

doi: 10.14735/amcsnn2018404

# Biomarkery progrese onemocnění a prognózy u pacientů s roztroušenou sklerózou

## Biomarkers of disease course and prognosis in multiple sclerosis patients

### Souhrn

Roztroušená skleróza je chronické autoimunitní a neurodegenerativní onemocnění CNS. Průběh choroby je interindividuálně značně variabilní. I přes významný pokrok v diagnostice RS v posledních desetiletích stále neexistuje spolehlivý test, který by identifikoval pacienty s relativně příznivým průběhem a pacienty s těžkou agresivní formou nemoci. Prognózu onemocnění je do určité míry možné stanovit dle klinických projevů či charakteru postižení na MR. V současné době se hledají nové parametry lépe vyjadřující průběh onemocnění již na jeho začátku. Přesnější stratifikace nemoci má umožnit volbu terapie přiměřenou formě nemoci. V článku předkládáme aktuální přehled potenciálních biomarkerů průběhu RS vyšetřovaných v séru, periferní krvi a likvoru. V bližším detailu představujeme ty, které jsou v současné době středem zájmu – neurofilamenta, chitinase 3-like proteiny, vitamin D a mikroRNA.

### Abstract

Multiple sclerosis is a chronic, autoimmune and neurodegenerative disorder of the CNS. The course of the disease is highly variable among different patients. Even though there has been great progress in the diagnostics of MS in recent decades, we still lack a reliable diagnostic tool that would distinguish between a relatively benign course and a highly active, severe form of the disease. To a certain measure, it is possible to predict future prognosis based on clinical manifestations of the disease and/or the nature of the lesions seen in MRI. Currently, a search for new substances capable of better prediction of the disease course even from the onset of the disease is taking place. More accurate disease stratification should allow for administration of a treatment more appropriate to the clinical type of the disease. Here, we present an up-to-date summary of potential serum, peripheral blood and cerebrospinal fluid biomarkers of the MS course. In greater detail we present the most prominent ones – neurofilaments, chitinase 3-like proteins, vitamin D and microRNA.

### Úvod

Roztroušená skleróza je chronické autoimunitní a degenerativní onemocnění CNS. Již v časných fázích onemocnění dochází na podkladě chronického zánětu k poškození myelinu a také ke ztrátě neuronů a axonů. Prevalence onemocnění v ČR je 170 až 200/100 000, postihuje hlavně mladé jedince, častěji ženy v poměru 2:1 [1]. Diagnóza onemocnění je v současnosti stanovena na základě McDonaldových kritérií z roku 2017 [2]. Klinicky izolovaný syndrom (CIS) označuje klinické projevy,

kteří při nálezů charakteristických lézí CNS na MR, případně i typického nálezů v mozkomíšním moku, svědčí pro první příznak RS. Průběh choroby je interindividuálně značně variabilní. U některých pacientů na sebe od začátku onemocnění rychle navazují

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

**M. Petržalka<sup>1</sup>, E. Meluzínová<sup>1</sup>, J. Libertinová<sup>1</sup>, J. Hanzalová<sup>1,2</sup>, P. Marusič<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup> Ústav imunologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha



**MUDr. Marko Petržalka**  
**Neurologická klinika**  
**2. LF UK a FN Motol**  
**V Úvalu 84**  
**150 06 Praha 5**  
**e-mail: markopetrzalka@gmail.com**

Přijato k recenzi: 19. 10. 2017

Přijato do tisku: 17. 4. 2018

### Klíčová slova

roztroušená skleróza – klinicky izolovaný syndrom – biomarkery – prognóza – neurofilamenta – chitinase 3-like proteiny – vitamin D – mikroRNA

### Key words

multiple sclerosis – clinically isolated syndrome – biomarkers – prognosis – neurofilaments – chitinase 3-like proteins – vitamin D – microRNA

těžké ataky s neúplnou úpravou stavu a choro-  
ba vede během několika let k závažné in-  
validitě. Jiní nemocní vyvinou druhou ataku  
až po mnoha letech od CIS a i neléčené one-  
mocnění může mít relativně příznivou pro-  
gnózu. Průběh onemocnění lze hodnotit  
podle klinických a paraklinických paramet-  
rů. V klinických studiích se uplatňují ze-  
jména následující: doba do konverze CIS do  
definitivní RS, počet relapsů (většinou vyjád-  
řen jako počet za 1 rok, tzv. annual relaps-  
rate), objem lézí a počet nových lézí (lesion  
load) na MR a vývoj mozkové atrofie. K hod-  
nocení funkčního postižení pacienta slouží  
evaluační škály – nejrozšířenější je Expanded  
Disability Status Scale (EDSS), dále jsou využí-  
vány Multiple Sclerosis Functional Composite  
(MSFC) či Multiple Sclerosis Severity Scale  
(MSSS).

Pojem biomarker zahrnuje širokou škálu  
objektivních ukazatelů zdravotního stavu,  
které mohou být přesně a opakovaně mě-  
řeny [3]. Tyto ukazatele se uplatňují jak v dia-  
gnostice patologického procesu, tak při sledo-  
vání vývoje nemoci a také při monitoraci  
efektu zvolené léčby. Biomarkery mohou  
být různé povahy – od klinických a fyzikál-  
ních charakteristik pacienta, až po výsledky  
laboratorních vyšetření. V podmínkách vý-  
zkumu RS se již tradičně jedná o markery li-  
kvorologické, sérologické, klinické a radio-  
logické. V současné době jsou k predikci  
průběhu onemocnění využívány zejména  
některé klinické či radiologické ukazatele,  
např. první těžká ataka s kmenovými pří-  
znaky nebo mnohočetný proces s en-  
hancementem po podání gadolinia na MR  
mohou již v době CIS identifikovat pacienty  
s těžkou formou nemoci. Důležitým likvo-  
rologickým prognostickým markerem (ze-  
jména konverze CIS do RS) jsou oligoklon-  
ální pásky (oligoclonal bands; OB). Pozitivita  
OB je od prosince 2017 opět součástí dia-  
gnostických kritérií pro RS a doplňuje pů-  
vodní kritérium o diseminaci v čase [2].

Etablovaných laboratorních biomarkerů  
je málo, přičemž zatím neexistuje spo-  
lehlivý test, který by byl schopen odhalit  
pacienty, kteří na počátku onemocnění jeví  
známky mírného průběhu a posléze vyví-  
nou těžkou, invalidizující formu nemoci. Ta-  
kové ukazatele by umožnily lépe rozhod-  
nout, u kterého pacienta je již na počátku  
onemocnění nutná agresivní imunomodu-  
lační léčba. V minulosti byly již zkoumány  
stovky biomarkerů predikujících u pacientů  
s RS průběh onemocnění, ale potenciál spo-  
lehlivě prokázat prediktivní hodnotu, a najít

tak uplatnění v klinické praxi, má zatím jen  
několik málo z nich [4]. Asi nejbliže k úspě-  
chu měly antimyelinové protilátky (protilátky  
proti myelinovému oligodendrocytárnímu  
proteinu; anti-MOG, protilátky proti myeli-  
novému bazickému proteinu; anti-MBP) [5],  
od nichž však muselo být po sérii protichůd-  
ných studií upuštěno. Ukázalo se, že problé-  
mem byl nevhodný metodologický postup  
(nevhodné použití Western blotu), který  
měřil nespecifickou reakci protilátek [6,7].  
S podobnými problémy se potýká většina  
zkoumaných biomarkerů.

Cílem tohoto článku je poskytnout pře-  
hled recentně publikovaných biomarkerů ze  
séra (případně periferní krve) a likvoru, které  
by umožnily stanovit prognózu u pacientů  
s CIS a relaps-remitentní formou RS (RR RS).  
Je třeba zdůraznit, že zatím žádný z níže uve-  
dených biomarkerů není běžně používán  
v rutinní klinické praxi.

### Potenciální biomarkery

Potenciální biomarkery uvádíme pro pře-  
hlednost ve dvou velkých skupinách: 1. mar-  
kery, u kterých lze očekávat zavedení do kli-  
nické praxe; 2. markery, které jsou zatím  
předmětem výzkumu.

Do první skupiny patří zejména neurofila-  
menta (Nf), ale uvádíme zde i chitinase 3-like  
proteiny, které již sice jsou jako markery pro-  
gnózy etablovány, nicméně v praxi zatím  
běžně využívány nejsou. Druhá skupina je  
dále rozdělena do několika podskupin dle  
funkce jednotlivých molekul – mikroRNA, vi-  
tamin D, antioxidanty a metabolismus lipidů,  
buněčné biomarkery, exprese genů, proti-  
látky a různé. Na závěr uvádíme ještě více-  
složkové modely predikce.

### Markery, u kterých lze očekávat zavedení do klinické praxe Neurofilamenta

Neurofilamenta jsou v současné době  
zřejmě nejslibnějším biomarkerem prů-  
běhu RS. Jsou hlavní komponentou axonál-  
ního cytoskeletu [8]. Skládají se z podjedno-  
tek lehkých (NfL, 68–70 kDa), středních (NfM,  
145–160 kDa) a těžkých (NfH, 200–220 kDa)  
řetězců. Ke stanovování jsou vzhledem k do-  
statečné stabilitě vhodné jen NfL a NfH [4].  
Při neuronálním poškození jsou uvolňovány do  
okolí, a proto o nich hovoříme jako o markeru  
neurodegenerace. Tato hypotéza byla potvr-  
zena i na myším modelu experimentální au-  
toimunitní encefalomyelitidy (EAE), ve kte-  
rém zvýšené hladiny NfL v séru i v likvoru  
u transgenních myší (s indukovanou expresí

p25) korelovaly s neurodegenerací, zatímco  
inhibice této exprese snížila jejich hladiny  
v séru i v likvoru a zároveň zastavila i pro-  
gresi neurodegenerace [9]. Hladiny NfL i NfH  
lze detekovat v likvoru i v séru a jsou obecně  
vyšší u pacientů s RS, zejména během re-  
lapsů [8]. Pro přehlednost popisujeme samo-  
statně NfL v likvoru, NfH v likvoru a Nf v séru.

### Neurofilamenta detekovaná v likvoru pacientů – lehké řetězce

Nejvíce prostudovanými Nf jsou NfL. Jejich  
vyšší hladiny v likvoru korelují s větším po-  
čtem relapsů (relaps rate), vyšším stupněm  
funkčního postižení (hodnoceno dle MSSS),  
větším počtem (lesion load) gadolinium en-  
hancujících lézí a mozkovou i míšňí atrofií  
v 15letém horizontu [4,8]. NfL měřená na za-  
čátku nemoci predikují další průběh s 85%  
specifitou (stanoveno dle počtu relapsů,  
aktivitou na MR a zhoršením v EDSS po 2 le-  
tech). Zlepšení přesnosti odhadu (o 2 %) je  
možné při současné detekci hladin některých  
dalších látek v likvoru, zejména osteo-  
pontinu nebo NfH [10]. Vzhledem k tomu, že  
hladiny Nf v likvoru odrážejí stupeň neuro-  
degenerace a vyšší hladiny NfL byly nalezeny  
u CIS, RR RS i primárně či sekundárně progre-  
sivních forem RS (PP RS, SP RS), je možné, že  
neurodegenerace hraje roli během celé ne-  
moci [4]. NfL by také mohly sloužit jako mar-  
kery odpovědi na léčbu – jejich hladiny se  
snižují na léčbě fingolimodem [8,11,12], na-  
talizumabem [8,12] i injekčními léky první  
linie [12].

### Neurofilamenta detekovaná v likvoru pacientů – těžké řetězce

Vyšší hladiny NfH v likvoru na začátku ne-  
moci lze označit za samostatný marker horší  
prognózy a také dřívější konverze CIS do de-  
finitivní RS. Hodnoty NfH rovněž korelují  
s vyšším EDSS v průřezových i longitudinál-  
ních studiích [4].

### Neurofilamenta detekovaná v séru pacientů

Výhodou Nf (zejména NfL) je, že vzhle-  
dem k těsné korespondenci jejich hladin  
v séru a v likvoru lze využít pouze vyšetření  
séra [4,11]. Dle výsledků recentních studií  
vyšší sérové hladiny NfL na začátku onemoc-  
nění korelují s vyšším počtem gadolinium  
enhancujících lézí a EDSS, rychlejším ná-  
růstem mozkové atrofie a nepřímo úměrně  
i s výsledky v neuropsychologických tes-  
tech. Rovněž predikují rychlejší nárůst funkč-  
ního postižení (EDSS) a vyšší relaps-rate v dal-

ším průběhu [12,13]. NfH v séru jsou zvýšena u pacientů s CIS, kteří rychle konvertují do RS, dále u RR RS i progresivních forem, proto se považují spíše za marker chronického axonálního poškození [4]. Před případným zavedením Nf do klinické praxe bude potřebné ověřit dosavadní výsledky na větších souborech pacientů a zdravých kontrol. Je nutné stanovit referenční meze Nf pro zdravou populaci, definovat senzitivitu a specifitu predikce založené na těchto biomarkerech, zohlednit komorbiditu a možný spolupodíl imunomodulační léčby a dalších faktorů na dosažených výsledcích [14]. Zavedení do rutinní praxe může bránit poměrně komplikovaná metodika a zatím vysoká cena vyšetření Nf.

### Chitinase 3-like proteiny

Chitinase-like proteiny patří do rodiny glykohydroláz, kam jsou řazeny i chitinázy. V případě chitináz se jedná o enzymy, které hydrolyzují chitin (polysacharid, jenž není v lidském organismu syntetizován, je přítomen u členovců), zatímco chitinase-like proteiny chitin jen vážou, ale enzymatickou aktivitu nemají [15]. Tyto molekuly jsou exprimovány astrocyty a mikroglia zejména v reakci na zánět [4], hrají roli ve vrozené i získané imunitě, jejich přesná funkce však dosud není zcela známa [15]. Do skupiny chitinase-like proteinů patří i detailně zkoumaný chitinase 3-like 1 protein (CHI3L1), který se jeví jako přesný ukazatel dalšího vývoje onemocnění již v době CIS [15], a také chitinase 3-like 2 protein (CHI3L2), který je asociován s ještě přesnější predikcí rozvoje funkčního postižení v dalším průběhu (dle EDSS a MSFC) [4,15]. Hodnota CHI3L1 v likvoru koreluje s progresí EDSS (rychlejší dosažení stupně 3 a 6) a predikuje dřívější konverzi do klinicky definitivní RS [16,17]. Chitinase 3-like proteiny mají potenciál i jako markery odpovědi na léčbu – zatímco jejich hladiny zůstávají neměnné při účinné terapii interferonem  $\beta$ , u non-respondérů na tuto terapii či u pacientů léčených glatiramer acetátem jejich hladina stoupá [18], na terapii fingolimodem [19] či natalizumabem [20] se naopak snižuje. Vyšší hladiny CHI3L1 i CHI3L2 v likvoru v době prvního příznaku RS jsou asociovány se zhoršováním kognice v dlouhodobém horizontu (Paced Auditory Serial Addition Test u CHI3L2, MSFC u CHI3L1) [15,17]. CHI3L1 byl na konferenci ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis) v roce 2014 v Kodani prezentován jako validovaný marker konverze CIS do RS [21].

### Markery, které jsou zatím předmětem výzkumu MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou malé jednovláknové nekódující molekuly ribonukleové kyseliny (RNA), které regulují expresi genů [22]. Molekuly miRNA se dostávají do periferní krve prostřednictvím exozomů, což jsou mikrovezikuly tvořené v cytoplazmě buněk, prostřednictvím kterých mezi sebou buňky komunikují [23]. Jsou důležité v mechanismech vrozené i získané imunity, regulují zánětlivé procesy a podílejí se i na vzniku autoimunitních reakcí [22]. Pro účast na těchto funkcích se předpokládá i jejich podíl v patogenezi některých imunitně podmíněných chorob. Spektrum zastoupení různých exozomálních miRNA v séru je dle některých autorů [23,24] pro pacienty s RS charakteristické. Snížení (čtyři typy Homo sapiens-miRNA; hsa-miRNA) či naopak zvýšení (dva typy virus Epstein-Barrové miRNA; EBV miRNA) některých miRNA se ukazuje jako specifická reakce během relapsů onemocnění [23,24]. Hladiny těchto miRNA rovněž korelují s progresí invalidity (dle zhoršení v EDSS) [24] či s vývojem na MR [25]. U některých vybraných miRNA jsou již známy i konkrétní geny, které jsou jimi regulovány. V případě výše zmíněné studie [23] se jedná o čtyři miRNA, které regulují diferenciaci lymfocytů Th17, Treg a Tr1 – buněk hrajících důležitou roli v patogenezi RS. Dalším příkladem je miRNA-384 a gen *SOC33*. Snížení exprese tohoto genu zlepšuje klinický průběh EAE, zatímco její zvýšení vede naopak ke zhoršení průběhu onemocnění [26]. Podobně je známý i gen *NCAM1* z rodiny adhezivních molekul, který hraje důležitou roli v mezibuněčné komunikaci, zejména během vývoje nervové soustavy. Transkript *NCAM1* je cílovou molekulou pro miRNA-572, jejíž sérové hladiny jsou sniženy u pacientů s RS. Toto snížení však není specifické jenom pro RS, ale bylo prokázáno i u dalších onemocnění [27]. Vyšetřování sérových hladin některých miRNA se známým patogenetickým působením se proto nabízí jako možnost pro predikci průběhu onemocnění.

### Vitamin D

Vitamin D, hlavně ve formě měřeného metabolitu kalcidiolu (25-hydroxycholecalciferol), a jeho role v patogenezi RS byla a stále je intenzivně zkoumána. Vitamin D má kromě své funkce v kostním metabolismu ještě další významnou úlohu, a to jako modulátor imunitního systému, kdy posouvá nastá-

vení imunity do stavu imunotolerance. Tento efekt je zprostředkovan zejména inhibicí diferenciace dendritických buněk a Th17 lymfocytů, utlumením aktivity Th1 lymfocytů, a naopak indukci lymfocytů Treg [28]. Známý je fenomén zvyšujícího se rizika RS se stoupanjící zeměpisnou šířkou, a tedy nižší expozicí slunečnímu záření a nižší hladinou vitamínu D [29]. Toto riziko se analogicky mění u jedinců, kteří se ze zemí s nižší zeměpisnou šířkou přestěhovali do zemí s vyšší zeměpisnou šířkou a obráceně [30]. Významná je dle dosavadních studií zejména hladina vitamínu D v dětství [31], která je odrazem času stráveného venku [30], nebo dokonce již i hladina během prenatálního vývoje. Roli tak hraje např. i měsíc narození a děti, které se narodily na podzim a jejichž matky měly během těhotenství dostatečnou expozici slunečnímu záření, mají nižší riziko RS v porovnání s dětmi narozenými na jaře [30]. Nižší hladina vitamínu D byla rovněž pozorována během relapsů a u pacientů v progresivní fázi nemoci [24]. Prediktivní hodnota vyšších hladin vitamínu D u pacientů s RR RS je dáována do korelace zejména s efektem na relaps-rate [32–34]. Některé studie poukazují na podobný efekt i při suplementaci vitamínu D, přičemž udávají snížení relaps-rate o 12–13,7 % na každé zvýšení sérové hladiny vitamínu D o 10 nmol/l [33,34]. Takový efekt by byl na úrovni některých současných imunomodulačních léků používaných v léčbě RS, problémem je však spolupodíl četných třetích faktorů (confounderů).

V rámci recentní systematické review pojednávající o vlivu nutriční na průběh nemoci u pacientů s RS byl vitamin D identifikován jako jediný významný prognostický marker z celé řady nutrientů [35]. Analyzováno bylo 47 studií hodnotících efekt substancí jako karnitin, melatonin, koenzym Q10 a dalších (extrakt z hroznového vína, ženšen, borůvky, zelený čaj). Byla prokázána korelace vyšších hladin vitamínu D se snížením rizika rozvoje RS. U pacientů s již stanovenou diagnózou RS byla nalezena negativní korelace s rizikem vzniku nových MR lézí, rovněž s hodnotou relapse-rate a rychlostí nárůstu funkčního postižení (EDSS). Během relapsů se potvrdila nižší hladina vitamínu D.

### Antioxidanty a metabolismus lipidů

Zánětlivé procesy CNS hrají důležitou roli v patogenezi RS, a to zejména v době relapsů onemocnění. Narůstá počet studií, které se zabývají hypotézou, že přítomnost volných radikálů a oxidativní stres mohou

Tab. 1. Buněčné biomarkery, exprese genů, protilátky a další biomarkery.

Skupina	Biomarker	Vzorek	Typ nemoci	Zjištěná korelace
buněčné biomarkery	T lymfocyty (Vδ1T) produkující INF $\gamma$ [41]	PK	časná RS	koreluje s MR nálezem a hladinou NFL v CSF, ↓ po terapii natalizumabem
	neutrofilny a asociované proteiny [42]	PK, CSF	EAE	role v patogenezi, ↑ v relapsech, molekuly asociované s neutrofilny korelují s funkčním postižením
exprese genů	polymorfizmy (SNPs) v genech pro integriny ITGA4 a osteopontin SPP1 [43]	PK	RS	koreluje s horší prognózou
	human endogenous retrovirus [44]	PK, CSF	RS, časná RS	↑ exprese u RS, koreluje s relaps-rate, s časným funkčním postižením a rizikem SP-RS, ↓ po terapii natalizumabem
	mitochondriální DNA (mtDNA) [45]	CSF	RS	↑ u P-RS, koreluje s T2 lesion loadem a mozkovou atrofií na MR, ↓ po terapii fingolimodem
protilátky	IgG proti transglutamináze-6 [46]	CSF	RS, EAE	↑ u P-RS a v relapsech
	anti-EBNA-1 IgG protilátky a IL-8 [47]	Se, CSF	časná RS	↑ anti-EBNA-1 IgG v séru a IL-8 v CSF u pacientů v časné fázi RS
	anti-Gal-8 protilátky [48]	Se, CSF	RS, EAE	predikuje časný rozvoj funkčního postižení
	free immunoglobulin light chains (FILC) [49]	CSF	CIS, RS	$\kappa$ a poměr $\kappa$ /celkové FILC predikuje u CIS konverzi do RS
další biomarkery	netrin-1 [50]	Se, MT	RS, EAE	↓ u pacientů s RS i u EAE, hlavně u aktivní nemoci
	semaphorin 3A [51,52]	Se, PBMC	RS, časná RS	↓ u pacientů s RS, přímo koreluje s funkčním postižením u žen
	prolaktin [51]	Se	RS	negativně koreluje s funkčním postižením u mužů
	talin-1 [53]	Se	RS	↑ u pacientů s RS, ↑ během relapsů
	MOG jako součást exozomů [54]	PK	RS	koreluje s aktivitou nemoci, ↑ v relapsech, ↑ u SP-RS
	laktát [55–57]	Se	RS, EAE	↑ u pacientů se všemi formami RS, nejvyšší u P-RS, koreluje s funkčním postižením
	methionin enkefalin [58]	Se	EAE	↓ na začátku nemoci a v progresi, ↑ po léčbě OGF

CIS – klinicky izolovaný syndrom; CSF – likvor; EAE – experimentální autoimunitní encefalomyelitida; EDSS – Expanded Disability Status Scale; IgG – imunoglobulin G; INF $\gamma$  – interferon  $\gamma$ ; MOG – myelin oligodendrocyte protein; MT – myší tkáň (mícha, mozeček); NFL – lehké řetězce neurofilament; OGF – opioidní růstový faktor; P-RS – progresivní RS (primární i sekundární); PBMC – exprese v mononukleárních leukocytech periferní krve; PK – periferní krev; Se – sérum; SP-RS – sekundárně progresivní RS

↑ – zvýšení, ↓ – snížení

být nejenom důsledkem zánětu CNS, nýbrž i jeho příčinou. V podobné souvislosti je rovněž zkoumán metabolismus lipidů – ateroskleróza je dnes chápána jako zánětlivý stav organismu. I u pacientů s RS bylo pozorováno zvýšení aterogenního indexu, zvýšená inzulinová rezistence, ale i zvýšení hladin dalších látek, jako jsou triacylglyceroly, kyselina močová či elevace feritinu asociovaná s nárůstem CRP [36]. Nárůst hladiny feritinu v séru u pacientů s RS je v kombinaci s dalšími markery oxidativního stresu asociovan se 14% nárůstem v EDSS [37].

Další oblastí výzkumu jsou i některé adipokiny – cytokiny produkované tukovou tkání. Ve studii porovnáující pacienty s klasickým průběhem RS (ve studii pacienty s EDSS > 3 po 10 letech od stanovení diagnózy RS) proti benignímu průběhu (EDSS < 3), se u první skupiny ukázaly signifikantně vyšší hladiny

zejména dvou adipokinů: adiponektinu a monocyte chemoattractant proteinu-1 [38].

Ze spektra antioxidantů byl zkoumán sérový glutathion, součást metabolismu methioninu, kdy hladina glutathionu i methioninu byla v porovnání se zdravými kontrolami u pacientů s RS významně snížena. [39]. Také větší míra karbonylace proteinů v likvoru u EAE než u zdravých kontrol naznačuje roli oxidativního stresu a vzhledem k nárůstu této hodnoty odpovídající vývoji CIS → RR RS → SP RS se nabízí i jako potenciální biomarker progresu onemocnění [40].

### Buněčné biomarkery, exprese genů, protilátky a další

Ostatní potenciální biomarkery se objevily v literatuře ojediněle nebo jen v malém počtu studií. Pro přehlednost je uvádíme ve formě tabulky (tab. 1) [41–58].

### Vícesložkové modely predikce

Ke stanovení predikce vývoje onemocnění byly vytvořeny i modely vícesložkové využívající většího počtu markerů zároveň. Skupina španělských autorů sledovala 12 biomarkerů validovaných v jejich předchozí studii [59]. Jako nejspolehlivější se ukázal model s rozdělením pacientů do skupin nejdříve podle hladiny interleukinu 7 (IL-7) v séru a následně podle sérové hladiny C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10). Tímto způsobem se odlišily rizikové skupiny – zatímco RS byla pravděpodobnější u nízkého IL-7 (cut-off 141 pg/ml), jeho zvýšené hodnoty onemocnění prakticky vylučovaly. Hodnoty CXCL10 poté analogicky rozlišily primárně progredientní formu (< 570 pg/ml) od relaps-remitentní (570–1 243 pg/ml) a od zdravých kontrol (> 1 243 pg/ml) [60]. Jiná studie se zabývala metabolickým profilem pacientů

s RS, ve kterém se sfingomyelin a lysofosfatidyl etanolamin ukázaly jako nejsilnější prediktory průběhu onemocnění. Tento model byl ve studii schopen odlišit pacienty s RS od zdravých kontrol a následně identifikovat pacienty, kteří budou po 2 letech sledování bez relapsu či bez progresu v EDSS, s malým nárůstem v EDSS (< 3) nebo s vysoce aktivní nemocí (EDSS > 4,5) [61]. Podobně byl zkoumán i rozsáhlý set lidských autoprotilátek namířených proti zhruba 9 500 antigenům. Z tohoto spektra bylo u pacientů s RS potvrzeno signifikantní zvýšení hladin 54 autoprotilátek, které dle analýzy úspěšně detekovaly pacienty s RR RS nebo SP RS [62]. Další panel biomarkerů byl navržen skupinou australských autorů, kteří zkoumali metabolismus tryptofanu. Pomocí šesti metabolitů byli schopni s prediktivní hodnotou 91 % v pěti krocích odlišit SP RS, PP RS, RR RS a zdravé kontroly [63]. Na závěr této části ještě zmiňme výsledek bioinformatické analýzy dat z 99 studií proteinů v likvoru [64], která odhalila unikátní proteomický profil 76 bílkovin zvýšených výhradně u RS (většina z nich patřících mezi proteiny koagulace, aktivace komplementu, regulace apoptózy či regulace axonogeneze). Tento výsledek sice sám o sobě není významný stran predikce prognózy, může však být cenným zdrojem biomarkerů pro budoucí výzkum.

## Závěr

Biomarkery průběhu onemocnění jsou důležité pro optimalizaci terapie pacientů s RS. Rutinně není vyšetřován zatím žádný ze zmíněných biomarkerů, snad s výjimkou vitamínu D. Ten je jediným významným prognostickým markerem, jehož snížené hladiny je možné kompenzovat perorální suplementací. Za nejslibnější biomarker jsou považována Nf, u nichž je možné očekávat zařazení do portfolia vyšetření u pacientů na počátku onemocnění RS. CHI3L1 je významným markerem konverze CIS do klinicky definitivní RS, proto není vyloučeno i jeho stanovování v rámci základního vyšetřovacího algoritmu. Zatím není dostatek důkazů pro stanovování hladin miRNA v séru, očekává se však rozsáhlý výzkum v této oblasti.

Potenciálních biomarkerů stále přibývá. Velmi dobrým výstupem se zdají být více-složkové modely predikce, které by mohly do budoucna nabídnout algoritmy pro použití i interpretaci konkrétních významných biomarkerů v klinické praxi.

## Literatura

1. Souhrnná zpráva z registru k 31. 12. 2016, zapojeno 15 center, počet pacientů v analýze 9 044. [online] Nadační fond Impuls 2017. Dostupné z URL: <http://nfmipuls.cz/index.php/roztrouzena-skleroza-registr/remus-zaverecne-zpravy>.
2. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018; 17(2): 162–173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
3. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5(6): 463–466. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.
4. Dubuisson N, Puentes F, Giovannoni G et al. Science is 1% inspiration and 99% biomarkers. *Mult Scler* 2017; 23(11): 1442–1452. doi: 10.1177/1352458517709362.
5. Berger T, Rubner P, Schautzer F et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Eng J Med* 2003; 349(2): 139–145. doi: 10.1056/NEJMoa022328.
6. Kuhle J, Pohl C, Mehling M et al. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N Eng J Med* 2007; 356(4): 371–378. doi: 10.1056/NEJMoa063602.
7. Pelayo R, Tintoré M, Montalban X et al. Antimyelin antibodies with no progression to multiple sclerosis. *N Eng J Med* 2007; 356(4): 426–428. doi: 10.1056/NEJMoa062467.
8. van Munster CEP, Uitdehaag BMJ. Outcome measures in clinical trials for multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2017; 31(3): 217–236. doi: 10.1007/s40263-017-0412-5.
9. Brureau A, Blanchard-Bregeon V, Pech C et al. NF-L in cerebrospinal fluid and serum is a biomarker of neuronal damage in an inducible mouse model of neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 2017; 104: 73–84. doi: 10.1016/j.nbd.2017.04.007.
10. Håkansson I, Tisell A, Cassel P et al. Neurofilament light chain in cerebrospinal fluid and prediction of disease activity in clinically isolated syndrome and relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2017; 24(5): 703–712. doi: 10.1111/ene.13274.
11. Piehl F, Kockum I, Khademi M et al. Plasma neurofilament light chain levels in patients with MS switching from injectable therapies to fingolimod. *Mult Scler* 2017; 23(12): 135245851771513. [Epub ahead of print]. doi: 10.1177/1352458517715132.
12. Disanto G, Barro C, Benkert P et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2017; 81(6): 857–870. doi: 10.1002/ana.24954.
13. Kuhle J, Nourbakhsh B, Grant D et al. Serum neurofilament is associated with progression of brain atrophy and disability in early MS. *Neurology* 2017; 88(9): 826–831. doi: 10.1212/WNL.0000000000003653.
14. Disanto G, Barro C, Benkert P et al. Serum neurofilament light: a biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2017; 81(6): 857–870. doi: 10.1002/ana.24954.
15. Møllgaard M, Degn M, Sellebjerg F et al. Cerebrospinal fluid chitinase-3-like 2 and chitotriosidase are potential prognostic biomarkers in early multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2016; 23(5): 898–905. doi: 10.1111/ene.12960.
16. Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Precision medicine in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2016; 29(3): 254–262. doi: 10.1097/WCO.0000000000000336.
17. Modvig S, Degn M, Roed H et al. Cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain predict multiple sclerosis development and disability after optic neuritis. *Mult Scler* 2015; 21(14): 1761–1770. doi: 10.1177/1352458515574148.
18. Matute-Blanch C, Río J, Villar LM et al. Chitinase 3-like 1 is associated with the response to interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2017; 303: 62–65. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.12.006.
19. Novakova L, Axelsson M, Khademi M et al. Cerebrospinal fluid biomarkers of inflammation and degeneration as measures of fingolimod efficacy in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2017; 23(1): 62–71. doi: 10.1177/1352458516639384.
20. Stoop MP, Singh V, Stingl C et al. Effects of natalizumab treatment on the cerebrospinal fluid proteome of multiple sclerosis patients. *J Proteome Res* 2013; 12(3): 1101–1107. doi: 10.1021/pr3012107.
21. Fernández O, Álvarez-Cermeño JC, Arnal-García C (eds). Review of the novelties presented at the 29<sup>th</sup> Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) (I) 2013, Copenhagen, Denmark. Madrid: *Rev Neurol* 2014; 59(06): 269–280.
22. Selmaj I, Mycko MP, Raine CS et al. The role of exosomes in CNS inflammation and their involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2017; 306: 1–10. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.02.002.
23. Selmaj I, Cichalewska M, Namiecinska M et al. Global exosome transcriptome profiling reveals biomarkers for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2017; 81(5): 703–717. doi: 10.1002/ana.24931.
24. Wang YF, He DD, Liang HW et al. The identification of up-regulated ebv-miR-BHRF1-2-5p targeting MALT1 and ebv-miR-BHRF1-3 in the circulation of patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2017; 189(1): 120–126. doi: 10.1111/cei.12954.
25. Regev K, Healy BC, Khalid F et al. association between serum microRNAs and magnetic resonance imaging measures of multiple sclerosis severity. *JAMA Neurol* 2017; 74(3): 275–285. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.5197.
26. Qu X, Han J, Zhang Y et al. MiR-384 Regulates the Th17/treg ratio during experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 88. doi: 10.3389/fncel.2017.00088.
27. Mancuso R, Agostini S, Marventano I et al. NCAM1 is the target of miRNA-572: validation in the human oligodendroglial cell line. *Cell Mol Neurobiol* 2018; 38(2): 431–440. doi: 10.1007/s10571-017-0486-0.
28. Miclea A, Miclea M, Pistor M et al. Vitamin D supplementation differentially affects seasonal multiple sclerosis disease activity. *Brain Behav* 2017; 7(8): e00761. doi: 10.1002/brb3.761.
29. Havrdová E (ed). Vitamin D a zeměpisná šířka. In: *Roztroušená skleróza*. Praha: Mladá fronta 2013: 105.
30. Pierrot-Deseilligny C, Soubrierbielle JC, Vitamin D and multiple sclerosis: an update. *Mult Scler Relat Disord* 2017; 14: 35–45. doi: 10.1016/j.msard.2017.03.014.
31. Gianfrancesco MA, Stridh P, Rhead B et al. Evidence for a causal relationship between low vitamin D, high BMI, and pediatric-onset MS. *Neurology* 2017; 88(17): 1623–1629. doi: 10.1212/WNL.0000000000003849.
32. Ascherio A, Munger KL, White R et al. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol* 2014; 71(3): 306–314. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5993.
33. Pierrot-Deseilligny C, Rivaud-Péchoux S, Clercson P et al. Relationship between 25-OH-D serum level and relapse rate in multiple sclerosis patients before and after vitamin D supplementation. *Ther Adv Neurol Disord* 2012; 5(4): 187–198. doi: 10.1177/1756285612447090.
34. Simpson S, Taylor B, Blizzard L et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in MS. *Ann Neurol* 2010; 68(2): 193–203. doi: 10.1002/ana.22043.
35. Bagur MJ, Murcia MA, Jiménez-Monreal AM et al. Influence of diet in multiple sclerosis: a systematic review. *Adv Nutr* 2017; 8(3): 463–472. doi: 10.3945/an.116.014191.
36. Oliveira SR, Kallaur AP, Lopes J et al. Insulin resistance, atherogenicity, and iron metabolism in multiple sclerosis with and without depression: associations with inflammatory and oxidative stress biomarkers and uric acid. *Psychiatry Res* 2017; 250: 113–120. doi: 10.1016/j.psychres.2016.12.039.

37. Ferreira KPZ, Oliveira SR, Kallaur AP et al. Disease progression and oxidative stress are associated with higher serum ferritin levels in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2017; 373: 236–241. doi: 10.1016/j.jns.2016.12.039.
38. Çoban A, Düzel B, Tüzün E et al. Investigation of the prognostic value of adipokines in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 2017; 15: 11–14. doi: 10.1016/j.msard.2017.04.006.
39. Bystrická Z, Laubertová L, Ďurfinová M et al. Methionine metabolism and multiple sclerosis. *Biomarkers* 2017; 22(8): 747–754. doi: 10.1080/1354750X.2017.1334153.
40. Irani DN. Cerebrospinal fluid protein carbonylation identifies oxidative damage in autoimmune demyelination. *Anna Clin Transl Neurol* 2017; 4(2): 145–150. doi: 10.1002/acn3.379.
41. Singh AK, Novakova L, Axelsson M et al. High interferon- $\gamma$  uniquely in V $\delta$ 1 T cells correlates with markers of inflammation and axonal damage in early multiple sclerosis. *Front Immunol* 2017; 8: 260. doi: 10.3389/fimmu.2017.00260.
42. Casserly CS, Nantes JC, Whittaker Hawkins RF et al. Neutrophil perversion in demyelinating autoimmune diseases: Mechanisms to medicine. *Autoimmun Rev* 2017; 16(3): 294–307. doi: 10.1016/j.autrev.2017.01.013.
43. Dardiotis E, Panayiotou E, Provatas A et al. Gene variants of adhesion molecules act as modifiers of disease severity in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2017; 4(4): e350. doi: 10.1212/NXI.0000000000000350.
44. Morandi E, Tarlinton RE, Tanasescu R et al. Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: causation, association, or after-effect? *Mult Scler* 2017; 23(8): 1050–1055. doi: 10.1177/1352458517704711.
45. Leurs CE, Podlesny P, Trullas R et al. Cerebrospinal fluid mtDNA concentration is elevated in multiple sclerosis disease and responds to treatment. *Mult Scler* 2017; 24(4): 472–480. doi: 10.1177/1352458517699874.
46. Cristofanilli M, Gratch D, Pagano B et al. Transglutaminase-6 is an autoantigen in progressive multiple sclerosis and is upregulated in reactive astrocytes. *Mult Scler* 2016; 23(13): 1707–1715. doi: 10.1177/1352458516684022.
47. Sisay S, Lopez-Lozano L, Mickunas M et al. Untreated relapsing remitting multiple sclerosis patients show antibody production against latent Epstein Barr Virus (EBV) antigens mainly in the periphery and innate immune IL-8 responses preferentially in the CNS. *J Neuroimmunol* 2017; 306: 40–45. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.02.017.
48. Pardo E, Cárcamo C, Uribe-San Martín R et al. Galectin-8 as an immunosuppressor in experimental autoimmune encephalomyelitis and a target of human early prognostic antibodies in multiple sclerosis. *PLoS One* 2017; 12(6): e0177472. doi: 10.1371/journal.pone.0177472.
49. Nazarov VD, Makshakov GS, Mazing AV et al. Diagnostic value of immunoglobulin free light chains at the debut of multiple sclerosis. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2017; 117(2): 60–65. doi: 10.17116/jnevro.20171172260-65.
50. Mulero P, Córdova C, Hernández M et al. Netrin-1 and multiple sclerosis: a new biomarker for neuroinflammation? *Eur J Neurol* 2017; 24(9): 1108–1115. doi: 10.1111/ene.13340.
51. Jacob S, Al-Kandari A, Alroughani R et al. Assessment of plasma biomarkers for their association with Multiple Sclerosis progression. *J Neuroimmunol* 2017; 305: 5–8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.01.008.
52. Rezaeepoor M, Shapoori S, Ganjalikhani-hakemi M et al. Decreased expression of Sema3A, an immune modulator, in blood sample of multiple sclerosis patients. *Gene* 2017; 610: 59–63. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.013.
53. Muto M, Mori M, Liu J et al. Serum soluble Talin-1 levels are elevated in patients with multiple sclerosis, reflecting its disease activity. *J Neuroimmunol* 2017; 305: 131–134. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.02.008.
54. Galazka G, Mycko MP, Selmaj I et al. Multiple sclerosis: Serum-derived exosomes express myelin proteins. *Multiple Sclerosis Journal* 2018; 24(4): 449–458. doi: 10.1177/1352458517696597.
55. Ghareghani M, Zibara K, Sadeghi H et al. Fluvoxamine stimulates oligodendrogenesis of cultured neural stem cells and attenuates inflammation and demyelination in an animal model of multiple sclerosis. *Sci Rep* 2017; 7(1): 4923. doi: 10.1038/s41598-017-04968-z.
56. Amorini AM, Nociti V, Petzold A et al. Serum lactate as a novel potential biomarker in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842(7): 1137–1143. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.04.005.
57. Ghareghani M, Ghanbari A, Dokoohaki S et al. Methylprednisolone improves lactate metabolism through reduction of elevated serum lactate in rat model of multiple sclerosis. *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 1504–1509. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.042.
58. Ludwig MD, Zagon IS, McLaughlin PJ. Elevated serum [Met 5]-enkephalin levels correlate with improved clinical and behavioral outcomes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res Bull* 2017; 134: 1–9. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.06.015.
59. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andrés C et al. Plasma biomarkers discriminate clinical forms of multiple sclerosis. *PLoS One* 2015; 10(6): e0128952. doi: 10.1371/journal.pone.0128952.
60. Fernández-Paredes L, Casrouge A, Decalf J et al. Multimarker risk stratification approach at multiple sclerosis onset. *Clin Immunol* 2017; 181: 43–50. doi: 10.1016/j.clim.2017.05.019.
61. Villoslada P, Alonso C, Agirrezabal I et al. Metabolomic signatures associated with disease severity in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2017; 4(2): e321. doi: 10.1212/NXI.0000000000000321.
62. DeMarshall C, Goldwaser EL, Sarkar A et al. Autoantibodies as diagnostic biomarkers for the detection and subtyping of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2017; 309: 51–57. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.05.010.
63. Lim CK, Bilgin A, Lovejoy DB et al. Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression. *Sci Rep* 2017; 7: 41473. doi: 10.1038/srep41473.
64. Bastos P, Ferreira R, Manadas B et al. Insights into the human brain proteome: Disclosing the biological meaning of protein networks in cerebrospinal fluid. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017; 54(3): 185–204. doi: 10.1080/10408363.2017.1299682.