected) and clusterwise family-wise error (FWE)-corrected threshold of $P < 0.05$. Voxel-wise maps of linear regression

slopes β were visualized using MRICroGL (<http://www.nitrc.org/projects/mricrogl>); anatomical locations of significant clusters were retrieved from the Atlas of Intrinsic Connectivity of Homotopic Areas (AICHA) (36).

Results

ROI-based analysis

The age-related increase of magnetic susceptibility in the basal ganglia followed a linear pattern, but in the thalamus and pulvinar, it followed a quadratic and exponential pattern, respectively (Figure 2, Table S1). Deep grey matter structures with a significant linear increase of raw bulk magnetic susceptibility included the red nucleus ($\beta=1.30$, $P<0.001$), putamen ($\beta=0.89$, $P<0.001$), substantia nigra ($\beta=0.76$, $P<0.001$), dentate nucleus ($\beta=0.73$, $P=0.002$), external globus pallidus ($\beta=0.62$, $P<0.001$), caudate nucleus ($\beta=0.46$, $P<0.001$), and subthalamic nucleus ($\beta=0.43$, $P=0.024$). The effect of age was not significant for the internal globus pallidus ($\beta=0.20$, $P=0.15$). In the thalamus, magnetic susceptibility increased until the age of 40 years and decreased thereafter. In the pulvinar, susceptibility increase was followed by a relative flattening of the curve from the age of 40 years onwards. Analysis of magnetic susceptibility referenced to the total white matter value returned similar results (Figures S2,S3), whereby mean magnetic susceptibility in the total white matter showed a mild linear positive effect of age ($\beta=0.03$, $P=0.002$).

Whole-brain analyses

Results of the whole-brain QSM analysis documenting magnetic susceptibility increase in ppb per year are shown in Figure 3 and Table 1. In addition to deep grey matter structures, multiple cortical regions with a positive association of magnetic susceptibility and age were identified in the precentral and postcentral areas, medial and dorsolateral prefrontal cortex, superior temporal gyrus and insula, posteriorly in the superior, lateral, and medial occipital gyri, precuneus, cuneus, posterior cingulate, fusiform, calcarine and lingual gyrus ($P<0.05$, FWE-corrected). In the cerebellum, the vermis and tonsils showed a significant positive correlation with age ($P<0.05$, FWE-corrected). Spatial coordinates and anatomical labeling of clusters with significant age-related magnetic susceptibility increase are listed in Table 1.

Several regions showed magnetic susceptibility decrease

with age, although the effect was much smaller compared to areas with susceptibility increase reaching β not greater than -0.2 ppb per year ($P<0.05$, FWE-corrected). These regions include distinct white matter areas, particularly the rostrum of the corpus callosum, external capsule, mesencephalic tectum and tegmentum, and frontal and temporal subcortical regions. Several extracerebral regions, the choroid plexus, falx cerebri, and venous sinuses showed age-related susceptibility decrease with β up to -1.0 ppb per year ($P<0.05$, FWE-corrected).

Post-hoc analysis of magnetic susceptibility in cortical regions with a significant effect of age showed its linear increase in the postcentral, dorsolateral prefrontal, medial prefrontal, insular, occipital cortices, precuneus, and cerebellar vermis ($\beta=0.2$, $P<0.001$). In the precentral gyrus and temporo-occipital gyrus, magnetic susceptibility followed a quadratic pattern with a relatively steep increase until the age of 40 years and flattening of the curve afterwards (Figure 4).

Results of $T2^*$ analysis are shown in Figure S4 and Table S2. The results are similar to QSM however, a larger number of areas correlate with age. Compared to QSM, associations are evident also in the white matter.

Discussion

In this study, we quantified age-related changes of magnetic susceptibility in deep grey matter structures and the cerebral cortex in a cohort of adult healthy individuals using whole-brain and ROI-based analyses. We found a linear association between age and magnetic susceptibility in deep grey matter structures including the red nucleus, putamen, substantia nigra, dentate nucleus, external globus pallidus, and caudate nucleus. In the thalamus, quadratic association with age was observed with magnetic susceptibility increasing before and decreasing after the age of 40 years. Whole-brain QSM analysis documented that beyond these regions, there is a significant positive association between age and magnetic susceptibility in extensive areas of the cerebral cortex—in the frontal lobes, Rolandic area, insular area, precuneus, cuneus, posterior cingulum, and lingual gyrus. Whole-brain $T2^*$ analysis showed a similar pattern of age-related changes. In opposite to susceptibility, which showed a positive effect of age only in grey matter, areas of age-related $T2^*$ relaxation times shortening overlapped grey and white matter structures. This is likely caused by the fact that in QSM, the paramagnetic effect of accumulating iron and the diamagnetic effect of maturing myelin counteract

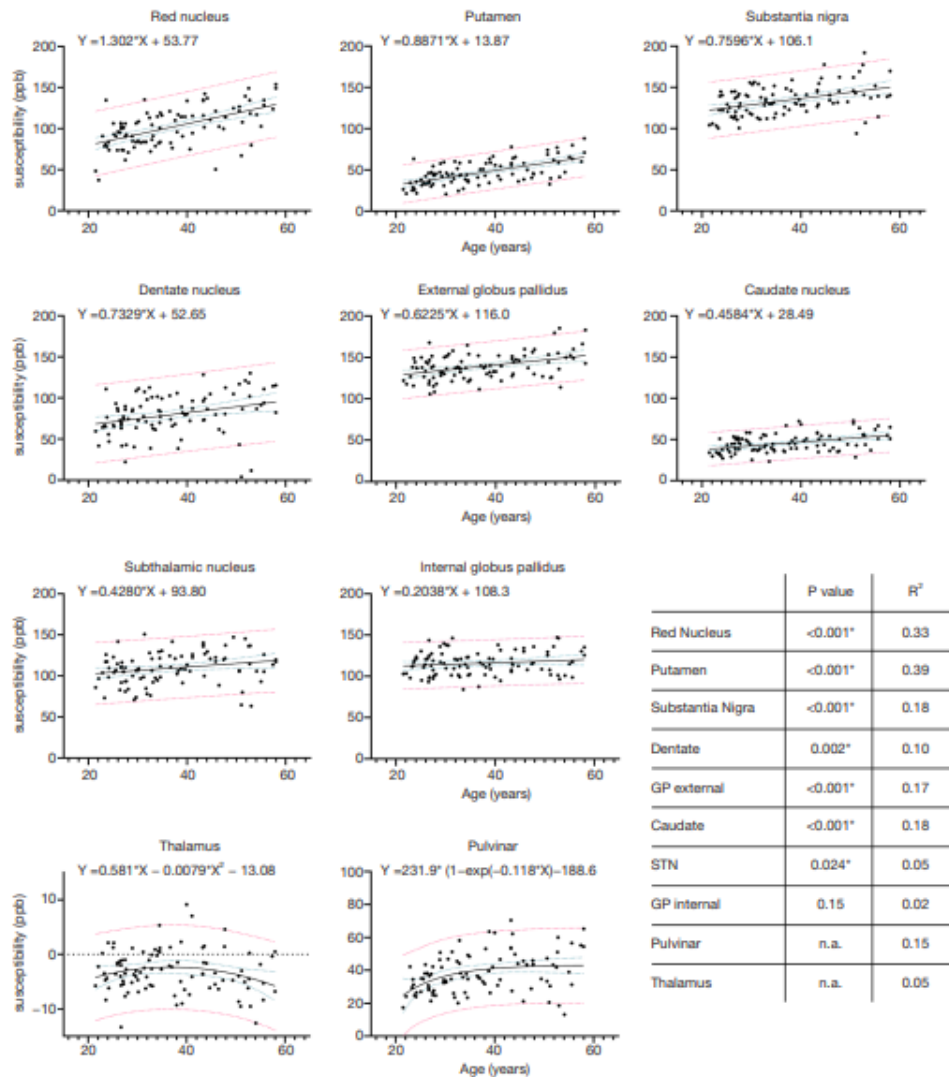


Figure 2 Bulk magnetic susceptibility values in ppb in deep gray matter structures as a function of age with their respective regression fits and coefficients. Blue dotted lines represent 95% confidence bands of the regression fit and red dotted lines represent 95% population prediction bands. Please note different Y-axis range for thalamus and pulvinar. ppb, parts per billion; GP, globus pallidus, STN, subthalamic nucleus.

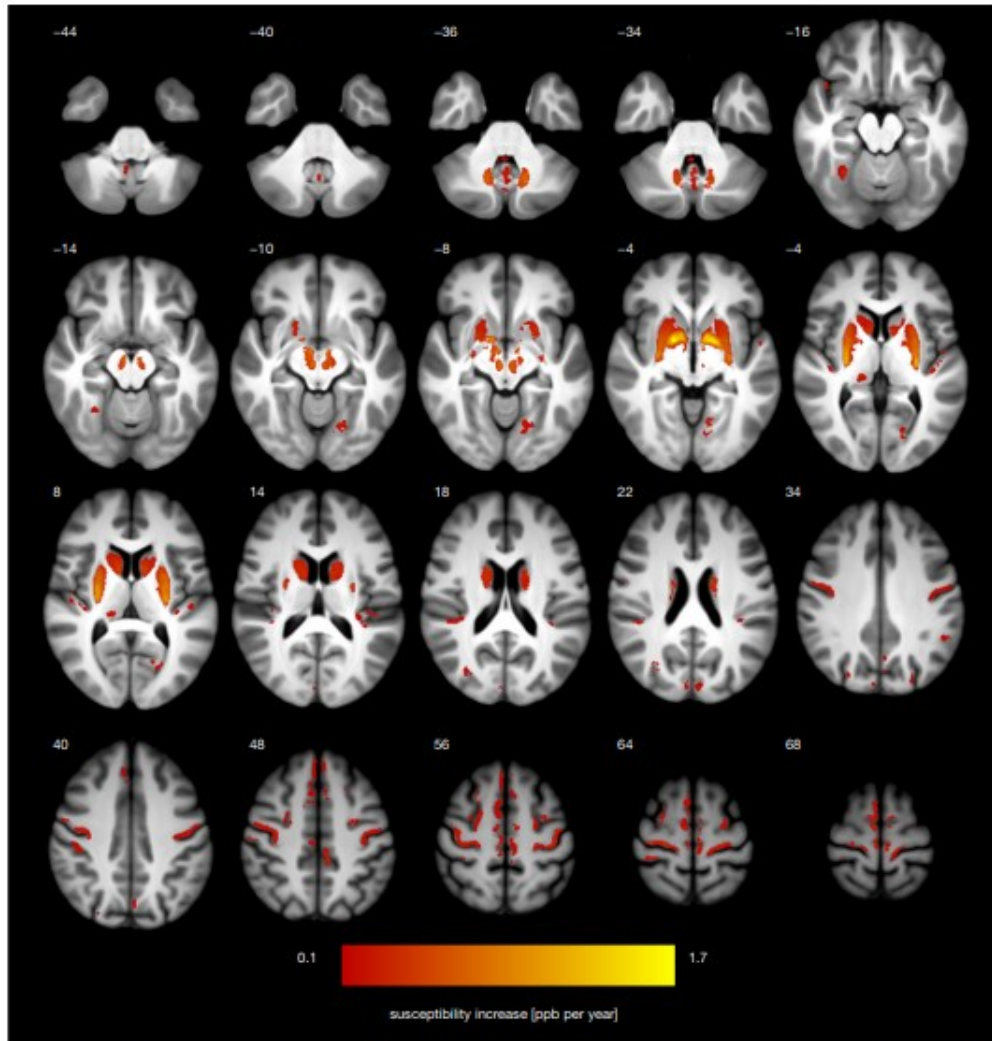


Figure 3 Statistical map of age-related susceptibility changes in the brain of normal adults represented as mean bulk susceptibility increase in ppb per year (thresholded at $P < 0.05$ at cluster level and corrected for family-wise error; initial cluster definition threshold was set to $P < 0.005$ uncorrected). Z-coordinate in the MNI space in [mm] is indicated for each slice. ppb, parts per billion; MNI, Montreal Neurological Institute.

Table 1 Clusters with significant age-related susceptibility increase identified by whole brain analysis with corresponding anatomical locations

Cluster volume [mm ³]	Peak susceptibility change [ppb/year]	Peak T value	MNI coordinates [mm]			Peak Structure	Anatomical structures within cluster
			X	Y	Z		
10,477	1.7	10.7	16	1	-5	Putamen*	Right Putamen, Pallidum, Caudate, Substantia Nigra, Red Nucleus*
10,018	1.5	10.3	-14	1	-4	Putamen*	Left Putamen, Pallidum, Caudate, Substantia Nigra, Red Nucleus*
464	0.8	5.1	-15	-60	-37	Dentate*	Left Dentate*
369	0.7	4.9	15	-58	-37	Dentate*	Right Dentate*
3,126	0.5	7.0	-41	-11	56	Precentral gyrus	Left Precentral gyrus, Paracentral lobule
685	0.5	4.9	-23	-68	7	Calcarine gyrus	Left Calcarine, Lingual, Fusiform gyri, Parietooccipital sulcus
914	0.4	4.8	-41	-21	4	Superior Temporal gyrus	Left Superior Temporal gyrus, Posterior Insula
3,628	0.4	6.4	23	-22	63	Precentral gyrus	Right Precentral gyrus, Paracentral lobule
811	0.4	4.8	45	-16	0	Superior Temporal gyrus	Right Superior Temporal, Supramarginal gyri, Posterior Insula
1,902	0.4	5.0	-8	-35	47	Cingulate sulcus	Left Cingulate sulcus, Superior Frontal gyrus, Paracentral lobule
252	0.3	6.4	29	-54	-16	Fusiform gyrus	Right Fusiform, Lateral Occipital gyri
303	0.3	4.7	5	-88	30	Superior Occipital gyrus	Right Superior Occipital, Calcarine gyri, Cuneus
3,779	0.3	6.3	4	-26	66	Paracentral lobule	Right Paracentral lobule, Cingulate sulcus, Superior frontal gyri
210	0.3	4.7	-25	-76	28	Middle Occipital gyrus	Left Middle Occipital, Angular gyri, Intraoccipital sulcus
442	0.3	3.8	13	-30	0	Thalamic pulvinar*	Right Thalamus*
485	0.3	5.3	2	-55	-36	Cerebellum	Cerebellar vermis
1,503	0.3	5.4	23	11	63	Superior Frontal sulcus	Right Superior Frontal gyrus and sulcus, Precentral sulcus
193	0.3	4.9	-4	-81	26	Cuneus	Left Cuneus, Calcarine, Superior Occipital gyri
383	0.3	4.1	35	11	25	Inferior Frontal gyrus	Right Inferior Frontal gyrus, Precentral sulcus
326	0.3	4.9	-2	-74	34	Parietooccipital sulcus	Left Parietooccipital sulcus, Precuneus
635	0.2	4.6	45	-25	43	Postcentral sulcus	Right Postcentral sulcus and gyrus
1,241	0.2	4.7	-33	-4	54	Superior Frontal gyrus	Left Superior Frontal sulcus and gyrus, Precentral sulcus
427	0.2	4.2	26	-73	29	Middle Occipital gyrus	Right Middle Occipital, Angular gyri, Intraoccipital, Intraparietal sulci
239	0.2	3.9	-50	-47	32	Supramarginal gyrus	Left Supramarginal, Inferior Parietal gyri
373	0.2	4.1	-6	-66	-58	Cerebellum	Left and right Cerebellar tonsils

*Deep gray matter structures.

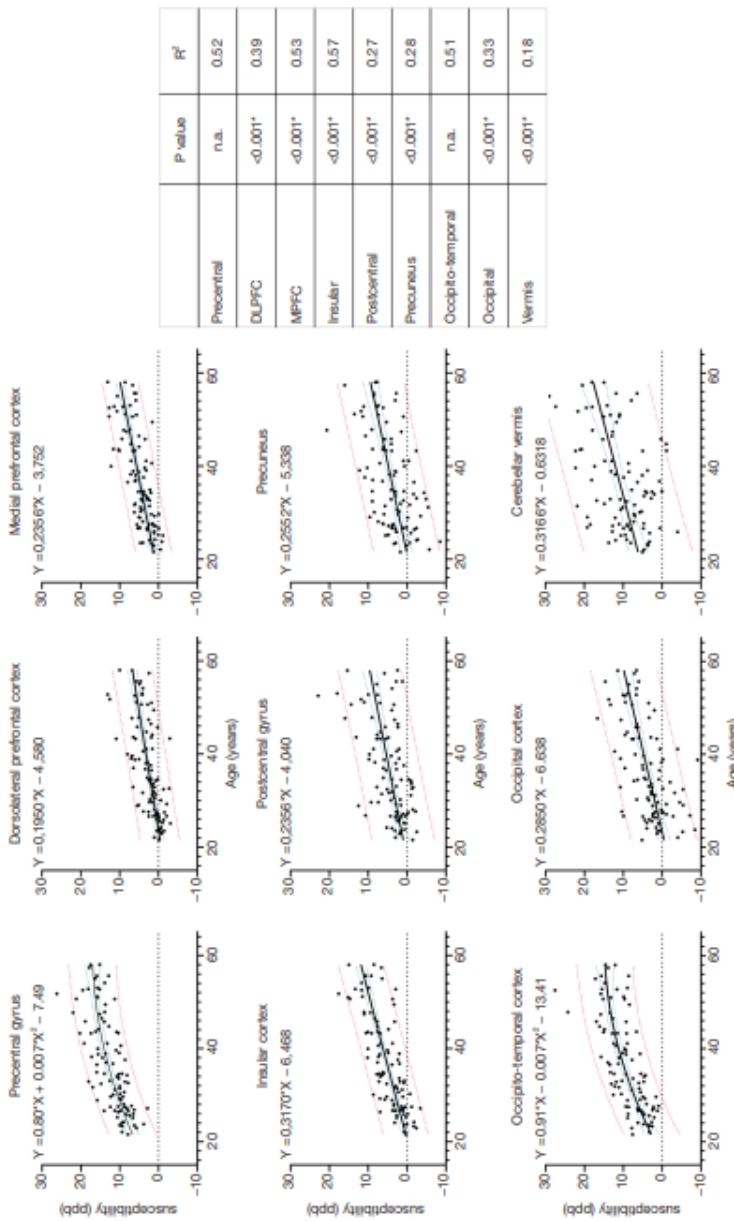


Figure 4 Uncorrected bulk magnetic susceptibility values in ppb in cortical regions of interest as a function of age with their respective regression fits. Blue dotted lines represent 95% confidence bands of the regression fit and red dotted lines represent 95% population prediction bands. ppb, parts per billion; DLPFC, dorsolateral prefrontal cortex; MPFC, medial prefrontal cortex.

each other in the white matter, while in T2* maps, both, iron accumulation and myelin maturation with aging, cause local magnetic field inhomogeneities and thus contribute to the shortening of T2* relaxation times. This effect was particularly noted in subcortical white matter regions which are known to accumulate iron. Comparison of QSM and T2* map analyses indicates that the former may be more suitable for the assessment of age-related iron changes in the cortical regions.

It is well known that the trajectory of brain iron accumulation during the lifespan is not linear. A sharp increase of tissue iron concentration (15) and subsequently of magnetic susceptibility (25,27,37) during the first two decades is followed by flattening of the curve or even decrease at old age. Results of this study indicate the evolution of susceptibility values is linear between the age of 20 and 60 years for most deep grey matter and cortical structures. It is likely that regions that showed an exponential relationship between age and magnetic susceptibility in the current study, i.e., pulvinar, motor and occipito-temporal cortices, exhibit less abrupt initial iron accumulation with flattening of the curve shifted to an older age.

We found the largest effect of age on magnetic susceptibility (the steepest regression slope) in the red nucleus and putamen, which is consistent with previous studies (11,27,38). The red nucleus has been previously less investigated and, in some studies, the absolute magnitude of susceptibility increase was higher for the red nucleus than for the putamen (22,27,29), similarly as in our study. Our observation of milder gradual increase of magnetic susceptibility in the caudate nucleus, substantia nigra, and dentate nucleus is also concordant with post-mortem evidence (16) and several previous *in vivo* MRI studies (9,13,14,27,28).

In the pallidum, previous works reported contradictory findings including no age-related susceptibility changes (23,27,28), or mild iron accumulation during adulthood (22). A meta-analysis of 20 MRI studies that estimated iron content in the caudate nucleus, globus pallidus, putamen, red nucleus, and substantia nigra, documented the lowest age-related differences in globus pallidus although it was generally rich in iron in absolute value (11). Studies that included infants showed an exponential pattern with a steeply increasing iron concentration as well as magnetic susceptibility from birth and a plateau from the 3rd decade onwards (13,14,16,38-40). However, these studies did not aim at analyzing specifically the pallidal iron content trajectory during the adult lifespan. Our results indicate

that the reason for contradictory findings may be the differential contribution of external and internal globus pallidus depending on segmentation strategy. In contrast to the internal part, the external part, which is adjacent to the putamen, showed a linear increase of susceptibility during aging in the current study. A similar effect was observed for R2* transverse relaxivity in another study that segmented internal and external globus pallidus (29). These results indicate distinct regulation of iron concentration in pallidal subregions and suggest that internal and external globus pallidus should be analyzed separately for proper assessment of disease-related changes in this structure.

Thalamus presents an overall low iron content and it was suggested that myelin contributes by a large degree to its susceptibility masking the effect of small age-related changes in iron content (41). On the other hand, the bidirectional pattern with an initial increase until the age of 40 years followed later by a decrease of magnetic susceptibility observed in the current and a previous study (42) conspicuously matches age-related changes in the thalamic iron concentration measured in *post mortem* tissue (15). It is thus likely that thalamic susceptibility is mostly driven by the effect of iron, similarly as in the basal ganglia. Contrary to some previous studies (27), we and others have found a positive age-related magnetic susceptibility increase in the pulvinar (42,43). It is interesting to point up the differences between pulvinar and other thalamic nuclei. The pulvinar, although being a posterior part of the thalamus, is visually discernible on QSM and behaves unlike other thalamic nuclei. Zhang *et al.* (42) suggests that in the medial and lateral nuclei of the thalamus susceptibility follows a bidirectional pattern while anterior nuclei and pulvinar display gradual susceptibility increase with age. Overall, there is converging evidence that MRI metrics sensitive to iron content should be analyzed separately for pulvinar and other thalamic nuclei.

Age-related changes in iron distribution in the cerebral and cerebellar cortex *in vivo* have been much less investigated. It may be related to the fact that the cerebral cortex has more complex and variable anatomy than deep grey matter nuclei and its automatic analysis at a group level requires non-linear transformation to match corresponding regions among subjects. Further challenges include the thinning of the cortex and widening of subarachnoid cerebrospinal fluid spaces in cerebral sulci with cerebral atrophy that accompanies aging. Results of the current whole-brain analysis largely corroborate findings from a single previous voxel-based

QSM study in that cortical magnetic susceptibility evolves unevenly during aging (28,29). The strongest effect of age was found in areas involved in the motor (Rolandic area, premotor cortex, cerebellar vermis), cognitive (dorsolateral prefrontal cortex, insular region, precuneus), and visual (cuneus, posterior cingulum, lingual and fusiform gyri) cortical areas. This is also in line with the direct measurement of iron concentration in *post mortem* tissue (15) which indicates that iron has an important contribution to magnetic susceptibility in the cortex. Overall, structures that accumulate iron with aging contain dopaminergic iron-dependent pathways and it was hypothesized that both, changes in iron content and dopaminergic transmission may be responsible for behavioral changes during aging (27,28,44).

In the white matter, magnetic susceptibility is predominantly affected by diamagnetic myelin and it was previously shown to follow a trajectory of initial susceptibility decrease reaching its minimum between 25 and 45 years of age, followed by an increase, consistent with myelin maturation and decay in the course of normal brain development (25). We found a small but significant positive effect of age on the magnetic susceptibility of the total white matter, similar to a previous study (30) suggesting that susceptibility in most white matter regions was beyond its minimum in the examined age group. However, the whole-brain QSM analysis revealed white matter regions with a small negative effect of age corresponding to areas with an age-related decrease of T2* relaxation time, predominantly in the fronto-temporal subcortical areas and rostral corpus callosum which are regions where myelin matures in late adulthood (45).

In line with previous studies (25,28) which demonstrated that the effect of age on magnetic susceptibility outweighs the impact of reference adjustment, we have used raw unreferenced values for the main analysis in order to avoid bias introduced by manual reference region placement. Secondary analysis with magnetic susceptibility referenced to the mean value of total white matter confirmed a negligible effect of susceptibility adjustment.

This study has several limitations. Firstly, its cross-sectional nature does not allow direct analysis of individual regional magnetic susceptibility values evolution throughout aging. A longitudinal study will be necessary to confirm the relationship between aging and magnetic susceptibility. Secondly, the age spectrum of participants spanning 20–60 years does not include adolescents and seniors; the results are thus not generalizable to these populations. The primary aim of this study was to provide reference values for multiple

sclerosis patients, but the results may be as well used for other diseases with an adult onset, e.g., Huntington disease, Wilson disease, or neuromyelitis optica (46,47). Thirdly, magnetic susceptibility is only a surrogate marker of iron concentration and is also influenced by other substances such as diamagnetic myelin. However, an excellent match of susceptibility values with previously published directly measured iron concentrations indicates that for grey matter structures, magnetic susceptibility is dominantly influenced by iron and the confounding effect of myelin is rather small. Fourthly, voxel-based analysis of the brain involves non-rigid warping of anatomy to match the template. This is inherently associated with registration errors that may lead to false-negative age-related associations for some brain areas. Lastly, susceptibility changes are presumably influenced not only by absolute iron content but also by changes in the relative iron concentration secondary to age-related reductions in volumes of evaluated structures (48). However, such complex relationships cannot be inferred from this cross-sectional study.

In conclusion, we have demonstrated that iron accumulates in specific brain regions with different patterns. Regions most prone to accumulate iron are the ones involved in the motor, visual, and cognitive functions. Iron accumulation follows a linear pattern during adult lifespan in the basal ganglia and most cortical areas but in the thalamus, pulvinar, precentral and occipito-temporal cortices, it follows a quadratic or exponential pattern. Changes in iron content during aging are different in the pulvinar and the rest of the thalamus. We suggest that whole brain analysis of magnetic susceptibility and segmentation of thalamic and pallidal subregions is beneficial for proper assessment of aging and disease-related changes in cerebral iron content. Departure from normal patterns of regional brain iron trajectories during aging might be helpful in the detection of subtle neurodegenerative and neuroinflammatory processes.

Acknowledgments

This work was presented as a poster at ECTRIMS virtual congress 2020.

Funding: This study was supported by the Czech Ministry of Health grant (NV18-08-00062, and RVO VFN64165), by the Charles University in Prague grant (PROGRES Q27) and by Roche company.

Footnote

Conflicts of Interest: All authors have completed the ICMJE

uniform disclosure form (available at <http://dx.doi.org/10.21037/qims-21-87>). Dr. Dusek reports funding from Czech Ministry of Health, grant No. NU21-04-00535 and European Union's Horizon 2020 research and innovation programme, grant No. 633190, and advisory board payment from Alexion Pharmaceuticals. Dr. Vaneckova reports funding from Czech Ministry of Health, grant No. NV 18-04-00168, honoraria for lectures and presentation from Biogen Idec, Novartis, Sanofi Genzyme, Merck Serono and Teva and support for attending meetings and/or travel from Biogen Idec, Novartis, Sanofi Genzyme. Dr. Horakova reports honoraria for lectures and presentation from Biogen Idec, Novartis, Sanofi, Roche and Merck and support for attending meetings and/or travel from Biogen Idec, Novartis, Sanofi, Roche and Merck. Dr. Krasensky reports funding from Czech Ministry of Health, grant No. NV 18-04-00168 and support for attending meetings and/or travel Biogen Idec, Novartis, Sanofi Genzyme. Dr. Lambert serves as an unpaid editorial board member of Quantitative Imaging in Medicine and Surgery. The other authors have no conflicts of interest to declare.

Ethical Statement: The authors are accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (as revised in 2013). This study was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague (ID1018/17), and all subjects signed informed consent.

Open Access Statement: This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0), which permits the non-commercial replication and distribution of the article with the strict proviso that no changes or edits are made and the original work is properly cited (including links to both the formal publication through the relevant DOI and the license). See: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

References

- Callaghan MF, Freund P, Draganski B, Anderson E, Cappelletti M, Chowdhury R, Diedrichsen J, FitzGerald THB, Smittenaar P, Helms G, Lutti A, Weiskopf N. Widespread age-related differences in the human brain microstructure revealed by quantitative magnetic resonance imaging. *Neurobiol Aging* 2014;35:1862-72.
- Lorio S, Lutti A, Kherif F, Ruef A, Dukart J, Chowdhury R, Frackowiak RS, Ashburner J, Helms G, Weiskopf N, Draganski B. Disentangling in vivo the effects of iron content and atrophy on the ageing human brain. *NeuroImage* 2014;103:280-9.
- Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Rohlfing T, Sullivan EV. MRI estimates of brain iron concentration in normal aging: Comparison of field-dependent (FDRT) and phase (SWI) methods. *NeuroImage* 2009;47:493-500.
- Taubert M, Roggenhofer E, Melie-Garcia L, Muller S, Lehmann N, Preisig M, Vollenweider P, Marques-Vidal P, Lutti A, Kherif F, Draganski B. Converging patterns of aging-associated brain volume loss and tissue microstructure differences. *Neurobiol Aging* 2020;88:108-18.
- Wang Y, Liu T. Quantitative susceptibility mapping (QSM): Decoding MRI data for a tissue magnetic biomarker. *Magn Reson Med* 2015;73:82-101.
- Langkammer C, Bredies K, Poser BA, Barth M, Reishofer G, Fan AP, Bilgic B, Fazekas F, Mainero C, Ropele S. Fast quantitative susceptibility mapping using 3D EPI and total generalized variation. *NeuroImage* 2015;111:622-30.
- Acosta-Cabronero J, Milovic C, Mattern H, Tejos C, Speck O, Callaghan MF. A robust multi-scale approach to quantitative susceptibility mapping. *NeuroImage* 2018;183:7-24.
- Dusek P, Dezortova M, Wuertel J. Imaging of iron. *Int Rev Neurobiol* 2013;110:195-239.
- Burgetova A, Seidl Z, Krasensky J, Horakova D, Vaneckova M. Multiple sclerosis and the accumulation of iron in the Basal Ganglia: quantitative assessment of brain iron using MRI $t(2)$ relaxometry. *Eur Neurol* 2010;63:136-43.
- Connor JR, Menzies SL, Martin SMS, Mufson EJ. Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* 1990;27:595-611.
- Daugherty A, Raz N. Age-related differences in iron content of subcortical nuclei observed in vivo: a meta-analysis. *NeuroImage* 2013;70:113-21.
- Schipper HM. Neurodegeneration with brain iron accumulation - clinical syndromes and neuroimaging. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:350-60.
- Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 2014;13:1045-60.
- Ghadery C, Pirpamer L, Hofer E, Langkammer C, Petrovic K, Loitfelder M, Schwingenschuh P, Seiler S,

- Duering M, Jouvent E, Schmidt H, Fazekas F, Mangin J-F, Chabriat H, Dichgans M, Ropele S, Schmidt R. R2* mapping for brain iron: associations with cognition in normal aging. *Neurobiol Aging* 2015;36:925-32.
15. Hallgren B, Sourander P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem* 1958;3:41-51.
 16. Ramos P, Santos A, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A. Iron levels in the human brain: a post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes. *J Trace Elem Med Biol* 2014;28:13-7.
 17. Li J, Cao F, Yin H, Huang Z, Lin Z, Mao N, Sun B, Wang G. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020;11:88.
 18. Schipper HM. Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing. *Ageing Res Rev* 2004;3:265-301.
 19. Daugherty AM, Haacke EM, Raz N. Striatal Iron Content Predicts Its Shrinkage and Changes in Verbal Working Memory after Two Years in Healthy Adults. *J Neurosci* 2015;35:6731-43.
 20. Kalpouzos G, Garzón B, Sitnikov R, Heiland C, Salami A, Persson J, Bäckman L. Higher Striatal Iron Concentration is Linked to Frontostriatal Underactivation and Poorer Memory in Normal Aging. *Cereb Cortex* 2017;27:3427-36.
 21. Aquino D, Bizzi A, Grisoli M, Garavaglia B, Bruzzone MG, Nardocci N, Savoirdo M, Chiapparini L. Age-related Iron Deposition in the Basal Ganglia: Quantitative Analysis in Healthy Subjects. *Radiology* 2009;252:165-72.
 22. Bilgic B, Pfefferbaum A, Rohlfing T, Sullivan EV, Adalsteinsson E. MRI estimates of brain iron concentration in normal aging using quantitative susceptibility mapping. *NeuroImage* 2012;59:2625-35.
 23. Gong NJ, Wong CS, Hui ES, Chan CC, Leung LM. Hemisphere, gender and age-related effects on iron deposition in deep gray matter revealed by quantitative susceptibility mapping. *NMR Biomed* 2015;28:1267-74.
 24. Haacke EM, Miao Y, Liu M, Habib CA, Katkuri Y, Liu T, Yang Z, Lang Z, Hu J, Wu J. Correlation of putative iron content as represented by changes in R2* and phase with age in deep gray matter of healthy adults. *J Magn Reson Imaging* 2010;32:561-76.
 25. Li W, Wu B, Batrachenko A, Bancroft-Wu V, Morey RA, Shashi V, Langkammer C, Bellis MDD, Ropele S, Song AW, Liu C. Differential developmental trajectories of magnetic susceptibility in human brain gray and white matter over the lifespan. *Hum Brain Mapp* 2014;35:2698-713.
 26. Liu M, Liu S, Ghassaban K, Zheng W, Diccio D, Miao Y, Habib C, Jazmati T, Haacke EM. Assessing global and regional iron content in deep gray matter as a function of age using susceptibility mapping. *J Magn Reson Imaging* 2016;44:59-71.
 27. Persson N, Wu J, Zhang Q, Liu T, Shen J, Bao R, Ni M, Liu T, Wang Y, Spincemaille P. Age and Sex Related Differences in Subcortical Brain Iron Concentrations among Healthy Adults. *NeuroImage* 2015;122:385-98.
 28. Acosta-Cabronero J, Betts MJ, Cardenas-Blanco A, Yang S, Nestor PJ. In Vivo MRI Mapping of Brain Iron Deposition across the Adult Lifespan. *J Neurosci* 2016;36:364-74.
 29. Betts MJ, Acosta-Cabronero J, Cardenas-Blanco A, Nestor PJ, Düzal E. High-resolution characterisation of the aging brain using simultaneous quantitative susceptibility mapping (QSM) and R2* measurements at 7T. *NeuroImage* 2016;138:43-63.
 30. Milovic C, Prieto C, Bilgic B, Uribe S, Acosta-Cabronero J, Irarrazaval P, Tejos C. Comparison of parameter optimization methods for quantitative susceptibility mapping. *Magn Reson Med* 2021;85:480-94.
 31. Huhdanpaa H, Hwang DH, Gasparian GG, Booker MT, Cen Y, Lerner A, Boyko OB, Go JL, Kim PE, Rajamohan A, Law M, Shiroishi MS. Image Coregistration: Quantitative Processing Framework for the Assessment of Brain Lesions. *J Digit Imaging* 2014;27:369-79.
 32. Li X, Chen L, Kuttan K, Ceritoglu C, Li Y, Kang N, Hsu J, Qiao Y, Wei H, Liu C, Miller M, Mori S, Yousem DM, van Zijl P, Faria AV. Multi-Atlas Tool for Automated Segmentation of Brain Gray Matter Nuclei and Quantification of their Magnetic Susceptibility. *NeuroImage* 2019;191:337-49.
 33. Mori S, Wu D, Ceritoglu C, Li Y, Kolasny A, Vaillant MA, Faria AV, Oishi K, Miller MI. MRICloud: Delivering High-Throughput MRI Neuroinformatics as Cloud-Based Software as a Service. *Comput Sci Eng* 2016;18:21-35.
 34. Avants BB, Tustison NJ, Song G, Gee JC. Ants: Open-source tools for normalization and neuroanatomy. *Heanet* 2009;10:1-11.
 35. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, Gerig G. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage* 2006;31:1116-28.
 36. Joliot M, Jobard G, Naveau M, Delcroix N, Petit L, Zago L, Crivello F, Mellet E, Mazoyer B, Tzourio-Mazoyer N. AICHA: An atlas of intrinsic connectivity of homotopic areas. *J Neurosci Methods* 2015;254:46-59.

37. van der Weijden MCM, van Laar PJ, Lambrechts RA, Verbeek DS, Tijssen MAJ. Cortical pencil lining on SWI MRI in NBIA and healthy aging. *BMC Neurol* 2019;19:233.
38. Liu C, Wei H, Gong NJ, Cronin M, Dibb R, Decker K. Quantitative Susceptibility Mapping: Contrast Mechanisms and Clinical Applications. *Tomography* 2015;1:3-17.
39. Ning N, Liu C, Wu P, Hu Y, Zhang W, Zhang L, Li M, Gho SM, Kim DH, Guo H, Yang J, Jin C. Spatiotemporal variations of magnetic susceptibility in the deep gray matter nuclei from 1 month to 6 years: A quantitative susceptibility mapping study. *J Magn Reson Imaging* 2019;49:1600-9.
40. Peterson ET, Kwon D, Luna B, Larsen B, Prouty D, Bellis MDD, Voyvodic J, Liu C, Li W, Pohl KM, Sullivan EV, Pfefferbaum A. Distribution of brain iron accrual in adolescence: Evidence from cross-sectional and longitudinal analysis. *Hum Brain Mapp* 2019;40:1480-95.
41. Hagemeyer J, Dwyer MG, Bergsland N, Schweser F, Magnano CR, Heininen-Brown M, Ramasamy DP, Carl E, Kennedy C, Melia R, Polak P, Deistung A, Geurts JJG, Reichenbach JR, Zivadinov R. Effect of age on MRI phase behavior in the subcortical deep gray matter of healthy individuals. *Am J Neuroradiol* 2013;34:2144-51.
42. Zhang Y, Wei H, Cronin MJ, He N, Yan F, Liu C. Longitudinal atlas for normative human brain development and aging over the lifespan using quantitative susceptibility mapping. *NeuroImage* 2018;171:176-89.
43. Burgetova A, Dusek P, Vaneckova M, Horakova D, Langkammer C, Krasensky J, Sobisek L, Matras P, Masek M, Seidl Z. Thalamic Iron Differentiates Primary-Progressive and Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Am J Neuroradiol* 2017;38:1079-86.
44. Steiger TK, Weiskopf N, Bunzeck N. Iron Level and Myelin Content in the Ventral Striatum Predict Memory Performance in the Aging Brain. *J Neurosci* 2016;36:3552-8.
45. Branson HM. Normal Myelination: A Practical Pictorial Review. *Neuroimaging Clin N Am* 2013;23:183-95.
46. Dezortova M, Lescinskij A, Dusek P, Herynek V, Acosta-Cabronero J, Bruha R, Jiru F, Robinson SD, Hajek M. Multiparametric Quantitative Brain MRI in Neurological and Hepatic Forms of Wilson's Disease. *J Magn Reson Imaging* 2020;51:1829-35.
47. Pudlac A, Burgetova A, Dusek P, Nytrova P, Vaneckova M, Horakova D, Krasensky J, Lambert L. Deep Gray Matter Iron Content in Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis. *Biomed Res Int* 2020;2020:6492786.
48. Schweser F, Hagemeyer J, Dwyer MG, Bergsland N, Hametner S, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R. Decreasing brain iron in multiple sclerosis: The difference between concentration and content in iron MRI. *Hum Brain Mapp* 2021;42:1463-74.

Cite this article as: Burgetova R, Dusek P, Burgetova A, Pudlac A, Vaneckova M, Horakova D, Krasensky J, Varga Z, Lambert L. Age-related magnetic susceptibility changes in deep grey matter and cerebral cortex of normal young and middle-aged adults depicted by whole brain analysis. *Quant Imaging Med Surg* 2021. doi: 10.21037/qims-21-87

Supplementary

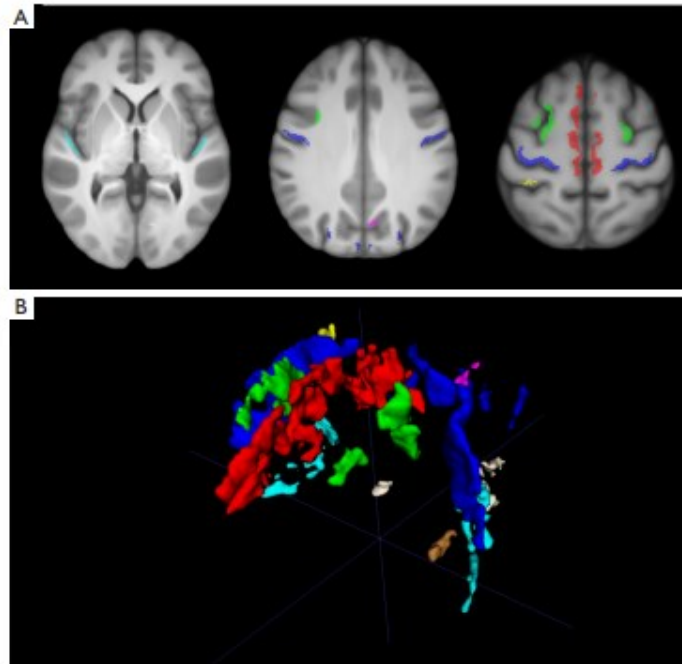


Figure S1 Cortical regions of interest manually segmented on a mask containing cortical voxels with positive association between magnetic susceptibility and age are shown A) on axial T1WI anatomical images and B) as an 3D reconstruction (left frontolateral view). Cortical ROIs include precentral gyrus (blue), postcentral gyrus (yellow), dorsolateral prefrontal cortex (green), medial prefrontal cortex (red), insular cortex (cyan), precuneus (magenta), occipital cortex (dark blue), occipito-temporal cortex (beige), and cerebellar vermis (brown). Abbreviations: T1WI = T1-weighted image; ROI = region of interest.

Table S1 Comparison of linear, quadratic, and exponential models for age-related susceptibility changes (best model fit based on Akaike information criterion with correction for small sample sizes, R^2 , and RMSE is shown in blue)

Region	Model											
	linear				quadratic				exponential			
	R^2	R^2 adj	RMSE	AICc	R^2	R^2 adj	RMSE	AICc	R^2	R^2 adj	RMSE	AICc
red nucleus	0.33	0.32	19.39	568.6	0.33	0.31	19.38	570.6	0.33	0.31	19.37	570.5
putamen	0.39	0.39	11.38	467.3	0.39	0.38	11.38	469.5	0.39	0.38	11.38	469.5
substantia nigra	0.18	0.17	16.76	540.9	0.19	0.17	16.65	541.8	0.19	0.17	16.64	541.7
dentate nucleus	0.09	0.08	23.42	604.5	0.10	0.08	23.41	606.5	0.10	0.08	23.39	606.4
external globus pallidus	0.17	0.16	14.4	512	0.19	0.17	14.24	512	0.17	0.15	14.4	514.2
caudate nucleus	0.18	0.18	9.98	442.4	0.18	0.17	9.98	444.5	0.18	0.17	9.98	444.5
subthalamic nucleus	0.05	0.04	18.6	560.6	0.07	0.05	18.39	560.7	0.07	0.05	18.48	561.6
pulvinar	0.12	0.12	11.3	465.9	0.15	0.13	11.17	465.9	0.15	0.14	11.11	464.9
internal globus pallidus	0.02	0.01	13.98	506.4	0.02	0.00	13.97	508.5	0.02	0.00	13.98	508.6
thalamus	0.01	0.00	3.88	262.8	0.05	0.02	3.81	261.4	0.00	-0.02	3.90	265.8
precentral gyrus	0.50	0.49	3.01	214.4	0.52	0.51	2.94	214.4	0.51	0.50	2.95	213.0
DLPFC	0.39	0.39	2.50	179.6	0.40	0.39	2.49	180.6	0.40	0.39	2.49	180.5
MPFC	0.53	0.53	2.29	162.5	0.54	0.53	2.27	163.3	0.54	0.53	2.27	163.4
Insular cortex	0.57	0.56	2.86	205.2	0.58	0.57	2.83	205.2	0.58	0.57	2.83	205.3
postcentral gyrus	0.27	0.26	3.987	267.8	0.27	0.26	3.98	270.0	0.27	0.26	3.98	270.0
precuneus	0.28	0.27	4.20	278.1	0.28	0.27	4.20	280.3	0.28	0.27	4.20	280.3
Occipitotemporal cortex	0.49	0.49	3.53	244.7	0.51	0.50	3.46	243.1	0.51	0.50	3.47	243.8
Occipital cortex	0.33	0.32	4.21	278.1	0.33	0.32	4.20	280.1	0.33	0.31	4.21	280.3
Cerebellar vermis	0.18	0.17	6.92	372.7	0.18	0.17	6.91	374.7	0.18	0.17	6.92	374.9
total white matter	0.10	0.09	1.00	4.9	0.10	0.08	0.995	6.6	0.10	0.08	1.0	6.69

Degrees of freedom = 93 for linear models and 92 for quadratic and exponential models.

Abbreviations: RMSE = root-mean-square deviation, AICc = Akaike information criterion with correction for small sample sizes; adj = adjusted, DLPFC = dorsolateral prefrontal cortex, MPFC = medial prefrontal cortex

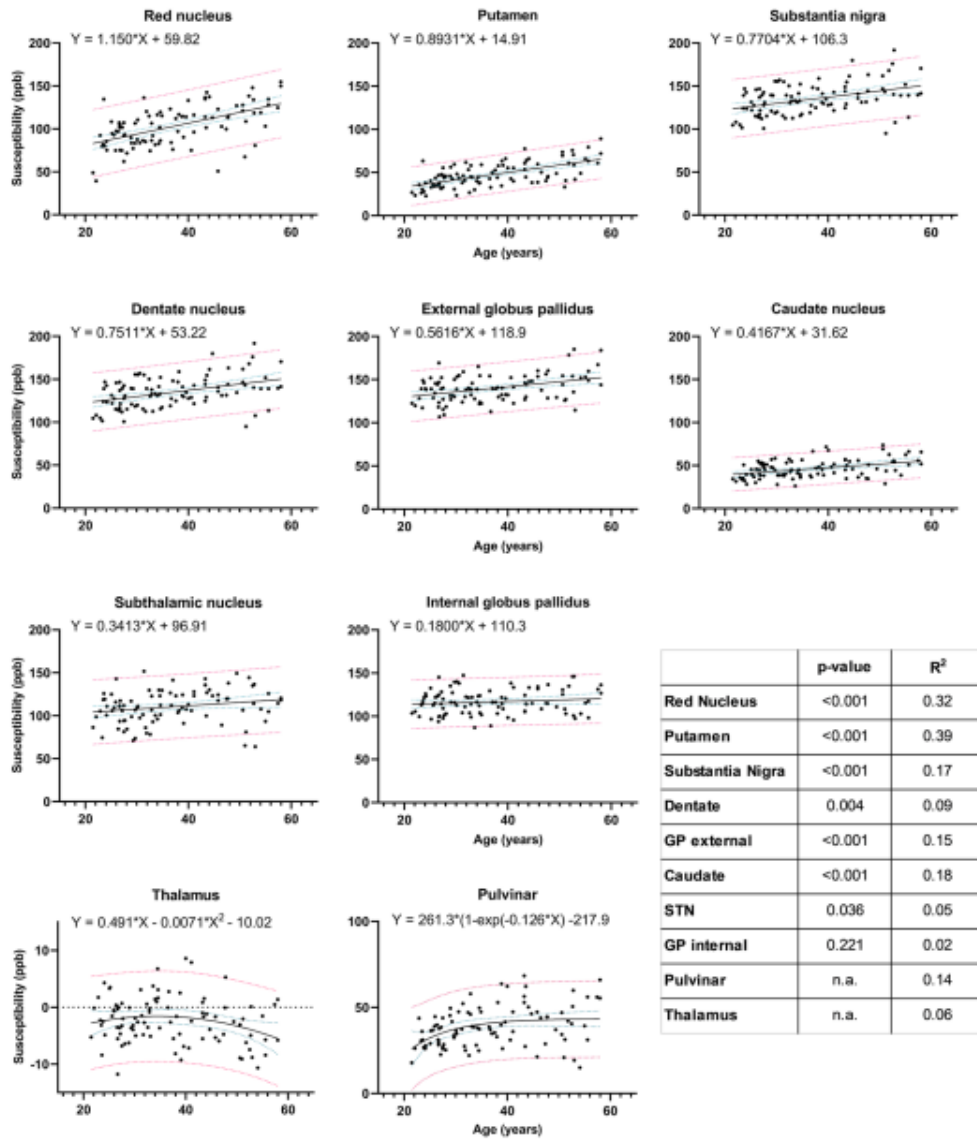
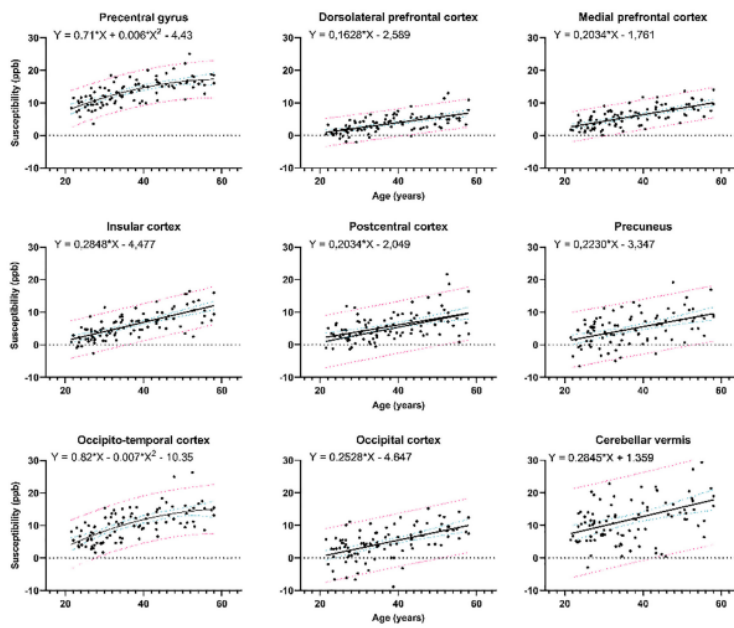


Figure S2 Corrected bulk magnetic susceptibility values (reference region = total white matter) in ppb in deep gray matter structures as a function of age with their respective regression fits and coefficients. Blue dotted lines represent 95% confidence bands of the regression fit and red dotted lines represent 95% population prediction bands. Please note different Y-axis range for thalamus and pulvinar. Abbreviations: ppb = parts per billion; GP = globus pallidus; STN = subthalamic nucleus; n.a. = not available.



	p-value	R ²
Precentral	n.a.	0.50
DLPFC	<0.001	0.39
MPFC	<0.001	0.46
Insular	<0.001	0.52
Postcentral	<0.001	0.24
Precuneus	<0.001	0.23
Occipito-temporal	n.a.	0.45
Occipital	<0.001	0.29
Vermis	<0.001	0.16

Figure S3 Corrected bulk magnetic susceptibility values (reference region = total white matter) in ppb in cortical regions of interest as a function of age with their respective regression fits. Blue dotted lines represent 95% confidence bands of the regression fit and red dotted lines represent 95% population prediction bands. Abbreviations: ppb = parts per billion; DLPFC = dorsolateral prefrontal cortex; MPFC = medial prefrontal cortex; n.a. = not available.

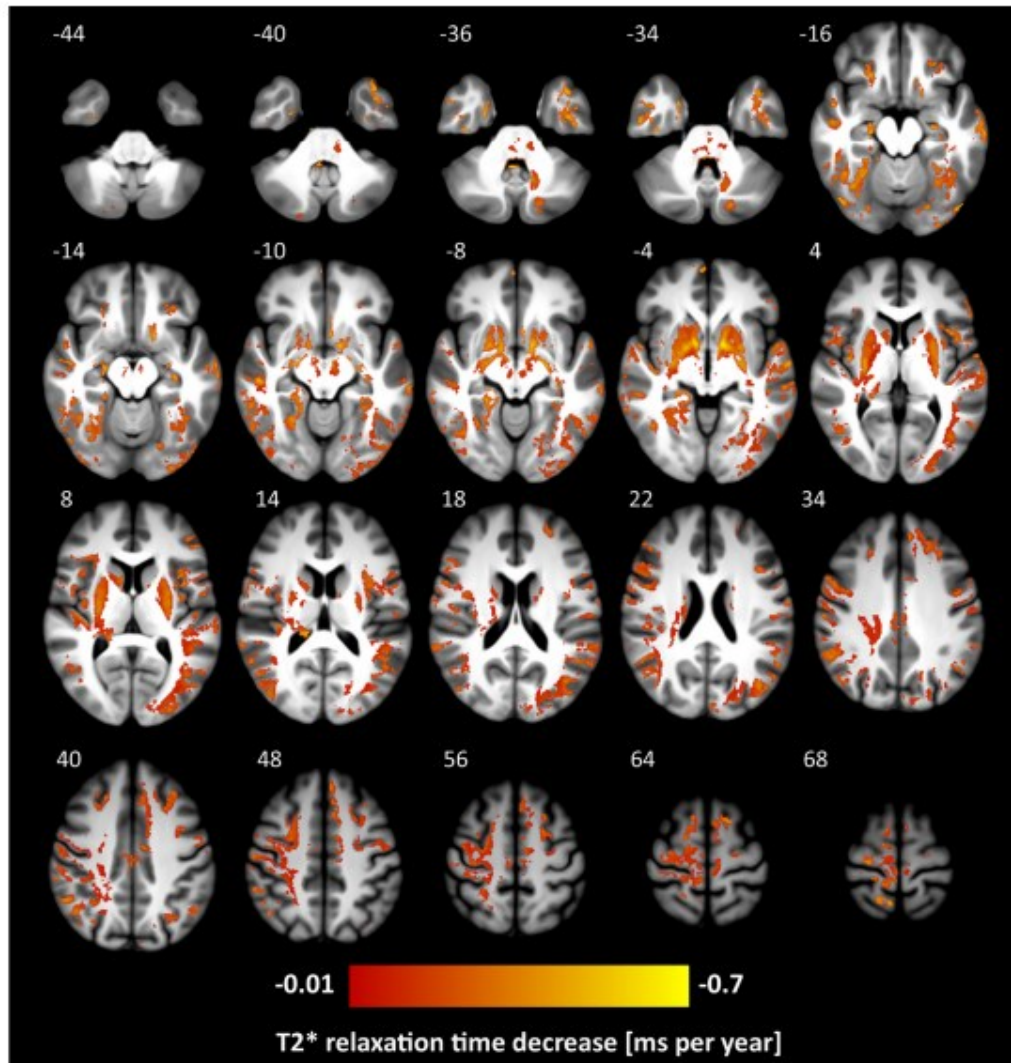


Figure S4 Statistical map of age-related T2* changes in the brain of normal adults represented as T2* relaxation time decrease in ms per year (thresholded at $p < 0.05$ at cluster level and corrected for family-wise error; initial cluster definition threshold was set to $p < 0.005$ uncorrected). Z-coordinate in the MNI space in [mm] is indicated for each slice.

Table S2 Clusters with significant age-related T2* relaxation time decrease identified by whole brain analysis with corresponding anatomical locations. Deep gray matter structures are in bold.

Cluster volume [mm ³]	Peak T2* relaxation time change [ms/year]	Peak T value	MNI coordinates [mm]			Peak Structure	Anatomical structures within cluster
			X	Y	Z		
28449	-0.7	6.5	-28	-34	-24	Inferior Temporal	Left Inferior, Middle, and Superior Temporal, Fusiform, Lateral, Middle, and Inferior Occipital gyri
52282	-0.7	9.6	14	-34	-6	Putamen	Right Putamen, Caudate, Globus Pallidus, Thalamus Pulvinar, Substantia nigra, Nucleus Ruber
8498	-0.7	8.4	-12	3	-5	Putamen	Left Putamen, Caudate, Globus Pallidus, Substantia nigra, Nucleus Ruber
191	-0.7	4.9	31	-36	0	Hippocampus	Right Hippocampus
430	-0.7	5.1	-33	-29	-8	Hippocampus	Left Hippocampus, ParaHippocampal gyrus
760	-0.6	4.3	36	-77	-18	Lateral Occipital	Right Lateral Occipital, Inferior Occipital gyri, Occipital pole
527	-0.6	6.2	48	-24	17	Posterior Insula	Right Posterior Insula, Supramarginal gyri
422	-0.6	4.3	21	-6	-27	Fusiform	Right Fusiform, Inferior Temporal, ParaHippocampal gyri
1051	-0.6	5.9	-3	-15	-19	Pons	Pons, Mesencephalon
191	-0.5	6.3	-3	14	-7	Anterior Cingulum	Left Anterior Cingulum, Subcallosal gyri
1543	-0.5	4.8	21	34	-22	OrbitoFrontal	Right OrbitoFrontal, Inferior Frontal gyri, Orbital, Anterior Rostral sulci
2186	-0.5	5.0	67	-39	2	Superior Temporal	Right Superior, Middle, and Inferior Temporal, Middle and Inferior Occipital
1227	-0.5	5.2	1	-16	29	Posterior Cingulate	Right Posterior and Middle Cingulate, Cingulate sulcus, Corpus callosum
572	-0.5	4.8	31	29	2	Anterior Insula	Right Anterior Insula, Inferior Frontal gyrus
3274	-0.5	6.1	-43	10	3	Anterior Insula	Left Anterior Insula, Inferior Frontal, Precentral gyri, Rolandic Operculum
528	-0.5	4.3	32	-71	46	Intraparietal sulcus	Right Intraparietal, Intraoccipital sulci, Middle Occipital gyrus
2405	-0.5	5.5	53	-51	42	Angular	Right Angular, Supramarginal, Inferior Parietal, Superior Temporal gyri
322	-0.5	4.4	8	-53	68	Precuneus	Right Precuneus, Parietal Superior, Cingulate gyri
1577	-0.5	5.3	-39	16	-42	Temporal Pole	Left Temporal pole, Inferior Temporal gyrus
10299	-0.5	5.9	-4	16	50	Superior Frontal	Left Superior and Middle Frontal, Cingulate, Supplementary Motor area, Paracentral Lobule
359	-0.5	5.5	7	-6	50	Cingulate sulcus	Right Cingulate, Paracentral Lobule
1950	-0.5	5.1	-59	-15	37	Rolandic sulcus	Left Rolandic, Precentral, Postcentral, Inferior and Middle Frontal
1379	-0.4	4.5	-53	34	5	Inferior Frontal	Left Inferior Frontal
1392	-0.4	4.8	49	24	20	Inferior frontal	Right Inferior and Middle Frontal, Precentral sulcus
1433	-0.4	5.2	-21	-79	-16	Left Lingual	Left Lingual, Calcarine gyri
500	-0.4	5.5	-18	-76	-35	Cerebellum	Left Cerebellum
426	-0.4	4.2	-24	28	-19	Orbital sulcus	Left Orbital sulcus, Inferior Frontal gyrus
912	-0.4	4.7	18	-75	-53	Cerebellum	Right Cerebellum
644	-0.4	5.2	-25	-63	42	Intraparietal sulcus	Left Intraparietal, Parietooccipital sulci, Precuneus
522	-0.3	4.7	-13	-56	-36	Dentate	Left Dentate
313	-0.3	5.2	-63	-17	19	Posterior Insula	Left Posterior Insula, Rolandic Operculum, Postcentral gyrus

Article

Oxidative Stress Markers in Cerebrospinal Fluid of Newly Diagnosed Multiple Sclerosis Patients and Their Link to Iron Deposition and Atrophy

Andrea Burgetova ¹, Petr Dusek ^{1,2}, Tomas Uher ², Manuela Vaneckova ¹, Martin Vejrazka ², Romana Burgetova ^{1,4}, Dana Horakova ², Barbora Srpova ², Jan Krasensky ¹ and Lukas Lambert ^{1,*}

¹ Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 120 00 Prague, Czech Republic; andrea.burgetova@vfn.cz (A.B.); petr.dusek@vfn.cz (P.D.); manuela.vaneckova@vfn.cz (M.V.); romana.burgetova@fnkv.cz (R.B.); jan.krasensky@vfn.cz (J.K.)

² Department of Neurology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 120 00 Prague, Czech Republic; tomas.uher@vfn.cz (T.U.); dana.horakova@vfn.cz (D.H.); barbora.srpova@vfn.cz (B.S.)

³ Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 120 00 Prague, Czech Republic; martin.vejrazka@vfn.cz

⁴ Department of Radiology, Third Faculty of Medicine, Charles University, 100 34 Prague, Czech Republic

* Correspondence: lukas.lambert@vfn.cz; Tel.: +420-22496-2232

Citation: Burgetova, A.; Dusek, P.; Uher, T.; Vaneckova, M.; Vejrazka, M.; Burgetova, R.; Horakova, D.; Srpova, B.; Krasensky, J.; Lambert, L. Oxidative Stress Markers in Cerebrospinal Fluid of Newly Diagnosed Multiple Sclerosis Patients and Their Link to Iron Deposition and Atrophy. *Diagnostics* **2022**, *12*, 1365. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061365>

Academic Editor: Massimiliano Calabrese

Received: 9 May 2022

Accepted: 30 May 2022

Published: 1 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Oxidative stress has been implied in cellular injury even in the early phases of multiple sclerosis (MS). In this study, we quantified levels of biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in cerebrospinal fluid (CSF) in newly diagnosed MS patients and their associations with brain atrophy and iron deposits in the brain tissue. Consecutive treatment-naive adult MS patients ($n = 103$) underwent brain MRI and CSF sampling. Healthy controls (HC, $n = 99$) had brain MRI. CSF controls ($n = 45$) consisted of patients with non-neuroinflammatory conditions. 3T MR included isotropic T1 weighted (MPRAGE) and gradient echo (GRE) images that were processed to quantitative susceptibility maps. The volume and magnetic susceptibility of deep gray matter (DGM) structures were calculated. The levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), 8-iso prostaglandin F_{2α} (8-isoPG), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), peroxiredoxin-2 (PRDX2), and malondialdehyde and hydroxyalkenals (MDA + HAE) were measured in CSF. Compared to controls, MS patients had lower volumes of thalamus, pulvinar, and putamen, higher susceptibility in caudate nucleus and globus pallidus, and higher levels of 8-OHdG, PRDX2, and MDA + HAE. In MS patients, the level of NGAL correlated negatively with volume and susceptibility in the dentate nucleus. The level of 8-OHdG correlated negatively with susceptibility in the caudate, putamen, and the red nucleus. The level of PRDX2 correlated negatively with the volume of the thalamus and both with volume and susceptibility of the dentate nucleus. From MRI parameters with significant differences between MS and HC groups, only caudate susceptibility and thalamic volume were significantly associated with CSF parameters. Our study shows that increased oxidative stress in CSF detected in newly diagnosed MS patients suggests its role in the pathogenesis of MS.

Keywords: multiple sclerosis; magnetic resonance imaging; cerebrospinal fluid; oxidative stress; peroxiredoxin; neutrophil gelatinase-associated lipocalin

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic neuroinflammatory demyelinating disease with progressive deterioration of disability in the majority of untreated patients. Although the main pathological mechanism is an aberrant immunological response, there is a complex interaction of genetic and environmental factors as well as neuroprotective and repair

mechanisms [1]. Oxidative stress and its modulation have been implied in the formation, sustenance, and termination of cell injury in MS [2,3].

The levels of oxidative stress markers can be estimated in patients from peripheral blood, cerebrospinal fluid (CSF), or locally by microdialysis. Since CSF is directly connected to extracellular space, its analysis may better reflect homeostasis in the brain microenvironment compared to peripheral blood analysis [4]. Oxidative stress markers including malondialdehyde (MDA), 4-hydroxyalkenals (HAE), isoprostane 8-iso-PGF_{2α} (8-isoPG) have been reported to be elevated in CSF of MS patients [1,5]. The 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), a product of oxidative DNA damage in CSF, has been implied in carcinogenesis, neurodegeneration, but not specifically in MS [6,7]. Peroxiredoxins represent a family of highly efficient peroxidases that are upregulated in astrocytes in MS lesions [4]. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) acts in multiple signaling pathways that regulate inflammation, iron homeostasis, and cell death [8]. The above-mentioned substances have been investigated in MS patients, but the evidence for their dysregulation is limited, especially in the early phases of MS.

Newly diagnosed MS patients already show accelerated tissue loss of deep grey matter (DGM), particularly in the thalamus [9]. Iron accumulation in DGM in MS patients is also an early phenomenon, which is already detectable at the transition from clinically isolated syndrome to clinically definite MS [10]. Iron concentration in the DGM correlates with clinical severity and predicts future disability [11,12]. Iron balance is tightly linked with inflammation and many proteins involved in cellular iron homeostasis are altered by inflammatory stimuli resulting in cellular iron retention [13]. Iron dysregulation is supposed to trigger oxidative stress. However, the link between oxidative stress, brain atrophy, and iron concentration in DGM structures in MS has not been sufficiently established.

The main aim of this study was to examine biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in CSF in newly diagnosed untreated MS patients and their associations with the severity of brain atrophy and iron deposits in DGM.

2. Materials and Methods

This study (ClinicalTrials.gov ID: NCT03706118) was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague (ID1018/17), it was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and all subjects signed informed consent.

2.1. Study Participants

MS patients ($n = 103$): de novo treatment-naïve MS patients diagnosed between August 2017 and January 2020 underwent neurological examination including Expanded Disability Status Scale (EDSS), brain MRI, and CSF sampling. The inclusion criteria were: age ≥ 18 years and diagnosis of MS according to the 2017 McDonald criteria [14]. We excluded patients with major diseases affecting brain health and pregnant women.

Two different groups of controls were used for brain MRI and CSF biochemical comparisons.

Healthy controls (HC) for brain MRI were recruited from the general community [15]. The controls were free of neurologic or other medical disorders affecting brain health and had a normal neurological examination. From the original group of 111 subjects, we selected 99 HC with an age range comparable to MS patients by excluding older subjects.

CSF controls: for CSF comparison, samples from 45 controls with different non-neuroinflammatory conditions were selected from our CSF biobank. The control group included 37 patients with non-inflammatory neurological disorders and 8 patients undergoing spinal anesthesia for urologic surgery.

2.2. Imaging Protocol

MRI examination was performed and processed as previously published [15]: Magnetization Prepared Rapid Gradient-Echo (MPRAGE, TE: 2.96 ms, TI 900 ms TR: 2300 ms, spatial resolution: $1 \times 1 \times 1$ mm), gradient-echo (GRE, 6 TEs: 4.5–29.5 ms, evenly spaced, TR: 33 ms, spatial resolution: $0.94 \times 0.94 \times 0.94$ mm), and Fluid-Attenuated Inversion Recovery (FLAIR, TE 397 ms, TI 1800 ms, TR 5000 ms, spatial resolution $1 \times 1 \times 1$ mm) pulse sequences were acquired on a 3T MRI scanner (Siemens Skyra 3T, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) with a 20 channel head coil.

2.3. Image Processing

GRE images were processed to quantitative susceptibility mapping (QSM) maps, co-registered with MPRAGE using SPM12 running under Matlab v. 2020a (The Math Works, Inc., Natick, MA, USA). Co-registered skull-stripped QSM and MPRAGE images entered a fully automated multi-atlas segmentation pipeline using dual (QSM and T1-weighted) contrast for delineation of DGM nuclei implemented with a cloud-based platform (www.mricloud.org) (Figure 1) [16]. Segmentation of DGM structures in all subjects was visually checked for errors, particularly for potential misclassifications of demyelinating lesions in the DGM. Volumes were adjusted to the total intracranial volume (TIV) and reported as the sum of bilateral structures. QSM measurements were referenced to the susceptibility of a manually drawn region in the parietooccipital white matter avoiding white-matter lesions [15]. White matter lesions were segmented by the lesion growth algorithm [17] as implemented in the LST toolbox version 3.0.0 (www.statistical-modeling.de/lst.html) for SPM. The optimal initial threshold (κ) was determined by visual inspection and set to 0.15. Lesion segmentation in all subjects were visually checked and false-positive voxels were manually deleted.

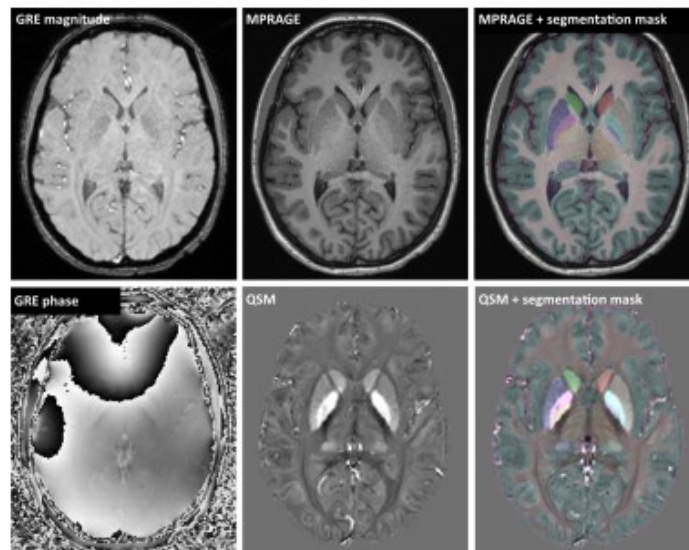


Figure 1. Example MRI images: gradient-echo (GRE) magnitude and phase images were processed to quantitative susceptibility map (QSM). Multi-atlas segmentation employed coregistered QSM and MPRAGE images to generate masks of deep grey matter structures, cerebral white and grey matter, and CSF.

2.4. CSF Assays

CSF was drawn from L5-S1, L4-5, or L3-4 interspace in an upright sitting position in the morning hours using a standard sterile preparation and 20 G atraumatic needle. A total of 20–25 mL of CSF and 5 mL volume of blood were obtained. CSF was immediately centrifuged at 3000× g rpm and 4 °C; the supernatant was aliquoted and frozen at −80 °C.

For CSF assays, the samples were centrifuged after thawing and kept on ice. All samples were assayed in duplicates.

8-iso prostaglandin F_{2α} (8-isoPG, 8-isoprostane) was determined immunochemically by a non-competitive ELISA with biotinylated anti-human 8-isoPG antibody. Human 8-iso prostaglandin ELISA kit (cat. No. MBS160287, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA) was employed. The calibration ranged from 0 to 640 ng/L and was linear throughout the whole range.

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL, lipocalin-2) was assayed using a non-competitive ELISA (cat. No. MBS5644140, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA). Samples were diluted 10 times prior to use. The calibration ranged from 0 to 10 ng/mL and was linear in the whole range.

Peroxiredoxin-2 (PRDX2) was determined immunochemically by a non-competitive ELISA with biotinylated anti-human PRDX2 antibody (cat. No. ELH-PRDX2, RayBiotech, Norcross, GA, USA). Samples were diluted 5 times prior to use. The calibration ranged from 0 to 12.8 ng/mL. Polynomial regression of 2nd order was employed to estimate the concentrations of samples.

Products of lipid peroxidation were assayed by a colorimetric assay based on N-methyl-2-phenylindole (Bioxytech LPO-586 kit, cat. No. 21012, OXIS International, Inc., Foster City, CA, USA). Methanesulphonic acid was used as the acid solvent in the procedure for simultaneous determination of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals (MDA + HAE). Samples for MDA + HAE assay were stabilized with butylated hydroxytoluene (BHT); 20 µL of 0.2% BHT was added to 200 µL of CSF immediately after sampling, before freezing to −80 °C. In the assay, tetramethoxypropane was used as the calibrator in concentrations from 0 to 4 µmol/L.

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) was assayed by a competitive ELISA (Bioxytech 8-OHdG EIA Kit, cat. No. 21026, OXIS International, Inc., Foster City, CA, USA). The calibration was performed for concentrations 0.5 to 8 ng/mL and was linear in this range.

In MS patients, CSF samples in sufficient quantity for the analysis of 8-OHdG, 8-isoPG, NGAL, and PRDX2 were available in 62 patients and for the analysis of MDA + HAE in 37 patients.

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in SPSS (IBM, Armonk, NY). Dichotomous and continuous variables were compared using the Fisher test, the *t*-test, the Mann-Whitney test, or the generalized linear model (GLM) as appropriate according to the distribution of the data. Grubb's test was used to identify significant outliers ($p < 0.05$). Age and sex-adjusted partial correlation coefficients among biochemical markers and deep gray matter volumes and susceptibilities in newly diagnosed MS patients were calculated. *p* values were adjusted to age and sex. A *p*-value below 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Comparison of MS Patients and HC MRI

Brain volumetry and quantification of susceptibility in the DGM structures are shown in Table 1. Compared to HC, MS patients had lower brain parenchymal fraction ($p = 0.001$), a smaller volume of thalamus ($p < 0.001$), pulvinar ($p < 0.001$) and putamen ($p = 0.002$), and higher susceptibility in the caudate nucleus ($p = 0.041$) and globus pallidus internus ($p = 0.015$).

Table 1. Comparison of DGM volumes and susceptibilities in MS patients and controls.

	MS (n = 103)		MRI Controls (n = 99)		p-Value
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	
Sex (male/female)	28/75		38/61		0.090
Age (years)	32.5	8.0	33.7	8.3	0.305
EDSS (median, IQR)	2	1.5–2.5	-	-	-
Lesion load (cm ³)	2.7	5.3	-	-	-
Lesion count (median, IQR)	7	4–20	-	-	-
Brain parenchymal fraction (%)	80.3	3.4	81.5	2.8	0.001
DGM Volumes (cm³)					
caudate	8.0	0.7	8.1	0.6	0.240
GPI	1.1	0.1	1.1	0.1	0.230
GPE	3.1	0.3	3.2	0.3	0.528
putamen	8.7	0.7	9.0	0.8	0.002
thalamus	9.6	0.6	9.9	0.6	<0.001
pulvinar	2.3	0.3	2.5	0.3	<0.001
subthalamic nucleus	0.3	0.1	0.4	0.1	0.310
substantia nigra	1.3	0.1	1.4	0.2	0.163
red nucleus	0.6	0.1	0.6	0.1	0.710
dentate	1.8	0.4	1.8	0.3	0.711
DGM Susceptibilities (ppb)					
Caudate	24.5	5.8	23.0	4.7	0.041
GPI	53.1	6.4	50.9	5.7	0.015
GPE	62.8	7.7	62.2	6.8	0.594
Putamen	23.6	6.7	23.6	6.1	0.977
Thalamus	0.9	2.3	1.0	2.0	0.728
Pulvinar	17.9	5.2	18.3	5.2	0.582
subthalamic nucleus	41.9	7.3	43.2	6.9	0.214
substantia nigra	53.4	7.3	52.2	6.6	0.099
red nucleus	39.2	7.8	39.7	8.1	0.639
Dentate	37.4	8.6	36.9	9.8	0.693

DGM, deep gray matter; IQR, interquartile range; EDSS, expanded disability status scale; GPI, globus pallidus internus; GPE, globus pallidus externus; ppb, parts per billion. *p*-values are adjusted for age and sex. Significant differences are in bold.

3.2. Comparison of CSF Biochemical Markers in MS Patients and Controls

CSF was available in 62 newly diagnosed MS patients. The control CSF group was older compared to MS patients (33 ± 9 vs. 40 ± 12 years, $p < 0.001$). Patients with MS had higher values of 8-OHdG ($p = 0.041$), PRDX2 ($p = 0.015$), and lipoperoxidation markers (MDA + HAE; $p = 0.003$) compared to HC (Table 2).

Table 2. Comparison of CSF biochemical markers in MS patients and controls.

	MS (n = 62)		CSF Controls (n = 45)		p-Value
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	
Sex (male/female)	19/43		20/25		0.143
Age (years)	33.3	8.6	40.2	11.6	<0.001
CSF sampling to MRI interval (months)	1.1	3.9	n.d.	n.d.	n.d.
Cerebrospinal Fluid Analysis					
8-OHdG (ng/mL)	0.112 (median = 0)	0.310 (IQR = 0 to 0)	0.026 (median = 0)	0.122 (IQR = 0 to 0)	0.041 ¹
8-isoPG (ng/L)	44.319	13.611	41.071	9.679	0.447
NGAL (ng/mL)	4.366	2.085	4.968	2.226	0.473
PRDX2 (ng/mL)	10.966	2.961	9.437	3.945	0.015
MDA + HAE (μmol/L)	0.605 ²	0.264 ²	0.448	0.153	0.003

¹ Mann-Whitney U test; other analyses performed using GLM with age and sex as covariates; ² n = 37; CSF, cerebrospinal fluid; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-isoPG, 8-isoprostane; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; PRDX2, peroxiredoxin-2; MDA + HAE, malondialdehyde and hydroxyalkenals; n.d., not determined. p-values are adjusted for age and sex. Significant differences are in bold.

3.3. Correlations between CSF Biochemical Markers and MRI Parameters

In MS patients, the correlations between CSF and MRI parameters were low to moderate. From MRI parameters with significant differences between MS and HC groups, only caudate susceptibility and thalamic volume were significantly associated with CSF parameters. The level of 8-OHdG correlated negatively with the susceptibility in the caudate, putamen, and the red nucleus. The level of 8-isoPG correlated negatively with susceptibility in the globus pallidus externus. The level of NGAL correlated negatively with susceptibility and volume in the dentate. The level of PRDX2 correlated negatively with the volume of the thalamus and both susceptibility and volume of the dentate nucleus (Figure 2). There was a negative correlation between lipoperoxidation markers and the volume of the globus pallidus and subthalamic nucleus (Table 3). None of the biochemical markers was significantly associated with T2 lesion volume, lesion count, or EDSS.

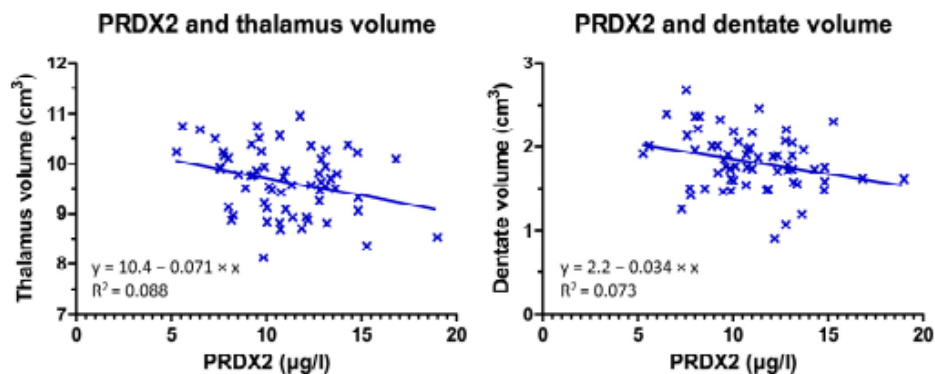


Figure 2. Scatter plot and regression line show negative correlation between PRDX2 and volume of the thalamus (left) and the dentate nucleus (right).

Table 3. Age and sex-adjusted partial correlation coefficients among biochemical markers and deep gray matter volumes and susceptibilities in early MS patients.

Structure	8-OHdG		8-isoPG		NGAL		PRDX2		MDA + HAE	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Volume										
caudate	0.017	0.899	-0.147	0.271	-0.170	0.195	-0.236	0.069	-0.328	0.055
globus pallidus int.	0.175	0.181	-0.020	0.879	0.039	0.765	-0.005	0.971	-0.459	0.006
globus pallidus ext.	0.195	0.136	-0.199	0.134	-0.081	0.539	-0.083	0.529	-0.433	0.009
putamen	0.115	0.380	0.022	0.869	-0.137	0.297	-0.069	0.602	-0.008	0.963
thalamus	0.074	0.575	-0.028	0.833	-0.045	0.733	-0.341	0.008	0.025	0.886
pulvinar thalami	0.129	0.328	0.036	0.786	-0.067	0.613	-0.240	0.064	0.020	0.909
subthalamic nucleus	0.032	0.806	-0.189	0.155	0.008	0.950	0.011	0.934	-0.374	0.027
substantia nigra	0.002	0.990	-0.115	0.391	-0.145	0.268	-0.112	0.393	-0.229	0.187
red nucleus	0.046	0.724	-0.152	0.256	-0.036	0.786	-0.034	0.795	-0.299	0.081
dentate	-0.014	0.916	-0.097	0.471	-0.292	0.023	-0.291	0.024	-0.261	0.130
Susceptibility										
caudate	-0.283	0.026	-0.098	0.450	0.009	0.942	-0.042	0.747	0.200	0.234
globus pallidus int	0.029	0.821	-0.141	0.276	0.120	0.352	0.124	0.339	0.207	0.220
globus pallidus ext	-0.037	0.777	-0.276	0.030	0.017	0.894	0.097	0.452	0.283	0.089
putamen	-0.396	0.001	-0.095	0.462	0.031	0.808	-0.058	0.654	0.213	0.205
thalamus	0.139	0.280	0.103	0.426	-0.055	0.669	-0.099	0.446	-0.088	0.603
pulvinar thalami	-0.172	0.181	-0.016	0.900	-0.129	0.317	-0.245	0.055	0.024	0.888
subthalamic nucleus	-0.141	0.275	-0.215	0.093	0.016	0.899	0.092	0.476	0.285	0.088
substantia nigra	-0.101	0.433	-0.107	0.407	0.052	0.686	0.190	0.139	0.296	0.076
red nucleus	-0.309	0.015	-0.075	0.561	0.016	0.904	-0.010	0.941	0.295	0.077
dentate	-0.067	0.604	-0.154	0.231	-0.314	0.013	-0.293	0.021	0.011	0.947

8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-isoPG, 8-isoprostane; NGAL, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; PRDX2, peroxiredoxin-2; MDA + HAE, malondialdehyde and hydroxyalkenals; r, Spearman correlation coefficient; p, p-value (p-values < 0.05 in bold); volume adjusted to total intracranial volume.

4. Discussion

In this study, we found that newly diagnosed MS patients show higher susceptibility in caudate nucleus and globus pallidus internus than healthy controls which is consistent with excessive iron accumulation in MS patients. These patients have higher levels of oxidative stress markers in CSF, which is correlated with susceptibility and volume of deep gray matter structures.

Oxidative stress has been implied in the pathogenesis of autoimmune inflammatory diseases such as MS [4,5,18]. Increased release of reactive oxygen species has been shown to cause extensive myelin damage in early MS [19]. Endogenous cytoprotective enzymes such as peroxiredoxin, glutathione reductase, or catalase counteract oxidative damage, regulate redox signaling pathways, and modulate inflammatory and immune responses [20]. The balance between reactive oxygen species production and antioxidant defense is crucial in preventing structural damage to the central nervous system [21].

Peroxiredoxins are a family of highly efficient peroxidases that catalyze the reduction of hydrogen peroxide, peroxynitrite, and alkyl hydroperoxides [20]. For example, PRDX2 is upregulated in astrocytes of MS lesions and its expression correlates with the degree of inflammation and oxidative stress [4]. There are four subtypes of peroxiredoxins that are expressed in the human brain [22]. PRDX2 is mainly expressed in astrocytes. Its expression is more abundant in MS lesions (especially in their rim), where activation of

microglia and CD3 T cells is also present [4]. This is consistent with the finding of increased CSF levels of PRDX2 observed in MS patients in our study. PRDX2 expression level is positively correlated with the degree of inflammation and oxidative stress. Although PRDX2 protects neurons from oxidative stress and inflammatory damage, its increase in CSF may represent a negative prognostic marker that reflects ongoing oxidative stress. The negative correlation of PRDX2 with the volume of the thalamus may thus indicate the contribution of oxidative stress to thalamic atrophy in MS, which is also a strong predictor of disability progression [23].

The **8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)** is the most abundant product of oxidative damage to DNA. Its role as an indicator of oxidative stress has been suggested in many conditions including neurodegenerative diseases [7]. Its elevated levels in CSF are found in patients with Parkinson's disease, especially in its early stage [24]. Khajenobar et al. compared the levels of 8-OHdG in CSF of MS patients and healthy controls but did not find any significant difference [6]. Counterintuitively, they reported decreased levels of 8-OHdG in the serum of MS patients. On the contrary, Tasset et al. found higher 8-OHdG serum concentrations and their association with the severity of the MS [25]. We also found higher concentrations of 8-OHdG in CSF of newly diagnosed MS patients supporting the association between DNA oxidative stress and MS.

The **isoprostane 8-iso-PGF α** is a biomarker of lipid peroxidation [5,26]. Mir et al. reported increased CSF levels of 8-isoPG in a large cohort of MS patients, with even higher levels in those with secondary progressive form than in relapsing-remitting MS (RRMS) [5]. Increased CSF 8-isoPG levels correlate with disease severity as assessed by EDSS [27]. We believe that a lack of association between CSF 8-isoPG as well as other CSF markers and EDSS in our study is likely caused by the early phase and very mild severity of our MS group.

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL, also known as Lipocalin-2, or LCN2) is involved in several inflammatory pathways [28]. Its increased concentration in CSF is reported in patients with MS, especially those with secondary progressive MS and primary progressive MS compared to RRMS [8]. NGAL levels decrease after natalizumab treatment. Khalil et al. report decreased levels of NGAL in CSF of MS patients and their positive association with iron accumulation in the basal ganglia measured using R2* relaxometry [29]. In our study, the difference between MS patients and healthy controls was not significant. However, we showed a negative correlation of NGAL levels with the susceptibility in the dentate nucleus. These disparate findings may be caused by different methods of iron estimation. Increased susceptibility in MS, as compared to R2* relaxometry, reflects not only iron accumulation but also demyelination. This factor may bias the analyses of associations between NGAL and other examined CSF parameters with DGM iron. Additionally, the wide spectrum of NGAL actions may contribute to its different pathogenetic effects depending on disease stage. These effects include induction of neuronal cell death and modulation of iron concentration and its storage in cells, which is one of the features of neurodegeneration in MS, as previously shown by our study group [30–32] and others [10].

Both **malondialdehyde and hydroxyalkenals** are markers of lipid peroxidation [33]. The brain tissue is highly sensitive to reactive oxygen species due to the increased oxygen consumption and a high concentration of polyunsaturated fatty acids which are sensitive to lipid peroxidation [34]. The process of iron-dependent accumulation of lipid peroxidation is referred to as ferroptosis and leads to the accumulation of toxic reactive oxygen species. We found higher CSF levels of MDA + HAE in MS patients compared to healthy controls and an association with lower volumes of GPI, GPE, and the subthalamic nucleus. Yet, we did not find significant atrophy of these structures in our MS cohort. This finding may be thus consistent with prodromal neurodegeneration of globus pallidus and subthalamic nucleus in a subgroup of MS patients with increased lipid peroxidation. On the other hand, no association between MDA-HAE and iron levels was observed arguing

against the theory that paramagnetic iron measured by QSM is directly involved in ferroptosis.

Consistently with previous studies, our MR data show that newly diagnosed MS patients already have atrophy of the thalamus, thalamic pulvinar, and putamen [35]. Caudate and globus pallidus show significantly higher susceptibility in MS patients consistent with iron accumulation [31]. Additionally, we show that the increased susceptibility in globus pallidus in newly diagnosed MS patients is driven by changes in the internal pallidum.

Our study has some limitations. The increase of CSF levels of 8-OHdG, PRDX2, and MDA + HAE may also be driven by the disruption of blood-brain barrier and not only by their increased CSF content. Furthermore, circadian fluctuations of CSF levels of the investigated biomarkers are known. On the other hand, lumbar punctures were performed at similar times of the day limiting the effect of circadian fluctuations. Although magnetic susceptibility is a marker of iron concentration, it is also affected by other substances such as myelin. Finally, although the age difference between MS patients and CSF controls was significant, we did not find any age dependence of CSF parameters and adjusted statistical analyses for age whenever appropriate.

5. Conclusions

Early MS patients show atrophy of the thalamus, thalamic pulvinar, and putamen and iron accumulation in the caudate and GPI. Increased levels of PRDX2, MDA + HAE, and 8-OHdG in CSF in newly diagnosed MS patients may suggest the role of oxidative stress in the pathogenesis of MS. The association between PRDX2 levels and the decreasing volume of the thalamus as well as between 8-OHdG and increasing susceptibility in the caudate nucleus underlines the connection between neuroinflammation, oxidative stress, and tissue loss in MS. PRDX2 and 8-OHdG may be considered as biomarkers in longitudinal MS studies. Further investigation of oxidative stress biomarkers in MS is needed due to their potential role in predicting and monitoring disease progression and response to therapy.

Author Contributions: Conception and design of the study: A.B., L.L. and P.D. Acquisition and analysis of data: T.U., M.V. (Manuela Vaneckova), M.V. (Martin Vejrazka), R.B., D.H., B.S., J.K. and P.D. Drafting a significant portion of the manuscript or figures: A.B. and L.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (NV18-08-00062, and MH CZ-DRO, General University Hospital in Prague-VFN, 00064165), by the institutional funding of the Charles University in Prague (Cooperatio, Medical Diagnostics and Basic Medical Sciences), and by the Roche company.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague (ID1018/17).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are available upon a reasonable request to the study investigators.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zhang, S.-Y.; Gui, L.-N.; Liu, Y.-Y.; Shi, S.; Cheng, Y. Oxidative Stress Marker Aberrations in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis Study. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 823.
2. Haider, L.; Fischer, M.T.; Frischer, J.M.; Bauer, J.; Höftberger, R.; Botond, G.; Esterbauer, H.; Binder, C.J.; Witztum, J.L.; Lassmann, H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* **2011**, *134*, 1914–1924.

3. Siotto, M.; Filippi, M.M.; Simonelli, I.; et al. Oxidative Stress Related to Iron Metabolism in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients with Low Disability. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 86.
4. Voigt, D.; Scheidt, U.; Derfuss, T.; Landi, D.; Ghazaryan, A.; Vollaro, S.; Ventriglia, M.; Pasqualetti, P.; Rongioletti, M.C.A.; Squitti, R.; et al. Expression of the Antioxidative Enzyme Peroxiredoxin 2 in Multiple Sclerosis Lesions in Relation to Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 760.
5. Mir, F.; Lee, D.; Ray, H.; Sadiq, S.A. CSF isoprostane levels are a biomarker of oxidative stress in multiple sclerosis. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2014**, *1*, e21.
6. Khajenobar, N.B.; Mahboob, S.; Nourazarian, A.; Shademan, B.; Laghousi, D.; Moayed, Z.B.; Hassani, M.; Nikanfar, M. Comparison between cerebrospinal fluid and serum levels of myelin-associated glycoprotein, total antioxidant capacity, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2021**, *200*, 106377.
7. Long, J.D.; Matson, W.R.; Juhl, A.R.; Leavitt, B.R.; Paulsen, J.S.; Wassink, T.; Cross, S.; Doucette, N.; Kimble, M.; Ryan, P.; et al. 8OHdG as a marker for Huntington disease progression. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *46*, 625–634.
8. Nimer, F.A.; Elliott, C.; Bergman, J.; Khademi, M.; Dring, A.M.; Aeinehband, S.; Bergenheim, T.; Christensen, J.R.; Sellebjerg, F.; Svenningsson, A.; et al. Lipocalin-2 is increased in progressive multiple sclerosis and inhibits remyelination. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2016**, *3*, e191. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000191>.
9. Hänninen, K.; Viitala, M.; Paavilainen, T.; Karhu, J.O.; Rinne, J.; Koikkalainen, J.; Lötjönen, J.; Soilu-Hänninen, M. Thalamic Atrophy Predicts 5-Year Disability Progression in Multiple Sclerosis. *Front. Neurol.* **2020**, *11*, 606.
10. Khalil, M.; Langkammer, C.; Pichler, A.; Pinter, D.; Gatttringer, T.; Bachmaier, G.; Ropele, S.; Fuchs, S.; Enzinger, C.; Fazekas, F.; et al. Dynamics of brain iron levels in multiple sclerosis: A longitudinal 3T MRI study. *Neurology* **2015**, *84*, 2396–2402.
11. Langkammer, C.; Schweser, F.; Krebs, N.; Deistung, A.; Goessler, W.; Scheurer, E.; Sommer, K.; Reishofer, G.; Yen, K.; Fazekas, F.; et al. Quantitative susceptibility mapping (QSM) as a means to measure brain iron? A post mortem validation study. *NeuroImage* **2012**, *62*, 1593–1599.
12. Rudko, D.A.; Solovey, I.; Gati, J.S.; Kremenetzky, M.; Menon, R.S. Multiple sclerosis: Improved identification of disease-relevant changes in gray and white matter by using susceptibility-based MR imaging. *Radiology* **2014**, *272*, 851–864.
13. Conrad, M.; Angeli, J.P.F.; Vandenabeele, P.; Stockwell, B.R. Regulated necrosis: Disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 348–366.
14. Thompson, A.J.; Banwell, B.L.; Barkhof, F.; Carroll, W.M.; Coetzee, T.; Comi, G.; Correale, J.; Fazekas, F.; Filippi, M.; Freedman, M.S.; et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 162–173.
15. Burgetova, R.; Dusek, P.; Burgetova, A.; Pudlac, A.; Vaneckova, M.; Horakova, D.; Krasensky, J.; Varga, Z.; Lambert, L. Age-related magnetic susceptibility changes in deep grey matter and cerebral cortex of normal young and middle-aged adults depicted by whole brain analysis. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2021**, *11*, 3906919–3903919.
16. Mori, S.; Wu, D.; Ceritoglu, C.; Li, Y.; Kolasny, A.; Vaillant, M.A.; Faria, A.V.; Oishi, K.; Miller, M.I. MRICloud: Delivering High-Throughput MRI Neuroinformatics as Cloud-Based Software as a Service. *Comput. Sci. Eng.* **2016**, *18*, 21–35.
17. Schmidt, P.; Gaser, C.; Arsic, M.; Buck, D.; Förschler, A.; Berthele, A.; Hoshi, M.; Ilg, R.; Schmid, V.J.; Zimmer, C.; et al. An automated tool for detection of FLAIR-hyperintense white-matter lesions in Multiple Sclerosis. *NeuroImage* **2012**, *59*, 3774–3783.
18. Tanaka, M.; Vécsei, L. Monitoring the Redox Status in Multiple Sclerosis. *Biomedicines* **2020**, *8*, 406.
19. Adamczyk, B.; Adamczyk-Sowa, M. New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1973834.
20. Knoops, B.; Argyropoulou, V.; Becker, S.; Ferté, L.; Kuznetsova, O. Multiple Roles of Peroxiredoxins in Inflammation. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 60–64.
21. Massaada, C.A.; Klann, E. Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 2013–2054.
22. Uzawa, A.; Mori, M.; Masuda, H.; Ohtani, R.; Uchida, T.; Aoki, R.; Kuwabara, S. Peroxiredoxins are involved in the pathogenesis of multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Clin. Exp. Immunol.* **2020**, *202*, 239–248.
23. Solomon, A.J.; Watts, R.; Dewey, B.E.; Reich, D.S. MRI evaluation of thalamic volume differentiates MS from common mimics. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2017**, *4*, e387.
24. Gmitterová, K.; Heinemann, U.; Gawirnecka, J.; Varges, D.; Ciesielczyk, B.; Valkovic, P.; Benetin, J.; Zerr, I. 8-OHdG in cerebrospinal fluid as a marker of oxidative stress in various neurodegenerative diseases. *Neurodegener. Dis.* **2009**, *6*, 263–269.
25. Tasset, I.; Agüera, E.; Sánchez-López, F.; Feijóo, M.; Giraldo, A.I.; Cruz, A.H.; Gascón, F.; Túnuez, I. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin. Biochem.* **2012**, *45*, 440–444.
26. Miller, E.; Morel, A.; Saso, L.; Feijóo, M.; Giraldo, A.I.; Cruz, A.H.; Gascón, F.; Túnuez, I. Isoprostanes and Neuroprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Oxidat. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, e572491.
27. Lam, M.A.; Maghazal, G.J.; Khademi, M.; Piehl, F.; Ratzler, R.; Christensen, J.R.; Sellebjerg, F.T.; Olsson, T.; Stocker, R. Absence of systemic oxidative stress and increased CSF prostaglandin F2α in progressive MS. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2016**, *3*, e256.
28. Meyerhoff, N.; Rohn, K.; Carlson, R.; Tipold, A. Measurement of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Concentration in Canine Cerebrospinal Fluid and Serum and Its Involvement in Neuroinflammation. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *315*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00315>.

29. Khalil, M.; Renner, A.; Langkammer, C.; Enzinger, C.; Ropele, S.; Stojakovic, T.; Scharnagl, H.; Bachmaier, G.; Pichler, A.; Archelos, J.; et al. Cerebrospinal fluid lipocalin 2 in patients with clinically isolated syndromes and early multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **2016**, *22*, 1560–1568.
30. Burgetova, A.; Dusek, P.; Vaneckova, M.; Horakova, D.; Langkammer, C.; Krasensky, J.; Sobisek, L.; Matras, P.; Masek, M.; Seidl, Z. Thalamic Iron Differentiates Primary-Progressive and Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Am. J. Neuroradiol.* **2017**, *38*, 1079–1086.
31. Burgetova, A.; Seidl, Z.; Krasensky, J.; Horakova, D.; Vaneckova, M. Multiple sclerosis and the accumulation of iron in the Basal Ganglia: Quantitative assessment of brain iron using MRI T(2) relaxometry. *Eur. Neurol.* **2010**, *63*, 136–143.
32. Burgetova, A.; Dusek, P.; Pudlac, A.; Nytrova, P.; Vaneckova, M.; Horakova, D.; Krasensky, J.; Lambert, L. Deep grey matter iron content in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **2019**, *25*, 705–706.
33. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidat. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 360438.
34. Maciejczyk, M.; Żebrowska, E.; Zalewska, A.; Chabowski, A. Redox Balance, Antioxidant Defense, and Oxidative Damage in the Hypothalamus and Cerebral Cortex of Rats with High Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Oxidat. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 6940515.
35. Andravizou, A.; Dardiotis, E.; Artemiadis, A.; Sokratous, M.; Siokas, V.; Tsouris, Z.; Aloizou, A.-M.; Nikolaidis, I.; Bakirtzis, C.; Tsivgoulis, G.; et al. Brain atrophy in multiple sclerosis: Mechanisms, clinical relevance and treatment options. *Autoimmun. Highlights* **2019**, *10*, 7.

Article

Oxidative Stress Markers in Cerebrospinal Fluid of Newly Diagnosed Multiple Sclerosis Patients and Their Link to Iron Deposition and Atrophy

Andrea Burgetova ¹, Petr Dusek ^{1,2}, Tomas Uher ², Manuela Vaneckova ¹, Martin Vejrazka ², Romana Burgetova ^{1,4}, Dana Horakova ², Barbora Srpova ², Jan Krasensky ¹ and Lukas Lambert ^{1,*}

¹ Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 120 00 Prague, Czech Republic; andrea.burgetova@vfn.cz (A.B.); petr.dusek@vfn.cz (P.D.); manuela.vaneckova@vfn.cz (M.V.); romana.burgetova@fnkv.cz (R.B.); jan.krasensky@vfn.cz (J.K.)

² Department of Neurology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 120 00 Prague, Czech Republic; tomas.uher@vfn.cz (T.U.); dana.horakova@vfn.cz (D.H.); barbora.srpova@vfn.cz (B.S.)

³ Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 120 00 Prague, Czech Republic; martin.vejrazka@vfn.cz

⁴ Department of Radiology, Third Faculty of Medicine, Charles University, 100 34 Prague, Czech Republic

* Correspondence: lukas.lambert@vfn.cz; Tel.: +420-22496-2232

Citation: Burgetova, A.; Dusek, P.; Uher, T.; Vaneckova, M.; Vejrazka, M.; Burgetova, R.; Horakova, D.; Srpova, B.; Krasensky, J.; Lambert, L. Oxidative Stress Markers in Cerebrospinal Fluid of Newly Diagnosed Multiple Sclerosis Patients and Their Link to Iron Deposition and Atrophy. *Diagnostics* **2022**, *12*, 1365. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061365>

Academic Editor: Massimiliano Calabrese

Received: 9 May 2022

Accepted: 30 May 2022

Published: 1 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Oxidative stress has been implied in cellular injury even in the early phases of multiple sclerosis (MS). In this study, we quantified levels of biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in cerebrospinal fluid (CSF) in newly diagnosed MS patients and their associations with brain atrophy and iron deposits in the brain tissue. Consecutive treatment-naïve adult MS patients ($n = 103$) underwent brain MRI and CSF sampling. Healthy controls (HC, $n = 99$) had brain MRI. CSF controls ($n = 45$) consisted of patients with non-neuroinflammatory conditions. 3T MR included isotropic T1 weighted (MPRAGE) and gradient echo (GRE) images that were processed to quantitative susceptibility maps. The volume and magnetic susceptibility of deep gray matter (DGM) structures were calculated. The levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), 8-iso prostaglandin F_{2α} (8-isoPG), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), peroxiredoxin-2 (PRDX2), and malondialdehyde and hydroxyalkenals (MDA + HAE) were measured in CSF. Compared to controls, MS patients had lower volumes of thalamus, pulvinar, and putamen, higher susceptibility in caudate nucleus and globus pallidus, and higher levels of 8-OHdG, PRDX2, and MDA + HAE. In MS patients, the level of NGAL correlated negatively with volume and susceptibility in the dentate nucleus. The level of 8-OHdG correlated negatively with susceptibility in the caudate, putamen, and the red nucleus. The level of PRDX2 correlated negatively with the volume of the thalamus and both with volume and susceptibility of the dentate nucleus. From MRI parameters with significant differences between MS and HC groups, only caudate susceptibility and thalamic volume were significantly associated with CSF parameters. Our study shows that increased oxidative stress in CSF detected in newly diagnosed MS patients suggests its role in the pathogenesis of MS.

Keywords: multiple sclerosis; magnetic resonance imaging; cerebrospinal fluid; oxidative stress; peroxiredoxin; neutrophil gelatinase-associated lipocalin

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic neuroinflammatory demyelinating disease with progressive deterioration of disability in the majority of untreated patients. Although the main pathological mechanism is an aberrant immunological response, there is a complex interaction of genetic and environmental factors as well as neuroprotective and repair

mechanisms [1]. Oxidative stress and its modulation have been implied in the formation, sustenance, and termination of cell injury in MS [2,3].

The levels of oxidative stress markers can be estimated in patients from peripheral blood, cerebrospinal fluid (CSF), or locally by microdialysis. Since CSF is directly connected to extracellular space, its analysis may better reflect homeostasis in the brain microenvironment compared to peripheral blood analysis [4]. Oxidative stress markers including malondialdehyde (MDA), 4-hydroxyalkenals (HAE), isoprostane 8-iso-PGF_{2α} (8-isoPG) have been reported to be elevated in CSF of MS patients [1,5]. The 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), a product of oxidative DNA damage in CSF, has been implied in carcinogenesis, neurodegeneration, but not specifically in MS [6,7]. Peroxiredoxins represent a family of highly efficient peroxidases that are upregulated in astrocytes in MS lesions [4]. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) acts in multiple signaling pathways that regulate inflammation, iron homeostasis, and cell death [8]. The above-mentioned substances have been investigated in MS patients, but the evidence for their dysregulation is limited, especially in the early phases of MS.

Newly diagnosed MS patients already show accelerated tissue loss of deep grey matter (DGM), particularly in the thalamus [9]. Iron accumulation in DGM in MS patients is also an early phenomenon, which is already detectable at the transition from clinically isolated syndrome to clinically definite MS [10]. Iron concentration in the DGM correlates with clinical severity and predicts future disability [11,12]. Iron balance is tightly linked with inflammation and many proteins involved in cellular iron homeostasis are altered by inflammatory stimuli resulting in cellular iron retention [13]. Iron dysregulation is supposed to trigger oxidative stress. However, the link between oxidative stress, brain atrophy, and iron concentration in DGM structures in MS has not been sufficiently established.

The main aim of this study was to examine biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in CSF in newly diagnosed untreated MS patients and their associations with the severity of brain atrophy and iron deposits in DGM.

2. Materials and Methods

This study (ClinicalTrials.gov ID: NCT03706118) was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague (ID1018/17), it was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and all subjects signed informed consent.

2.1. Study Participants

MS patients ($n = 103$): de novo treatment-naive MS patients diagnosed between August 2017 and January 2020 underwent neurological examination including Expanded Disability Status Scale (EDSS), brain MRI, and CSF sampling. The inclusion criteria were: age ≥ 18 years and diagnosis of MS according to the 2017 McDonald criteria [14]. We excluded patients with major diseases affecting brain health and pregnant women.

Two different groups of controls were used for brain MRI and CSF biochemical comparisons.

Healthy controls (HC) for brain MRI were recruited from the general community [15]. The controls were free of neurologic or other medical disorders affecting brain health and had a normal neurological examination. From the original group of 111 subjects, we selected 99 HC with an age range comparable to MS patients by excluding older subjects.

CSF controls: for CSF comparison, samples from 45 controls with different non-neuroinflammatory conditions were selected from our CSF biobank. The control group included 37 patients with non-inflammatory neurological disorders and 8 patients undergoing spinal anesthesia for urologic surgery.

2.2. Imaging Protocol

MRI examination was performed and processed as previously published [15]: Magnetization Prepared Rapid Gradient-Echo (MPRAGE, TE: 2.96 ms, TI 900 ms TR: 2300 ms, spatial resolution: $1 \times 1 \times 1$ mm), gradient-echo (GRE, 6 TEs: 4.5–29.5 ms, evenly spaced, TR: 33 ms, spatial resolution: $0.94 \times 0.94 \times 0.94$ mm), and Fluid-Attenuated Inversion Recovery (FLAIR, TE 397 ms, TI 1800 ms, TR 5000 ms, spatial resolution $1 \times 1 \times 1$ mm) pulse sequences were acquired on a 3T MRI scanner (Siemens Skyra 3T, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) with a 20 channel head coil.

2.3. Image Processing

GRE images were processed to quantitative susceptibility mapping (QSM) maps, co-registered with MPRAGE using SPM12 running under Matlab v. 2020a (The Math Works, Inc., Natick, MA, USA). Co-registered skull-stripped QSM and MPRAGE images entered a fully automated multi-atlas segmentation pipeline using dual (QSM and T1-weighted) contrast for delineation of DGM nuclei implemented with a cloud-based platform (www.mricloud.org) (Figure 1) [16]. Segmentation of DGM structures in all subjects was visually checked for errors, particularly for potential misclassifications of demyelinating lesions in the DGM. Volumes were adjusted to the total intracranial volume (TIV) and reported as the sum of bilateral structures. QSM measurements were referenced to the susceptibility of a manually drawn region in the parietooccipital white matter avoiding white-matter lesions [15]. White matter lesions were segmented by the lesion growth algorithm [17] as implemented in the LST toolbox version 3.0.0 (www.statistical-modeling.de/lst.html) for SPM. The optimal initial threshold (κ) was determined by visual inspection and set to 0.15. Lesion segmentation in all subjects were visually checked and false-positive voxels were manually deleted.

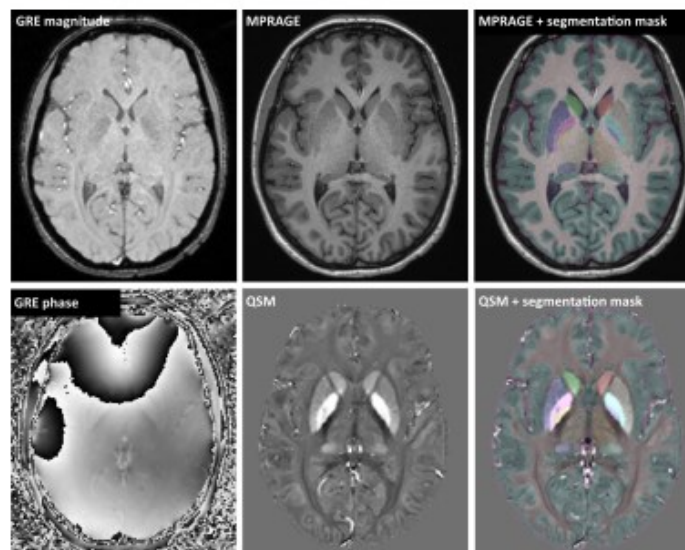


Figure 1. Example MRI images: gradient-echo (GRE) magnitude and phase images were processed to quantitative susceptibility map (QSM). Multi-atlas segmentation employed coregistered QSM and MPRAGE images to generate masks of deep grey matter structures, cerebral white and grey matter, and CSF.

2.4. CSF Assays

CSF was drawn from L5-S1, L4-5, or L3-4 interspace in an upright sitting position in the morning hours using a standard sterile preparation and 20 G atraumatic needle. A total of 20–25 mL of CSF and 5 mL volume of blood were obtained. CSF was immediately centrifuged at 3000× g rpm and 4 °C; the supernatant was aliquoted and frozen at −80 °C.

For CSF assays, the samples were centrifuged after thawing and kept on ice. All samples were assayed in duplicates.

8-iso prostaglandin F_{2a} (8-isoPG, 8-isoprostane) was determined immunochemically by a non-competitive ELISA with biotinylated anti-human 8-isoPG antibody. Human 8-iso prostaglandin ELISA kit (cat. No. MBS160287, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA) was employed. The calibration ranged from 0 to 640 ng/L and was linear throughout the whole range.

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL, lipocalin-2) was assayed using a non-competitive ELISA (cat. No. MBS5644140, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA). Samples were diluted 10 times prior to use. The calibration ranged from 0 to 10 ng/mL and was linear in the whole range.

Peroxiredoxin-2 (PRDX2) was determined immunochemically by a non-competitive ELISA with biotinylated anti-human PRDX2 antibody (cat. No. ELH-PRDX2, RayBiotech, Norcross, GA, USA). Samples were diluted 5 times prior to use. The calibration ranged from 0 to 12.8 ng/mL. Polynomial regression of 2nd order was employed to estimate the concentrations of samples.

Products of lipid peroxidation were assayed by a colorimetric assay based on N-methyl-2-phenylindole (Bioxytech LPO-586 kit, cat. No. 21012, OXIS International, Inc., Foster City, CA, USA). Methanesulphonic acid was used as the acid solvent in the procedure for simultaneous determination of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals (MDA + HAE). Samples for MDA + HAE assay were stabilized with butylated hydroxytoluene (BHT; 20 µL of 0.2% BHT was added to 200 µL of CSF immediately after sampling, before freezing to −80 °C). In the assay, tetramethoxypropane was used as the calibrator in concentrations from 0 to 4 µmol/L.

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) was assayed by a competitive ELISA (Bioxytech 8-OHdG EIA Kit, cat. No. 21026, OXIS International, Inc., Foster City, CA, USA). The calibration was performed for concentrations 0.5 to 8 ng/mL and was linear in this range.

In MS patients, CSF samples in sufficient quantity for the analysis of 8-OHdG, 8-isoPG, NGAL, and PRDX2 were available in 62 patients and for the analysis of MDA + HAE in 37 patients.

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in SPSS (IBM, Armonk, NY). Dichotomous and continuous variables were compared using the Fisher test, the *t*-test, the Mann-Whitney test, or the generalized linear model (GLM) as appropriate according to the distribution of the data. Grubb's test was used to identify significant outliers ($p < 0.05$). Age and sex-adjusted partial correlation coefficients among biochemical markers and deep gray matter volumes and susceptibilities in newly diagnosed MS patients were calculated. *p* values were adjusted to age and sex. A *p*-value below 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Comparison of MS Patients and HC MRI

Brain volumetry and quantification of susceptibility in the DGM structures are shown in Table 1. Compared to HC, MS patients had lower brain parenchymal fraction ($p = 0.001$), a smaller volume of thalamus ($p < 0.001$), pulvinar ($p < 0.001$) and putamen ($p = 0.002$), and higher susceptibility in the caudate nucleus ($p = 0.041$) and globus pallidus internus ($p = 0.015$).

Table 1. Comparison of DGM volumes and susceptibilities in MS patients and controls.

	MS (n = 103)		MRI Controls (n = 99)		p-Value
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	
Sex (male/female)	28/75		38/61		0.090
Age (years)	32.5	8.0	33.7	8.3	0.305
EDSS (median, IQR)	2	1.5–2.5	-	-	-
Lesion load (cm ³)	2.7	5.3	-	-	-
Lesion count (median, IQR)	7	4–20	-	-	-
Brain parenchymal fraction (%)	80.3	3.4	81.5	2.8	0.001
DGM Volumes (cm³)					
caudate	8.0	0.7	8.1	0.6	0.240
GPI	1.1	0.1	1.1	0.1	0.230
GPE	3.1	0.3	3.2	0.3	0.528
putamen	8.7	0.7	9.0	0.8	0.002
thalamus	9.6	0.6	9.9	0.6	<0.001
pulvinar	2.3	0.3	2.5	0.3	<0.001
subthalamic nucleus	0.3	0.1	0.4	0.1	0.310
substantia nigra	1.3	0.1	1.4	0.2	0.163
red nucleus	0.6	0.1	0.6	0.1	0.710
dentate	1.8	0.4	1.8	0.3	0.711
DGM Susceptibilities (ppb)					
Caudate	24.5	5.8	23.0	4.7	0.041
GPI	53.1	6.4	50.9	5.7	0.015
GPE	62.8	7.7	62.2	6.8	0.594
Putamen	23.6	6.7	23.6	6.1	0.977
Thalamus	0.9	2.3	1.0	2.0	0.728
Pulvinar	17.9	5.2	18.3	5.2	0.582
subthalamic nucleus	41.9	7.3	43.2	6.9	0.214
substantia nigra	53.4	7.3	52.2	6.6	0.099
red nucleus	39.2	7.8	39.7	8.1	0.639
Dentate	37.4	8.6	36.9	9.8	0.693

DGM, deep gray matter; IQR, interquartile range; EDSS, expanded disability status scale; GPI, globus pallidus internus; GPE, globus pallidus externus; ppb, parts per billion. *p*-values are adjusted for age and sex. Significant differences are in bold.

3.2. Comparison of CSF Biochemical Markers in MS Patients and Controls

CSF was available in 62 newly diagnosed MS patients. The control CSF group was older compared to MS patients (33 ± 9 vs. 40 ± 12 years, $p < 0.001$). Patients with MS had higher values of 8-OHdG ($p = 0.041$), PRDX2 ($p = 0.015$), and lipoperoxidation markers (MDA + HAE; $p = 0.003$) compared to HC (Table 2).

Table 2. Comparison of CSF biochemical markers in MS patients and controls.

	MS (n = 62)		CSF Controls (n = 45)		p-Value
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	
Sex (male/female)	19/43		20/25		0.143
Age (years)	33.3	8.6	40.2	11.6	<0.001
CSF sampling to MRI interval (months)	1.1	3.9	n.d.	n.d.	n.d.
Cerebrospinal Fluid Analysis					
8-OHdG (ng/mL)	0.112 (median = 0)	0.310 (IQR = 0 to 0)	0.026 (median = 0)	0.122 (IQR = 0 to 0)	0.041 ¹
8-isoPG (ng/L)	44.319	13.611	41.071	9.679	0.447
NGAL (ng/mL)	4.366	2.085	4.968	2.226	0.473
PRDX2 (ng/mL)	10.966	2.961	9.437	3.945	0.015
MDA + HAE (μmol/L)	0.605 ²	0.264 ²	0.448	0.153	0.003

¹ Mann-Whitney U test; other analyses performed using GLM with age and sex as covariates; ² n = 37; CSF, cerebrospinal fluid; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-isoPG, 8-isoprostane; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; PRDX2, peroxiredoxin-2; MDA + HAE, malondialdehyde and hydroxyalkenals; n.d., not determined. p-values are adjusted for age and sex. Significant differences are in bold.

3.3. Correlations between CSF Biochemical Markers and MRI Parameters

In MS patients, the correlations between CSF and MRI parameters were low to moderate. From MRI parameters with significant differences between MS and HC groups, only caudate susceptibility and thalamic volume were significantly associated with CSF parameters. The level of 8-OHdG correlated negatively with the susceptibility in the caudate, putamen, and the red nucleus. The level of 8-isoPG correlated negatively with susceptibility in the globus pallidus externus. The level of NGAL correlated negatively with susceptibility and volume in the dentate. The level of PRDX2 correlated negatively with the volume of the thalamus and both susceptibility and volume of the dentate nucleus (Figure 2). There was a negative correlation between lipoperoxidation markers and the volume of the globus pallidus and subthalamic nucleus (Table 3). None of the biochemical markers was significantly associated with T2 lesion volume, lesion count, or EDSS.

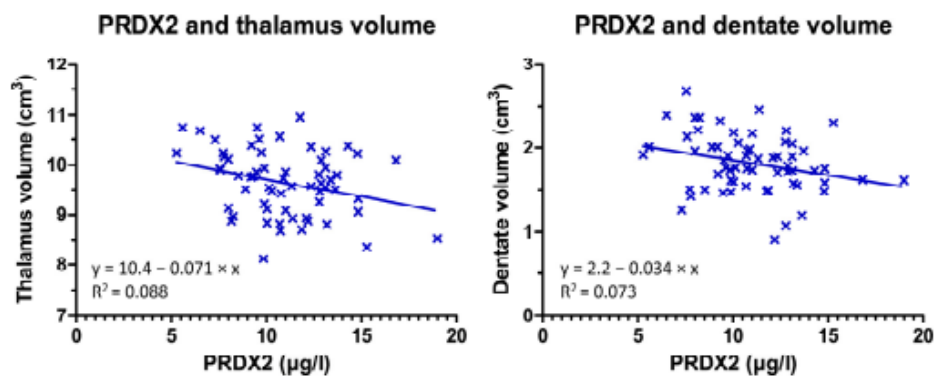


Figure 2. Scatter plot and regression line show negative correlation between PRDX2 and volume of the thalamus (left) and the dentate nucleus (right).

Table 3. Age and sex-adjusted partial correlation coefficients among biochemical markers and deep gray matter volumes and susceptibilities in early MS patients.

Structure	8-OHdG		8-isoPG		NGAL		PRDX2		MDA + HAE	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Volume										
caudate	0.017	0.899	-0.147	0.271	-0.170	0.195	-0.236	0.069	-0.328	0.055
globus pallidus int.	0.175	0.181	-0.020	0.879	0.039	0.765	-0.005	0.971	-0.459	0.006
globus pallidus ext.	0.195	0.136	-0.199	0.134	-0.081	0.539	-0.083	0.529	-0.433	0.009
putamen	0.115	0.380	0.022	0.869	-0.137	0.297	-0.069	0.602	-0.008	0.963
thalamus	0.074	0.575	-0.028	0.833	-0.045	0.733	-0.341	0.008	0.025	0.886
pulvinar thalami	0.129	0.328	0.036	0.786	-0.067	0.613	-0.240	0.064	0.020	0.909
subthalamic nucleus	0.032	0.806	-0.189	0.155	0.008	0.950	0.011	0.934	-0.374	0.027
substantia nigra	0.002	0.990	-0.115	0.391	-0.145	0.268	-0.112	0.393	-0.229	0.187
red nucleus	0.046	0.724	-0.152	0.256	-0.036	0.786	-0.034	0.795	-0.299	0.081
dentate	-0.014	0.916	-0.097	0.471	-0.292	0.023	-0.291	0.024	-0.261	0.130
Susceptibility										
caudate	-0.283	0.026	-0.098	0.450	0.009	0.942	-0.042	0.747	0.200	0.234
globus pallidus int	0.029	0.821	-0.141	0.276	0.120	0.352	0.124	0.339	0.207	0.220
globus pallidus ext	-0.037	0.777	-0.276	0.030	0.017	0.894	0.097	0.452	0.283	0.089
putamen	-0.396	0.001	-0.095	0.462	0.031	0.808	-0.058	0.654	0.213	0.205
thalamus	0.139	0.280	0.103	0.426	-0.055	0.669	-0.099	0.446	-0.088	0.603
pulvinar thalami	-0.172	0.181	-0.016	0.900	-0.129	0.317	-0.245	0.055	0.024	0.888
subthalamic nucleus	-0.141	0.275	-0.215	0.093	0.016	0.899	0.092	0.476	0.285	0.088
substantia nigra	-0.101	0.433	-0.107	0.407	0.052	0.686	0.190	0.139	0.296	0.076
red nucleus	-0.309	0.015	-0.075	0.561	0.016	0.904	-0.010	0.941	0.295	0.077
dentate	-0.067	0.604	-0.154	0.231	-0.314	0.013	-0.293	0.021	0.011	0.947

8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-isoPG, 8-isoprostane; NGAL, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; PRDX2, peroxiredoxin-2; MDA + HAE, malondialdehyde and hydroxyalkenals; r, Spearman correlation coefficient; p, p-value (p-values < 0.05 in bold); volume adjusted to total intracranial volume.

4. Discussion

In this study, we found that newly diagnosed MS patients show higher susceptibility in caudate nucleus and globus pallidus internus than healthy controls which is consistent with excessive iron accumulation in MS patients. These patients have higher levels of oxidative stress markers in CSF, which is correlated with susceptibility and volume of deep gray matter structures.

Oxidative stress has been implied in the pathogenesis of autoimmune inflammatory diseases such as MS [4,5,18]. Increased release of reactive oxygen species has been shown to cause extensive myelin damage in early MS [19]. Endogenous cytoprotective enzymes such as peroxiredoxin, glutathione reductase, or catalase counteract oxidative damage, regulate redox signaling pathways, and modulate inflammatory and immune responses [20]. The balance between reactive oxygen species production and antioxidant defense is crucial in preventing structural damage to the central nervous system [21].

Peroxiredoxins are a family of highly efficient peroxidases that catalyze the reduction of hydrogen peroxide, peroxynitrite, and alkyl hydroperoxides [20]. For example, PRDX2 is upregulated in astrocytes of MS lesions and its expression correlates with the degree of inflammation and oxidative stress [4]. There are four subtypes of peroxiredoxins that are expressed in the human brain [22]. PRDX2 is mainly expressed in astrocytes. Its expression is more abundant in MS lesions (especially in their rim), where activation of

microglia and CD3 T cells is also present [4]. This is consistent with the finding of increased CSF levels of PRDX2 observed in MS patients in our study. PRDX2 expression level is positively correlated with the degree of inflammation and oxidative stress. Although PRDX2 protects neurons from oxidative stress and inflammatory damage, its increase in CSF may represent a negative prognostic marker that reflects ongoing oxidative stress. The negative correlation of PRDX2 with the volume of the thalamus may thus indicate the contribution of oxidative stress to thalamic atrophy in MS, which is also a strong predictor of disability progression [23].

The **8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)** is the most abundant product of oxidative damage to DNA. Its role as an indicator of oxidative stress has been suggested in many conditions including neurodegenerative diseases [7]. Its elevated levels in CSF are found in patients with Parkinson's disease, especially in its early stage [24]. Khajenobar et al. compared the levels of 8-OHdG in CSF of MS patients and healthy controls but did not find any significant difference [6]. Counterintuitively, they reported decreased levels of 8-OHdG in the serum of MS patients. On the contrary, Tasset et al. found higher 8-OHdG serum concentrations and their association with the severity of the MS [25]. We also found higher concentrations of 8-OHdG in CSF of newly diagnosed MS patients supporting the association between DNA oxidative stress and MS.

The **isoprostane 8-iso-PGF 2α** is a biomarker of lipid peroxidation [5,26]. Mir et al. reported increased CSF levels of 8-isoPG in a large cohort of MS patients, with even higher levels in those with secondary progressive form than in relapsing-remitting MS (RRMS) [5]. Increased CSF 8-isoPG levels correlate with disease severity as assessed by EDSS [27]. We believe that a lack of association between CSF 8-isoPG as well as other CSF markers and EDSS in our study is likely caused by the early phase and very mild severity of our MS group.

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL, also known as Lipocalin-2, or LCN2) is involved in several inflammatory pathways [28]. Its increased concentration in CSF is reported in patients with MS, especially those with secondary progressive MS and primary progressive MS compared to RRMS [8]. NGAL levels decrease after natalizumab treatment. Khalil et al. report decreased levels of NGAL in CSF of MS patients and their positive association with iron accumulation in the basal ganglia measured using R2* relaxometry [29]. In our study, the difference between MS patients and healthy controls was not significant. However, we showed a negative correlation of NGAL levels with the susceptibility in the dentate nucleus. These disparate findings may be caused by different methods of iron estimation. Increased susceptibility in MS, as compared to R2* relaxometry, reflects not only iron accumulation but also demyelination. This factor may bias the analyses of associations between NGAL and other examined CSF parameters with DGM iron. Additionally, the wide spectrum of NGAL actions may contribute to its different pathogenetic effects depending on disease stage. These effects include induction of neuronal cell death and modulation of iron concentration and its storage in cells, which is one of the features of neurodegeneration in MS, as previously shown by our study group [30–32] and others [10].

Both **malondialdehyde and hydroxyalkenals** are markers of lipid peroxidation [33]. The brain tissue is highly sensitive to reactive oxygen species due to the increased oxygen consumption and a high concentration of polyunsaturated fatty acids which are sensitive to lipid peroxidation [34]. The process of iron-dependent accumulation of lipid peroxidation is referred to as ferroptosis and leads to the accumulation of toxic reactive oxygen species. We found higher CSF levels of MDA + HAE in MS patients compared to healthy controls and an association with lower volumes of GPI, GPE, and the subthalamic nucleus. Yet, we did not find significant atrophy of these structures in our MS cohort. This finding may be thus consistent with prodromal neurodegeneration of globus pallidus and subthalamic nucleus in a subgroup of MS patients with increased lipid peroxidation. On the other hand, no association between MDA-HAE and iron levels was observed arguing

against the theory that paramagnetic iron measured by QSM is directly involved in ferroptosis.

Consistently with previous studies, our MR data show that newly diagnosed MS patients already have atrophy of the thalamus, thalamic pulvinar, and putamen [35]. Caudate and globus pallidus show significantly higher susceptibility in MS patients consistent with iron accumulation [31]. Additionally, we show that the increased susceptibility in globus pallidus in newly diagnosed MS patients is driven by changes in the internal pallidum.

Our study has some limitations. The increase of CSF levels of 8-OHdG, PRDX2, and MDA + HAE may also be driven by the disruption of blood-brain barrier and not only by their increased CSF content. Furthermore, circadian fluctuations of CSF levels of the investigated biomarkers are known. On the other hand, lumbar punctures were performed at similar times of the day limiting the effect of circadian fluctuations. Although magnetic susceptibility is a marker of iron concentration, it is also affected by other substances such as myelin. Finally, although the age difference between MS patients and CSF controls was significant, we did not find any age dependence of CSF parameters and adjusted statistical analyses for age whenever appropriate.

5. Conclusions

Early MS patients show atrophy of the thalamus, thalamic pulvinar, and putamen and iron accumulation in the caudate and GPI. Increased levels of PRDX2, MDA + HAE, and 8-OHdG in CSF in newly diagnosed MS patients may suggest the role of oxidative stress in the pathogenesis of MS. The association between PRDX2 levels and the decreasing volume of the thalamus as well as between 8-OHdG and increasing susceptibility in the caudate nucleus underlines the connection between neuroinflammation, oxidative stress, and tissue loss in MS. PRDX2 and 8-OHdG may be considered as biomarkers in longitudinal MS studies. Further investigation of oxidative stress biomarkers in MS is needed due to their potential role in predicting and monitoring disease progression and response to therapy.

Author Contributions: Conception and design of the study: A.B., L.L. and P.D. Acquisition and analysis of data: T.U., M.V. (Manuela Vaneckova), M.V. (Martin Vejrazka), R.B., D.H., B.S., J.K. and P.D. Drafting a significant portion of the manuscript or figures: A.B. and L.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (NV18-08-00062, and MH CZ-DRO, General University Hospital in Prague-VFN, 00064165), by the institutional funding of the Charles University in Prague (Cooperatio, Medical Diagnostics and Basic Medical Sciences), and by the Roche company.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague (ID1018/17).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are available upon a reasonable request to the study investigators.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zhang, S.-Y.; Gui, L.-N.; Liu, Y.-Y.; Shi, S.; Cheng, Y. Oxidative Stress Marker Aberrations in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis Study. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 823.
2. Haider, L.; Fischer, M.T.; Frischer, J.M.; Bauer, J.; Höftberger, R.; Botond, G.; Esterbauer, H.; Binder, C.J.; Witztum, J.L.; Lassmann, H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* **2011**, *134*, 1914–1924.

3. Siotto, M.; Filippi, M.M.; Simonelli, I.; et al. Oxidative Stress Related to Iron Metabolism in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients with Low Disability. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 86.
4. Voigt, D.; Scheidt, U.; Derfuss, T.; Landi, D.; Ghazaryan, A.; Vollaro, S.; Ventriglia, M.; Pasqualetti, P.; Rongioletti, M.C.A.; Squitti, R.; et al. Expression of the Antioxidative Enzyme Peroxiredoxin 2 in Multiple Sclerosis Lesions in Relation to Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 760.
5. Mir, F.; Lee, D.; Ray, H.; Sadiq, S.A. CSF isoprostane levels are a biomarker of oxidative stress in multiple sclerosis. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2014**, *1*, e21.
6. Khajenobar, N.B.; Mahboob, S.; Nourazarian, A.; Shademan, B.; Laghousi, D.; Moayed, Z.B.; Hassanpour, M.; Nikanfar, M. Comparison between cerebrospinal fluid and serum levels of myelin-associated glycoprotein, total antioxidant capacity, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2021**, *200*, 106377.
7. Long, J.D.; Matson, W.R.; Juhl, A.R.; Leavitt, B.R.; Paulsen, J.S.; Wassink, T.; Cross, S.; Doucette, N.; Kimble, M.; Ryan, P.; et al. 8OHdG as a marker for Huntington disease progression. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *46*, 625–634.
8. Nimer, F.A.; Elliott, C.; Bergman, J.; Khademi, M.; Dring, A.M.; Aeineband, S.; Bergenheim, T.; Christensen, J.R.; Sellebjerg, F.; Svenningsson, A.; et al. Lipocalin-2 is increased in progressive multiple sclerosis and inhibits remyelination. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2016**, *3*, e191. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000191>.
9. Hänninen, K.; Viitala, M.; Paavilainen, T.; Karhu, J.O.; Rinne, J.; Koikkalainen, J.; Lötjönen, J.; Soilu-Hänninen, M. Thalamic Atrophy Predicts 5-Year Disability Progression in Multiple Sclerosis. *Front. Neurol.* **2020**, *11*, 606.
10. Khalil, M.; Langkammer, C.; Pichler, A.; Pinter, D.; Gatteringer, T.; Bachmaier, G.; Ropele, S.; Fuchs, S.; Enzinger, C.; Fazekas, F.; et al. Dynamics of brain iron levels in multiple sclerosis: A longitudinal 3T MRI study. *Neurology* **2015**, *84*, 2396–2402.
11. Langkammer, C.; Schweser, F.; Krebs, N.; Deistung, A.; Goessler, W.; Scheurer, E.; Sommer, K.; Reishofer, G.; Yen, K.; Fazekas, F.; et al. Quantitative susceptibility mapping (QSM) as a means to measure brain iron? A post mortem validation study. *NeuroImage* **2012**, *62*, 1593–1599.
12. Rudko, D.A.; Solovey, I.; Gati, J.S.; Kremenchtzky, M.; Menon, R.S. Multiple sclerosis: Improved identification of disease-relevant changes in gray and white matter by using susceptibility-based MR imaging. *Radiology* **2014**, *272*, 851–864.
13. Conrad, M.; Angeli, J.P.F.; Vandenabeele, P.; Stockwell, B.R. Regulated necrosis: Disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 348–366.
14. Thompson, A.J.; Banwell, B.L.; Barkhof, F.; Carroll, W.M.; Coetzee, T.; Comi, G.; Correale, J.; Fazekas, F.; Filippi, M.; Freedman, M.S.; et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 162–173.
15. Burgetova, R.; Dusek, P.; Burgetova, A.; Pudlac, A.; Vaneckova, M.; Horakova, D.; Krasensky, J.; Varga, Z.; Lambert, L. Age-related magnetic susceptibility changes in deep grey matter and cerebral cortex of normal young and middle-aged adults depicted by whole brain analysis. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2021**, *11*, 3906919–3903919.
16. Mori, S.; Wu, D.; Ceritoglu, C.; Li, Y.; Kolasny, A.; Vaillant, M.A.; Faria, A.V.; Oishi, K.; Miller, M.I. MRICloud: Delivering High-Throughput MRI Neuroinformatics as Cloud-Based Software as a Service. *Comput. Sci. Eng.* **2016**, *18*, 21–35.
17. Schmidt, P.; Gaser, C.; Arsic, M.; Buck, D.; Förschler, A.; Berthele, A.; Hoshi, M.; Ilg, R.; Schmid, V.J.; Zimmer, C.; et al. An automated tool for detection of FLAIR-hyperintense white-matter lesions in Multiple Sclerosis. *NeuroImage* **2012**, *59*, 3774–3783.
18. Tanaka, M.; Véscéi, L. Monitoring the Redox Status in Multiple Sclerosis. *Biomedicines* **2020**, *8*, 406.
19. Adamczyk, B.; Adamczyk-Sowa, M. New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1973834.
20. Knoop, B.; Argyropoulou, V.; Becker, S.; Ferté, L.; Kuznetsova, O. Multiple Roles of Peroxiredoxins in Inflammation. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 60–64.
21. Massaad, C.A.; Klann, E. Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 2013–2054.
22. Uzawa, A.; Mori, M.; Masuda, H.; Ohtani, R.; Uchida, T.; Aoki, R.; Kuwabara, S. Peroxiredoxins are involved in the pathogenesis of multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Clin. Exp. Immunol.* **2020**, *202*, 239–248.
23. Solomon, A.J.; Watts, R.; Dewey, B.E.; Reich, D.S. MRI evaluation of thalamic volume differentiates MS from common mimics. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2017**, *4*, e387.
24. Gmitterová, K.; Heinemann, U.; Gawinecka, J.; Varges, D.; Ciesielczyk, B.; Valkovic, P.; Benetin, J.; Zerr, I. 8-OHdG in cerebrospinal fluid as a marker of oxidative stress in various neurodegenerative diseases. *Neurodegener. Dis.* **2009**, *6*, 263–269.
25. Tasset, L.; Agüera, E.; Sánchez-López, F.; Feijó, M.; Giraldo, A.I.; Cruz, A.H.; Gascón, F.; Túnez, I. Peripheral oxidative stress in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Clin. Biochem.* **2012**, *45*, 440–444.
26. Miller, E.; Morel, A.; Saso, L.; Feijó, M.; Giraldo, A.I.; Cruz, A.H.; Gascón, F.; Túnez, I. Isoprostanes and Neuroprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Oxidat. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, e572491.
27. Lam, M.A.; Maghazal, G.J.; Khademi, M.; Piehl, F.; Ratzer, R.; Christensen, J.R.; Sellebjerg, F.T.; Olsson, T.; Stocker, R. Absence of systemic oxidative stress and increased CSF prostaglandin F_{2α} in progressive MS. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2016**, *3*, e256.
28. Meyerhoff, N.; Rohn, K.; Carlson, R.; Tipold, A. Measurement of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Concentration in Canine Cerebrospinal Fluid and Serum and Its Involvement in Neuroinflammation. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *315*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00315>.

29. Khalil, M.; Renner, A.; Langkammer, C.; Enzinger, C.; Ropele, S.; Stojakovic, T.; Scharnagl, H.; Bachmaier, G.; Fichler, A.; Archelos, J.; et al. Cerebrospinal fluid lipocalin 2 in patients with clinically isolated syndromes and early multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **2016**, *22*, 1560–1568.
30. Burgetova, A.; Dusek, P.; Vaneckova, M.; Horakova, D.; Langkammer, C.; Krasensky, J.; Sobisek, L.; Matras, P.; Masek, M.; Seidl, Z. Thalamic Iron Differentiates Primary-Progressive and Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Am. J. Neuroradiol.* **2017**, *38*, 1079–1086.
31. Burgetova, A.; Seidl, Z.; Krasensky, J.; Horakova, D.; Vaneckova, M. Multiple sclerosis and the accumulation of iron in the Basal Ganglia: Quantitative assessment of brain iron using MRI T2 relaxometry. *Eur. Neurol.* **2010**, *63*, 136–143.
32. Burgetova, A.; Dusek, P.; Pudlac, A.; Nytrova, P.; Vaneckova, M.; Horakova, D.; Krasensky, J.; Lambert, L. Deep grey matter iron content in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **2019**, *25*, 705–706.
33. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidat. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 360438.
34. Maciejczyk, M.; Żebrowska, E.; Zalewska, A.; Chabowski, A. Redox Balance, Antioxidant Defense, and Oxidative Damage in the Hypothalamus and Cerebral Cortex of Rats with High Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Oxidat. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 6940515.
35. Andravizou, A.; Dardiotis, E.; Artemiadis, A.; Sokratous, M.; Siokas, V.; Tsouris, Z.; Aloizou, A.-M.; Nikolaidis, I.; Bakirtzis, C.; Tsvigoulis, G.; et al. Brain atrophy in multiple sclerosis: Mechanisms, clinical relevance and treatment options. *Autoimmun. Highlights* **2019**, *10*, 7.