

Biomarkery roztroušené sklerózy – současné možnosti a perspektivy

Biomarkers of Multiple Sclerosis – Current Options and Future Perspectives

Souhrn

Roztroušená skleróza je chronické onemocnění centrálního nervového systému neznámé etiologie s projevy autoimunitního zánětu a neurodegenerace. Onemocnění je heterogenní s nepředvídatelnou prognózou. Průběh choroby lze monitorovat klinickými parametry a sledováním vývoje patologických změn na magnetické rezonanci. I když máme znalosti o efektu nově zaváděných léků na základě klinických studií, není možné předvídat jejich účinnost u konkrétního pacienta. Proto se v posledních letech prosazuje snaha najít takové laboratorní markery, které by co možná nejspolehlivěji odpověděly na otázky spojené se subklinickou aktivitou onemocnění, jeho progresí a usnadnily terapeutické rozhodnutí na základě personalizované medicíny.

Abstract

Multiple sclerosis is a chronic disease of the central nervous system of unknown etiology with manifestations of autoimmune inflammation and neurodegeneration. The disease is heterogeneous with an unpredictable outcome. The course of the disease can be monitored with clinical parameters as well as pathological changes on magnetic resonance imaging. Even though the effects of newly introduced drugs are known from clinical trials, it is not possible to predict their efficacy in a specific patient. Therefore, efforts have intensified over the recent years to identify laboratory markers that would as reliably as possible answer questions on subclinical disease activity, its progression and would facilitate therapeutic decisions based personalized medicine.

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declare he has 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.

J. Piřha

Neurologické oddělení, Krajská zdravotní, a.s. – Nemocnice Teplice o. z.



MUDr. Jiří Piřha
Neurologické oddělení
Krajská zdravotní, a.s. –
Nemocnice Teplice o. z.
Duchcovská 53
415 29 Teplice
e-mail: pithaj@seznam.cz

Přijato k recenzi: 2. 1. 2015

Přijato do tisku: 24. 3. 2015

Klíčová slova

roztroušená skleróza – terapie – biomarkery

Key words

multiple sclerosis – therapy – biomarkers

Úvod

Roztroušená skleróza (RS) je chronické závažné onemocnění centrálního nervového systému s projevy degenerace, které je nejčastější netraumatickou příčinou invalidity mladých lidí. Předpokládá se, že celosvětově je chorobou postiženo kolem 2,3 mil. lidí. Akutní perivaskulární léze v oblasti bílé, ale i šedé hmoty jsou charakteri-

zovány autoimunitním zánětem. Demyelinizace, axonální ztráta a gliové jizvy jsou typické pro chronické léze. Reparativní procesy jsou omezené, zejména v pokročilejší fázi nemoci.

Prvním klinickým příznakem RS je klinicky izolovaný syndrom (Clinically Isolated Syndrome; CIS). Po určité době se rozvíjí u 85 % pacientů období střídání relapsů a re-

misí s různě výrazným neurologickým deficitem (relaps remitující RS; RR RS). Během 10–15 let dochází k rozvoji sekundárně progresivní fáze choroby (SP RS). U části pacientů onemocnění progreduje od svého počátku (primárně progresivní RS; PP RS) [1]. Klinická progresie souvisí s axonální degenerací, mikrogliální aktivací, mitochondriální dysfunkcí a oxidativním stresem [2].

Tab. 1. Nejdůležitější kandidátní biomarkery terapeutické odpovědi u RS [7].

Biomarker	Popis	Funkce
NAbs	NAbs proti IFN beta a natalizumabu	testování séra, užitečné pro ověření účinku interferonu beta nebo natalizumabu
fetuin-A	glykoprotein intratékálně zvýšený u RS, jeho sekrece je spojena s RS specifickou patologií mozku	biomarker subklinické aktivity v MM a terapeutické odpovědi na natalizumab
osteopontin	matrixový protein s pleiotropii funkcí, produkováný imunitními buňkami, přítomnými v RS lézích	biomarker subklinické aktivity v MM, intratékálního zánětu a terapeutické odpovědi na natalizumab
8-iso-PGF2a	produkt peroxidace lipidů, ukazatel oxidativního stresu, zvýšený u aktivní RS	biomarker oxidativního stresu v MM s pravděpodobně prediktivní hodnotou léčby, cílené na oxidativní stres (dimetyl fumarát)
CXCL13	intratékálně B buňkami produkováný chemokin, indikuje humorální odpověď	biomarker B buněčné odpovědi, potenciální ukazatel terapeutické odpovědi na rituximab
NFL/NFH	axonální proteiny, indikují poškození axonů	NFH v MM je možný biomarker akumulovaného axonálního poškození u progresivní RS, NFL je možný ukazatel sníženého axonálního poškození při léčbě natalizumabem nebo rituximabem
CHI3L1	protein exprimovaný mikroglíí a astrocyty v CNS u pacientů s CD RS	prognostický biomarker v MM konverze CIS do klinicky definitivní RS, možný ukazatel efektu DMD 1. volby

8-iso-PGF2a – 8-iso-prostaglandin F2a, CHI3L1 – chitinase 3-like 1, CIS – klinicky izolovaný syndrom, CD RS – klinicky definitivní roztroušená skleróza, CXCL13 – chemokine (C-X-C motif) ligand 13, DMD – Disease Modifying Drugs, IFN – interferon, MM – mozkomíšní mok, NAb – neutralizační protilátka, NFL – Neurofilament Heavy (těžké řetězce neurofilament), NFL – Neurofilament Light (lehké řetězce neurofilament), RS – roztroušená skleróza.

Tyto jevy nejsou postžitelné zobrazovacími metodami.

Příčina RS není jednoznačně známá. Předpokládá se zapojení různých patogenetických mechanismů, mezi něž patří hlavně genetické a environmentální faktory. Významná genetická predispozice k onemocnění souvisí s hlavním histokompatibilním systémem II. třídy (Human Leukocyte Antigen; HLA), konkrétně s *HLA DRB1*1501* alelou za účasti dalších alel, např. pro receptor interleukinu 2 (*IL2R*) a receptor interleukinu 7 (*IL7R*) [3]. Mezi environmentální faktory podílející se na rozvoji RS se řadí expozice viru Epstein-Barrové, hypovitaminóza D, kouření a pravděpodobně antigenní determinanty ve střevní mikroflóře [4].

Zásadní terapeutické opatření je co nejeftivněji zasáhnout v počáteční, zánětlivé fázi onemocnění tak, aby došlo k oddálení progresu choroby a zabránění invalidizace [5]. V současné době jsme svědky narůstající palety léků ovlivňujících

průběh onemocnění (Disease Modifying Drugs; DMD). Kromě klasických interferonů beta (IFN β), glatirameracetátu, natalizumabu a fingolimodu se do léčebné praxe dostávají alemtuzumab a další perorální léky (teriflunomid a dimetyl fumarát). Při rozhodování o optimální léčbě musíme zvážit poměr benefitu oproti efektu terapie, nikterak však nebývá zohledněna výrazná heterogenita onemocnění [6]. Situaci navíc komplikuje nepředvídatelný účinek DMD.

V současné době je efekt léčby hodnocen pomocí aktivity onemocnění (roční relaps rate), škálou invalidity (Expanded Disability Status Scale; EDSS) a parametry hodnocené pomocí magnetické rezonance (MR). Tyto údaje mají omezenou vypovídající hodnotu a nejsou schopny postihnout subklinickou aktivitu onemocnění. Existuje tedy potřeba citlivých, specifických, dostupných a relativně levných biomarkerů, které mohou přesněji detekovat aktivitu onemocnění a mohou sloužit jako náhradní (surrogate)

markery pro hodnocení terapeutické účinnosti. Přes nezpochybnitelnou vypovídající hodnotu MR jsme svědky snahy využít měřitelné hodnoty některých proteinů, lipidů, nukleových kyselin a dalších biomarkerů v séru a mozkomíšním moku (MM) k vyhodnocení a předvídání léčebných výsledků u konkrétního pacienta s RS v rámci personalizované medicíny [7]. Následný přehled by měl sloužit k orientaci v problematice méně či více nadějných biomarkerů, které by mohly být zavedeny do klinické praxe. Řada z nich je limitována nutností opakovaného odběru MM.

Neutralizační protilátky a jiné potenciální biomarkery ke zhodnocení terapeutického efektu

Detekce neutralizačních protilátek (NAb) je nejčastější používaná metoda, jak prokázat biologickou účinnost DMD. IFN β redukuje u RR RS klinické relapsy o 30 %. Klinické zkušenosti svědčí o tom, že 60 % pacientů odpovídá na léčbu IFN β tak, že RS je při dlouhodobé léčbě pod kontrolou. Zbývajících 40 % jsou non respondéři [8]. Někteří pacienti vyvinou tvorbu NAb, které snižují terapeutický efekt po 4–6 měsících od zahájení léčby [9]. Výskyt NAb souvisí s typem IFN β a způsobem jeho podání. Při intramuskulární aplikaci IFN β 1a se NAb vyvíjejí u 4 % pacientů, při subkutánním podání IFN β 1a a 1b se mohou objevit NAb až u 47 % nemocných [10]. Spolu s následným vyšetřením MxA proteinu (Myxovirus resistance protein A) a v případě negativního indukčního testu se u pacientů s pozitivními protilátkami doporučuje zvážit ukončení léčby kvůli nedostatečné terapeutické odpovědi.

Ačkoliv je natalizumab humanizovaná monoklonální protilátka, je podobně jako IFN β také imunogenní. Nejčastěji se NAb mohou vyskytovat během prvních šesti měsíců léčby [11]. U 4,5–14,1 % pacientů se NAb vyskytují kdykoliv v průběhu léčby, u 1–4,7 % léčených se mohou objevit přechodně, 3,5–9,4 % pacientů má protilátky trvale [12,13]. Kromě snížené terapeutické odpovědi se u nemocných s pozitivním výskytem NAb objevují projevy hypersenzitivity při aplikaci infuzí [14].

Dalším kandidátním biomarkerem pro posouzení účinnosti léčby natalizumabem je stanovení fetuinu A v MM. Fetuin A je alfa-2-HS-glykoprotein syntetizovaný v játrech [15]. Za fyziologických okolností se nevyskytuje v mozku dospělých, je však nachá-

zen ve fetálním MM, což podporuje teorii o jeho roli při vyzrávání CNS [16]. Jeho zvýšená hladina v MM se objevovala u nemocných s RS proti zdravým kontrolám [17]. Hladina fetuinu A byla vyšetřena v kohortě 77 pacientů léčených natalizumabem po dobu jednoho roku. Pokles jeho hladiny v MM byl vysoce signifikantní při jeho vyšetření po 6 a 12 měsících léčby u pacientů, kteří odpovídali na léčbu oproti těm, kteří z léčby neprofitovali [18]. Tyto nálezy ukazují relativně přesný laboratorní průkaz účinnosti léčby, což by mohlo kromě klinických a morfologických nálezů napomoci v terapeutickém rozhodovacím procesu. Při stanovení hladiny fetuinu A je nutné kromě určení specifity i provedení validizačních studií a ověření, zda se jeho pokles v MM vyskytuje i u jiných DMD. Jiným potenciálním biomarkérem se ukázaly cirkulující mononukleární buňky se znakem CD49d. Jejich neklesající počet predikuje sníženou terapeutickou odpověď na natalizumab [19].

Tau protein a S100b protein byly statisticky významně zvýšeny u pacientů s RS v porovnání s kontrolní skupinou. Hladina S100b proteinu poklesla po 24 měsících léčby mitoxantronem [20].

Některé kandidátní biomarkery jsou uvedeny v tab 1.

Biomarkery aktivity onemocnění

Naše současné znalosti o aktivitě RS se opírají o analýzu klinických parametrů a MR monitoring. MR je přitom málo senzitivní pro průkaz lézí v míše, v oblasti mozkové kůry nebo normálně vypadající bílé hmotě. Laboratorní biomarkery mají proto silný potenciál k tomu, aby se staly zástupnými markery aktivity choroby nejen v klinických studiích, ale i v klinické praxi.

Již zmiňovaný fetuin A se ukázal jako spolehlivý marker rychlé konverze z CIS do RR RS nebo dokonce do SP RS [21,22]. Fetuin A je zvýšen u pacientů se SP RS, ale nikoliv u PP RS [23].

Dalším studovaným biomarkérem aktivity RS je osteopontin. Je to prozánětlivý cytokin produkovaný aktivovanými zánětlivými buňkami a exprimovaný v zánětlivých lézích [24]. Hladiny osteopontinu jsou zvýšené u aktivní RS oproti kontrolám a snižují se při léčbě DMD [25]. Následující studie však prokázaly, že hladiny osteopontinu v séru nejsou dostatečně specifické pro odlišení jiných, paralelně probíhajících změn CNS, takže jeho sledování není zcela užitečné [26,27]. Bez ohledu na nízkou specifitu však hladiny osteopon-

tinu v MM velmi silně korelovaly s klinickou závažností RS [28,29]. Snížení jeho hladiny bylo zřejmé u pacientů úspěšně léčených natalizumabem [30]. Předpokládá se, že sledování osteopontinu by mohlo mít význam spolu s monitorováním jiných biomarkerů.

Specifický protein S 100 se ukázal v experimentu jako citlivý ukazatel poškození hematoenfalické bariéry, která je často přítomna u zvýšené zánětlivé aktivity onemocnění [31].

Růstový faktor pro hepatocyty (Hepatocyte Growth Factor; HGF), který potlačuje projev autoimunity, negativně koreloval s aktivitou RS [32]. Hladiny HGF v MM mohou reflektovat endogenní reparační pochody CNS a tím se mohou stát zástupným markerem pro sledování neuroprotektce, což by mělo význam zejména u progresivních forem RS.

Biomarkery oxidativního stresu

Mozková aktivita je spojena s vysokou spotřebou kyslíku. Vzhledem k vysokému podílu lipidů v myelinu stoupá produkce kyslíkových radikálů, která vede k oxidativnímu stresu a peroxidaci lipidů [33]. Zánět, demyelinizace a neurodegenerace zvyšují metabolický a oxidační stres, což vede k progresi RS. Nalezení indikativních markerů by mohlo kvantifikovat vliv oxidativního stresu na progresi onemocnění.

Isoprostane 8-iso-prostaglandin F2a (8-iso-PGF2a) je marker oxidativního stresu a peroxidace lipidů, který je tvořen volnými radikály kyseliny arachidonové nacházející se v membránových fosfolipidech. Zvýšené hladiny 8-iso-PGF2a byly zjištěny v moči a séru pacientů s RS [34]. Recentní studie prokázala jeho zvýšenou hladinu v MM zejména u pacientů se SP RS [35]. Tyto nálezy podporují možnost, že oxidativní stres je výsledkem zánětlivé degenerace. Další markery oxidativního stresu jsou otázkou výzkumu, výsledky recentních studií nejsou zatím použitelné v praxi.

Biomarkery B buněčné aktivity

CXCL13 (C-X-C motif ligand 13) je chemokin a silný chemoatraktant B buněk. Řada studií popsala jeho zvýšenou hladinu v MM u RS, ale i u jiných zánětlivých onemocnění CNS [36,37]. Jeho hladina koreluje se zvýšenou humorální imunitní odpovědí. Je známo, že ektopická meningeální germinativní centra jsou zdrojem autoreaktivních B lymfocytů, které hrají významnou úlohu v progresi onemocnění a rozvoji kortikální patologie [38]. Důležitým poznatkem je, že

CXCL13 je prognostický marker, který se vyskytuje ve zvýšené míře u pacientů s CIS s časnou konverzí do RR RS [39]. Hladina tohoto chemokinu úzce koreluje s počtem B lymfocytů, oligoklonálních pásovů a IgG indexem v MM [40]. Podobným prediktivním ukazatelem je průkaz oligoklonálních IgM pásovů v MM [41]. Reprodukovatelnost těchto dat ukazuje, že CXCL13 může být spolehlivým indikátorem humorální imunitní odpovědi CNS. Jeho monitoring predikuje možnou klinickou odpověď na léčbu cílenou na B buňky, např. rituximabem [42].

Biomarkery axonálního poškození

Neurofilamenta jsou cytoskeletální proteiny. Podle molekulové hmotnosti jednotlivých podjednotek se označují jako neurofilamenta s lehkou (NFL), střední (NFM) a těžkou složkou (NFH). V důsledku axonálního poranění se uvolňují do extracelulárního prostoru, takže jejich množství odráží stupeň poškození axonů [43]. U RS dochází ke zvýšení NFL i NFH zejména během akutního relapsu v důsledku axonálního poškození zprostředkovaného zánětem [44]. U pacientů s CIS korelují hladiny NFL s morfologickými projevy zánětu (gadolinium enhancující léze na MR) a predikují konverzi do klinicky definitivní RS s horší prognózou [45,46]. U progresující RS jsou hladiny NFH zvýšené trvale a významně korelují s fyzickou disabilitou a změnami v objemu mozku, nikoliv však s počtem a objemem lézí. NFH mohou indikovat probíhající neurodegeneraci [47].

Za další ukazatel axonální patologie je považován 14-3-3 protein. Z nedávno publikované studie vyplývá, že jeho vyšetření v likvoru může být užitečným markerem identifikujícím pacienty s vyšším rizikem nástupu časné disability [48].

U pacientů léčených natalizumabem došlo během 6–12 měsíců léčby k trojnásobnému poklesu NFL, což svědčí, že dochází nejen k efektu imunomodulačnímu, ale i ke snížení axonálního poškození [49]. Tyto nálezy byly pozorovány i u pacientů se SP RS léčených rituximabem nebo mitoxantronem [50]. Provedené studie ale nebyly schopny jednoznačně prokázat, že pokles axonálního poškození není sekundární. Vyšetření hladiny antineurofilamentových protilátek nijak nekoreluje s klinickými variantami RS [51,52].

Prognostické biomarkery

Chitinase 3-like 1 (CHI3L1 – YKL 40) je chitin vázající protein, který se účastní chronic-

kých zánětlivých dějů a poškození tkáně [53]. Comabella et al zjistili, že zvýšené hladiny CHI3L1 v MM predikovaly u pacientů s CIS rychlejší konverzi do klinicky definitivní RS [54]. Jiná studie dokonce prokázala, že hladina CHI3L1 úzce korelovala s diseminační lézí na MR v prostoru tak, že stanovení CHI3L1 může predikovat tíži disability po prodělané atace [55]. Z exprese CHI3L1 na reaktivních astrocytech v RS lézích lze usuzovat na jeho účast v astroglíóze [56]. Pokles zvýšené hladiny CHI3L1 v MM byl pozorován po roční léčbě natalizumabem a mitoxantronem u pacientů v klinické remisi, takže je možné jeho monitorací zjistit terapeutickou odpověď na DMD [57].

Berger et al vyšetřili u 103 pacientů s CIS hladinu protilátek proti myelinovému bazickému proteinu (MBP) a myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu (MOG) v likvoru. Zjistili, že pacienti s pozitivními protilátkami konvertovali do klinicky definitivní RS mnohem dříve než séro negativní pacienti [58]. V jiné studii byla nalezena v likvoru snížená hladina cystatinu C u RS a neuromyelitis optica v porovnání s kontrolní skupinou pacientů s nezánětlivými neurologickými afekcemi. Autoři předpokládají zapojení cystatinu C do patogeneze demyelinizačních onemocnění [59]. V práci sledující rozdíly mezi zánětlivými a degenerativními markery u RR RS a CIS bylo nalezeno snížení cystatinu C u pacientů s RR RS ve srovnání s nemocnými s CIS a kontrolní skupinou [60]. Jiní autoři roli cystatinu zpochybňují [61]. Další prognostické biomarkery byly uvedeny v předchozím textu.

Perspektivní biomarkery

Převratný výzkum v oblasti proteogenomiky a transkriptomiky umožnil v posledních letech další vývoj v oblasti hledání vhodných biomarkerů pro stanovení aktivity a progresu onemocnění a monitoring účinnosti terapie [62]. Byly prokázány rozdíly v genové expresi B buněk, CD8+ buněk a monocytů i pacientů s RS a zdravými kontrolami, nikoliv však RR RS, SP RS a PP RS [63].

Výzkum se v této oblasti směřoval zejména k objasnění genetických vlivů na účinnost IFN β . Profilováním rozsáhlých genových expresí u pacientů neodpovídajících na léčbu IFN β byla zjištěna výrazná interindividuální odpovídavost na signalizaci IFN β . Tyto studie prokázaly rozdíly v genech souvisejících s IFN β signalizací, jako např. u aktivátoru transkripce 1.92 kD (Signal Transducer and Activator of Transcription; STAT 1) stejně jako u genů souvisejících se signali-

zací Tool-like receptoru 4 (TLR4) na monocytech [64]. Recentní studie IMPROVE hodnotila účinnost podkožně aplikovaného IFN β u 180 pacientů s RR RS. Kromě klinického hodnocení a vyšetření MR bylo zkoumáno 39 biomarkerů. Triplet genů pro *CASP2/IRF4/IRF6* (Caspase 2 – CASP2, Interferon Regulatory Factor 4 – IRF4, Interferon regulatory factor 6 – IRF 6) se ukázal jako indikátor suboptimální léčebné odpovědi [65]. V poslední době byly zavedeny nové technologie spočívající v sekvenování RNA, což umožnilo zjistit snížení ribozomálního proteinu S6 u IFN β respondérů [66]. Další možnou cestou k poznání specifických biomarkerů jsou mikrovezikuly uvolňující se do tělních tekutin, které mají aktivní roli v mezibuněčné komunikaci a indukují antigen-specifickou imunitní odpověď. Myeloidní mikrovezikuly se ukázaly v experimentu jako marker terapeutického účinku fingolimodu, který redukuje jejich hladinu v MM [67].

Závěr

Rozšiřující se spektrum terapeutických možností přineslo nové otázky spojené s terapeutickým efektem u konkrétního pacienta. Cílem je dosáhnout situace, kdy dojde k potlačení aktivity, zastavení progresu onemocnění a stacionárnímu nálezu na MR (koncept NEDA; No Evidence of Disease Activity). Naše současné znalosti svědčí o tom, že může docházet k subklinické aktivitě a progresi choroby bez morfologického korelátu na MR.

Rozvoj molekulární biologie přináší možnost nalezení nových biomarkerů, které by dokázaly včas predikovat další rozvoj onemocnění a navíc odhalit včas pacienty neodpovídající na konkrétní léčbu by byl dalším krokem k individualizovanému léčebnému přístupu, což má pochopitelně i nezanedbatelné socioekonomické aspekty. Vzhledem k heterogenitě patogeneze RS se zdá, že k monitorování onemocnění bude třeba celé řady markerů. Současný trend směřuje k validizaci již definovaných biomarkerů včetně jejich využití v klinických studiích a k vývoji biomarkerů nových, nejspíše s využitím genomiky a transkriptomiky. Některé z uvedených biomarkerů mají již v současné době potenciál se uplatnit v klinické praxi, další je třeba ověřit ve větších klinických studiích.

Literatura

1. Havrdová E et al. Roztroušená skleróza. Praha: Mladá fronta 2013.
2. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2012; 8(11): 647–656. doi: 10.1038/nrneurol.2012.168.

3. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev* 2012; 248(1): 87–103. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01134.x.
4. Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 2013; 13 (Suppl 12): 3–9. doi: 10.1586/14737175.2013.865866.
5. Shirani A, Zhao Y, Karim ME, Evans C, Kingwell E, van der Kop ML et al. Association between use of interferon beta and progression of disability in patients with relapsing – remitting multiple sclerosis. *JAMA* 2012; 308(3): 247–256. doi: 10.1001/jama.2012.7625.
6. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 1996; 6(3): 259–274.
7. Harris VK, Lee JC, Simon J, Ransohoff RM, Fisher E. Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2004; 56(4): 548–555.
9. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, Clemmensen KM, Bendtzen K. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology* 2005; 65(1): 33–39.
10. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P, Solberg Sorensen P. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol* 2004; 251 (Suppl 2): II15–II24.
11. Calabresi PA, Giovannoni G, Confavreux C, Galetta SL, Havrdová E, Hutchinson M et al. The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology* 2007; 69(14): 1391–1403.
12. Oliver B, Fernandez O, Orpez T, Alvarenga MP, Pinto-Medel MJ, Guerrero M et al. Kinetics and incidence of anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis patients on treatment for 18 months. *Mult Scler* 2011; 17(3): 368–371.
13. Sorensen PS, Jensen PE, Haghikia A, Lundkvist M, Vedeler C, Sellebjerg F et al. Occurrence of antibodies against natalizumab in relapsing multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Mult Scler* 2011; 17(9): 1074–1078. doi: 10.1177/1352458511404271.
14. Vennegoor A, Rispens T, Strijbis EM, Seewann A, Uitendhaag BM, Balk LJ et al. Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013; 19(5): 593–600. doi: 10.1177/1352458512460604.
15. Mori K, Emoto M, Inaba M. Fetuin-A: a multifunctional protein. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2011; 5(2): 124–146.
16. Saunders NR, Habgood MD, Ward RA, Reynolds ML. Origin and fate of fetuin-containing neurons in the developing neocortex of the fetal sheep. *Anat Embryol (Berl)* 1992; 186(5): 477–486.
17. Harris VK, Diamanduros A, Good P, Zakin E, Chalivendra V, Sadiq SA. Bri2–23 is a potential cerebrospinal fluid biomarker in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2010; 40(1): 331–339. doi: 10.1016/j.nbd.2010.06.007.
18. Harris VK, Donelan N, Yan QJ, Clark K, Touray A, Ramal M et al. Cerebrospinal fluid fetuin-A is a biomarker of active multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013; 19(11): 1462–1472. doi: 10.1177/1352458513477923.
19. Defer G, Mariotte D, Derache N, Toutirais O, Legros H, Cauquelin B et al. CD49d expression as a promising biomarker to monitor natalizumab efficacy. *J Neurol Sci* 2012; 314(1–2): 138–142. doi: 10.1016/j.jns.2011.10.005.
20. Bartosik-Psujek H, Psujek M, Jaworski J, Stelmasiak Z. Total tau and S100b proteins in different types of multiple sclerosis and during immunosuppressive treatment with mitoxantrone. *Acta Neurol Scand* 2011; 123(4): 252–256. doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01393.x.

21. Lehmsiek V, Süsmuth SD, Tauscher G, Brettschneider J, Felk S, Gillardon F et al. Cerebrospinal fluid proteome profile in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007; 13(7): 840–849.
22. Tumani H, Lehmsiek V, Rau D, Guttmann I, Tauscher G, Mogel H et al. CSF proteome analysis in clinically isolated syndrome (CIS): candidate markers for conversion to definite multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2009; 452(2): 214–217. doi: 10.1016/j.neulet.2009.01.057.
23. Tumani H, Lehmsiek V, Rau D, Guttmann I, Tauscher G, Mogel H et al. CSF proteome analysis in clinically isolated syndrome (CIS): candidate markers for conversion to definite multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2009; 452(2): 214–217. doi: 10.1016/j.neulet.2009.01.057.
24. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001; 294(5547): 1731–1735.
25. Shimizu Y, Ota K, Ikeguchi R, Kubo S, Kabasawa C, Uchiyama S. Plasma osteopontin levels are associated with disease activity in the patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol* 2013; 263(1–2): 148–151. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.07.005.
26. Kivisäkk P, Healy BC, Francois K, Gandhi R, Gholipour T, Egorova S et al. Evaluation of circulating osteopontin levels in an unselected cohort of patients with multiple sclerosis: relevance for biomarker development. *Mult Scler* 2014; 20(4): 438–444. doi: 10.1177/1352458513503052.
27. Runia TF, Meurs MV, Nasserinejad K, Hintzen RQ. No evidence for an association of osteopontin plasma levels with disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014; 20(12): 1670–1671. doi: 10.1177/1352458514528765.
28. Chowdhury SA, Lin J, Sadiq SA. Specificity and correlation with disease activity of cerebrospinal fluid osteopontin levels in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008; 65(2): 232–235. doi: 10.1001/archneurol.2007.33.
29. Szalardy L, Zadori D, Simu M, Bencsik K, Vecsei L, Klivenyi P. Evaluating biomarkers of neuronal degeneration and neuroinflammation in CSF of patients with multiple sclerosis-osteopontin as a potential marker of clinical severity. *J Neurol Sci* 2013; 331(1–2): 38–42. doi: 10.1016/j.jns.2013.04.024.
30. Khademi M, Bornsen L, Rafatnia F, Andersson M, Brundin L, Piehl F et al. The effects of natalizumab on inflammatory mediators in multiple sclerosis: prospects for treatment-sensitive biomarkers. *Eur J Neurol* 2009; 16(4): 528–536. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02532.x.
31. Kapural M, Krizanac-Bengez Lj, Barnett G, Perl J, Masaryk T, Apollo D. Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res* 2002; 940(1–2): 102–104.
32. Muller AM, Jun E, Conlon H, Sadiq SA. Cerebrospinal hepatocyte growth factor levels correlate negatively with disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2012; 251(1–2): 80–86. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.06.008.
33. Wang P, Xie K, Wang C, Bi J. Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2014; 72(3–4): 249–254. doi: 10.1159/000363515.
34. Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M. The level of isoprostanes as a non-invasive marker for in vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurochem Res* 2011; 36(6):1012–1016. doi: 10.1007/s11064-011-0442-1.
35. Mir F, Lee D, Ray H, Sadiq SA. CSF isoprostane levels are a biomarker of oxidative stress in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2014; 1(2): e21. doi: 10.1212/NXI.0000000000000021.
36. Sellebjerg F, Bornsen L, Khademi M, Krakauer M, Olsson T, Frederiksen JL et al. Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. *Neurology* 2009; 73(23): 2003–2010. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c5b457.
37. Alvarez E, Piccio L, Mikesell RJ, Klawiter EC, Parks BJ, Naismith RT et al. CXCL13 is a biomarker of inflammation in multiple sclerosis, neuromyelitis optica and other neurological conditions. *Mult Scler* 2013; 19(9): 1204–1208. doi: 10.1177/1352458512473362.
38. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007; 130(4): 1089–1104.
39. Brettschneider J, Czerwoniak A, Senel M, Fang L, Kassubek J, Pinkhardt E et al. The chemokine CXCL13 is a prognostic marker in clinically isolated syndrome (CIS). *PLoS One* 2010; 5(8): e11986. doi: 10.1371/journal.pone.0011986.
40. Axelsson M, Mattsson N, Malmstrom C, Zetterberg H, Lycke J. The influence of disease duration, clinical course, and immunosuppressive therapy on the synthesis of intrathecal oligoclonal IgG bands in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013; 264(1–2): 100–105. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.09.003.
41. Ferraro D, Simone AM, Bedin R, Galli V, Vitetta F, Federzoni L et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM bands predict early conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome. *J Neuroimmunol* 2013; 257(1–2): 76–81. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.01.011.
42. Naismith RT, Piccio L, Lyons JA, Lauber J, Tutlam NT, Parks BJ et al. Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: a 52-week phase II trial. *Neurology* 2010; 74(23): 1860–1867. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e24373.
43. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 2005; 233(1–2): 183–198.
44. Kuhle J, Leppert D, Petzold A, Regeniter A, Schindler C, Mehling M et al. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology* 2011; 76(14): 1206–1213. doi: 10.1212/WNL.0b013e31821432ff.
45. Salzer J, Svenningsson A, Sundström P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16(3): 287–292. doi: 10.1177/1352458509359725.
46. Khalil M, Enzinger C, Langkammer C, Ropele S, Mader A, Trentini A et al. CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. *Mult Scler* 2013; 19(4): 436–442. doi: 10.1177/1352458512458010.
47. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012; 18(5): 552–556. doi: 10.1177/1352458512443092.
48. Colucci M, Roccatagliata L, Capello E, Narciso E, Latronico N, Tabaton M et al. The 14-3-3 protein in multiple sclerosis: a marker of disease severity. *Mult Scler* 2004; 10(5): 477–481.
49. Gunnarsson M, Malmstrom C, Axelsson M, Sundstrom P, Dahle C, Vrethem M et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol* 2011; 69(1): 83–89. doi: 10.1002/ana.22247.
50. Axelsson M, Malmstrom C, Gunnarsson M, Zetterberg H, Sundstrom P, Lycke J et al. Immunosuppressive therapy reduces axonal damage in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014; 20(1): 43–50. doi: 10.1177/1352458513490544.
51. Bartos A, Fialova L, Soukupova J, Kukal J, Malbohan J, Pitha J. Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2007; 116(2): 100–107.
52. Bartos A, Fialova L, Soukupova J, Kukal J, Malbohan J, Pitha J. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J Neurol* 2007; 254(1): 20–25.
53. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling and injury. *Ann Rev Physiol* 2011; 73: 479–501. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142250.
54. Comabella M, Fernandez M, Martin R, Rivera-Vallve S, Borrás E, Chiva C et al. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 2010; 133(4): 1082–1093. doi: 10.1093/brain/awq035.
55. Modvig S, Degn M, Horwitz H, Cramer SP, Larsson HB, Wanscher B et al. Relationship between cerebrospinal fluid biomarkers for inflammation, demyelination and neurodegeneration in acute optic neuritis. *PLoS One* 2013; 8(10): e77163. doi: 10.1371/journal.pone.0077163.
56. Thouvenot E, Hisinger G, Galeotti N, Nabholz N, Urbach S, Rigau V et al. Chitinase 3-like 1 and chitinase 3-like 2 as diagnostic and prognostic biomarkers of multiple sclerosis. Philadelphia: American Academy of Neurology Annual Meeting 2014.
57. Malmström C, Axelsson M, Lycke J, Zetterberg H, Blennow K, Olsson B. CSF levels of YKL-40 are increased in MS and replaces with immunosuppressive treatment. *J Neuroimmunol* 2014; 269(1–2): 87–89. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.02.004.
58. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003; 349(2): 139–145.
59. Nakashima I, Fujinoki M, Fujihara K, Kawamura T, Nishimura T, Nakamura M et al. Alteration of cystatin C in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007; 62(2): 197–200.
60. Sladkova V, Mareš J, Lubenova B, Zapletalova J, Stejskal D, Hlustik P et al. Degenerative and inflammatory markers in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome. *Neurol Res* 2011; 33(4): 415–420. doi: 10.1179/016164110X12816242542535.
61. Hansson SF, Simonsen AH, Zetterberg H, Andersen O, Haghighi S, Fagerberg I et al. Cystatin C in cerebrospinal fluid and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007; 62(2): 193–196.
62. Gurevich M, Tuller T, Rubinstein U, Or-Bach R, Achiron A. Prediction of acute multiple sclerosis relapses by transcription levels of peripheral blood cells. *BMC Med Genomics* 2009; 2: 46. doi: 10.1186/1755-8794-2-46.
63. Ratzler R, Sondergaard H, Christensen JR, Bornsen L, Borup R, Sorensen P et al. Gene expression analysis of relapsing – remitting, primary progressive and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013; 19(14): 1841–1848. doi: 10.1177/1352458513500553.
64. Bustamante MF, Fissolo N, Rio J, Espejo C, Costa C, Mansilla MJ et al. Implication of the Toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011; 70(4): 634–645. doi: 10.1002/ana.22511.
65. Baranzini SE, Madireddy LR, Cromer A, D'Antonio M, Lehr L, Beelke M et al. Prognostic biomarkers of IFNβ therapy in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2014 Nov 12. pii: 1352458514555786.
66. Parnell GP, Gatt PN, McKay FC, Schibeci S, Krupa M, Powell JE et al. Ribosomal protein S6 mRNA is a biomarker upregulated in multiple sclerosis, downregulated by interferon treatment, and affected by season. *Mult Scler* 2014; 20(6): 675–685. doi: 10.1177/1352458513507819.
67. Verderio C, Muzio L, Turola E, Bergami A, Novellino L, Ruffini F et al. Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Ann Neurol* 2012; 72(4): 610–624. doi: 10.1002/ana.23627.