

Uroš Rot¹, Andreja Emeršič²

Biološki označevalci v likvorju pri multipli sklerozi – korak k bolniku prilagojeni medicini?

Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Multiple Sclerosis – A Step Towards Personalized Medicine?

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: multipla skleroza, likvor, biološki označevalci, proste lahke verige kapa, lahke verige nevofilamentov

Številne terapevtske možnosti za multiplo sklerozo omogočajo, da zdravljenje prilagajamo posamezniku glede na potek in aktivnost njegove bolezni, ocenjeno tveganje za neželene učinke, pridružene bolezni, življenjski slog in želje posameznika. Kljub temu je zaradi heterogenosti bolezni in pomanjkanja specifičnih farmakogenomskih označevalcev odziv na zdravljenje težko napovedati. Zato je še posebej pomembno individualno spremljanje uspešnosti terapije in obvladovanje ter preprečevanje hudih neželenih učinkov. Pri pravočasnem odkrivanju nezadostnega terapevtskega odziva so nam lahko v veliko pomoč različni biološki označevalci. Z analizo likvorja dobimo informacijo o vnetni aktivnosti bolezni, kar predstavlja dodano vrednost pri postavitvi diagnoze. Poleg oligoklonalnih trakov v diagnostični obravnavi vse pogostejše uporabljamo tudi proste lahke verige kapa v likvorju. Številni biološki označevalci v likvorju izkazujejo prognostični potencial, najbolj obetavne med njimi so gotovo lahke verige nevofilamentov. Ker jih je z razvojem visoko občutljivih tehnologij mogoče določati tudi v serumu, bi v bližnji prihodnosti lahko postali pomembni pri spremljanju poteka multiple skleroze in zgodnjem prepoznavanju učinkovitosti terapije.

ABSTRACT

KEY WORDS: multiple sclerosis, cerebrospinal fluid, biomarkers, kappa free light chains, neurofilament light chain

Numerous treatment options for multiple sclerosis allow for a personalized approach to treatment that accounts for individual differences in disease course and activity, the likelihood of adverse events, comorbidities, individual's preferences, and lifestyle. Due to the heterogeneous nature of the disease and lack of specific pharmacogenomic biomarkers, reliable prediction of response to treatment remains challenging. Currently, therapy for an individual patient is optimized by careful risk stratification, and frequent safety and

¹ Prof. dr. Uroš Rot, dr. med., Klinični oddelek za bolezni živčevja, Nevrološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2a, 1000 Ljubljana; Katedra za nevrologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; uros.rot@kclj.si

² Andreja Emeršič, mag. farm., Klinični oddelek za bolezni živčevja, Nevrološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2a, 1000 Ljubljana

drug efficacy monitoring. Different radiological and fluid biomarkers can be used in the assessment of early therapeutic effects and may serve as indicators of suboptimal response to therapy. Cerebrospinal fluid analysis reveals central nervous system inflammation and thus provides an added value in the diagnosis of multiple sclerosis. In addition to oligoclonal bands, immunoglobulin kappa free light chain index has been acknowledged as a sensitive diagnostic biomarker. Prognostic value of many cerebrospinal fluid biomarkers has been studied in multiple sclerosis, of which neurofilament light protein appears the most promising. With the emergence of highly sensitive technologies, the quantification of serum neurofilament light protein has become available and could be used to monitor the disease course and early treatment response in near future.

UVOD

Multipla skleroza (MS) danes lahko zdravimo z več kot 15 različnimi učinkovinami, ki vplivajo na potek bolezni in so različno učinkovite, varne in prenosljive. Dostopnost številnih zdravil omogoča prilagajanje zdravljenja posamezniku, a velika izbira predstavlja tudi izziv pri izboru primerne terapije za posameznega bolnika (1, 2).

Pri izboru zdravila so nam v precejšnji pomoč že splošna načela za zdravljenje MS. Eno od takih je priporočilo za zgodnje zdravljenje, saj so vsa zdravila, ki vplivajo na potek bolezni, protivnetna, vnetje pa je najbolj izrazito ravno v zgodnjem poteku MS. Drugo, sodobnejše priporočilo je zgodnje zdravljenje z učinkovitimi zdravili, ki po zadnjih raziskavah izkazujejo dolgoročno prednost v primerjavi z zmerno učinkovitostjo in varnejšo terapijo (1).

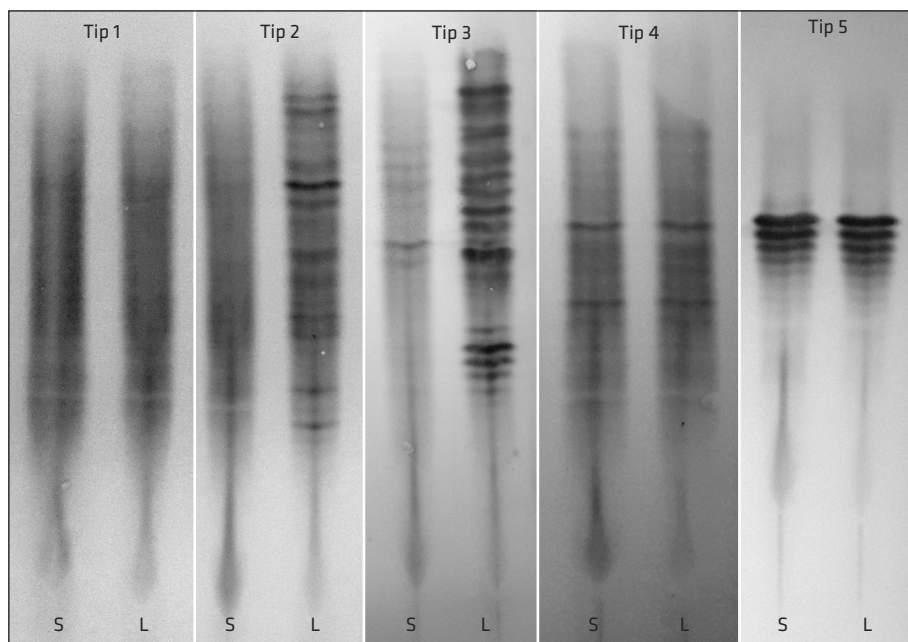
Pri individualizirani obravnavi bolnikov z MS so nam v veliko pomoč biološki označevalci, tako klinični, radiološki kot tudi laboratorijski. Analiza likvorja je pomembna, saj potrdi prisotnost vnetja pri MS. Diagnostični označevalci omogočajo zgodnejšo, pravilno postavitev diagnoze MS, kar je ključno z vidika zgodnjega zdravljenja (1, 2). Nekateri laboratorijski označevalci nam lahko pomagajo pri napovedi poteka bolezni, prisotnost označevalcev slabše prognoze pa pomembno usmerja začetno izbiro zdravljenja. Z razvojem visoko občutljivih metod lahko nekatere izmed uvelja-

vljenih bioloških označevalcev v likvorju določamo tudi v krvi, kjer se nahajajo v nekaj desetkrat nižjih koncentracijah, zaradi česar si kmalu ometamo nove biološke označevalce za spremljanje učinkovitosti zdravljenja (2).

DIAGNOSTIČNI BIOLOŠKI OZNAČEVALCI

Visoka diagnostična občutljivost oligoklonalnih trakov (OT) pri MS je znana že skoraj 70 let. OT so precipitanti imunoglobulinov G (IgG), ki nastajajo pri izoelektričnem fokusiranju beljakovin in kasnejši imunodetekciji na membrani. V evropskem prostoru velja soglasje pri podajanju rezultatov določanja OT, ki naj bi jih razvrstili v enega od petih različnih vzorcev (3). OT v likvorju, ne pa tudi v serumu (tip 2 ali tip 3, slika 1), odražajo intratekalno sintezo IgG in so prisotni pri več kot 90 % bolnikov z MS na naši kliniki. Ob prvem zagonu bolezni – klinično izoliranem sindromu (angl. *clinically isolated syndrome*, CIS) – ima OT v likvorju 70–80 % bolnikov (4). Prisotnost OT v likvorju ni specifična za MS, zato rezultate vedno interpretiramo v kontekstu klinične slike.

Poleg sestavljenih imunoglobulinov izločajo limfociti B tudi proste lahke verige kapa (angl. *kappa free light chains*, KFLC) in lambda (angl. *lambda free light chains*, LFLC), ki nastajajo v do 40-% presežku glede na težke verige. Z določanjem KFLC v likvorju lahko ob upoštevanju serumskih koncentracij in količnika albumina (funk-



Slika 1. Različni vzorci (tipi) oligoklonalnih trakov pri vzporedni analizi seruma in likvorja. Do intratekalne sinteze imunoglobulinov G (IgG) prihaja pri tipu 2 in 3 (trakovi v likvorju, ki jih ni opaziti v serumu). S – serum, L – likvor.

cija krvno-likvorske pregrade) izračunamo indeks KFLC, ki odraža lokalno – intratekalno sintezo KFLC. Številne raziskave v zadnjih letih so pokazale, da indeks KFLC dosega vsaj enako ali višjo diagnostično občutljivost kot OT. Zvišane vrednosti KFLC ugotavljamo pri 95 % naših bolnikov z MS (5, 6). Obenem je določanje indeksa KFLC bistveno lažje, hitrejše, cenejše, rezultati pa niso podvrženi subjektivni interpretaciji, zato se vse pogosteje uporablja v klinični praksi (7). Pri naših bolnikih s CIS in negativnimi OT opazimo zvišan indeks KFLC v približno 4 % primerov, kar bi lahko odražalo zgodnjo vnetno aktivnost in pojasnilo višjo diagnostično občutljivost testa v primerjavi z določanjem OT in intratekalno sintezo po Reiberju.

PROGNOSTIČNI BIOLOŠKI OZNAČEVALCI

Ob številnih terapevtskih možnostih za MS so informacije o predvidenem poteku

bolezni izjemno pomembne. Že zgoraj omenjena diagnostična testa (OT in indeks KFLC) imata prognostičen pomen. Pri bolnikih s CIS, ki še ne izpolnijo meril za MS, prisotnost OT ali zvišan indeks KFLC namreč napovesta nove zagone bolezni in visoko tveganje za zanesljivo MS. Z manj ugodnim prognostičnim potekom je povezana tudi intratekalna sinteza imunoglobulinov M (IgM), a jo v praksi pri naših bolnikih redko vidimo. Vlogo limfocitov B v patogenezi MS dodatno nakazujejo raziskave, v katerih so ugotovili povezavo med aktivatorjem limfocitov B, kemokinom CXCL13 (angl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 13*) in neugodnim potekom bolezni (8).

Med prognostičnimi biološkimi označevalci je največ podatkov o bioloških označevalcih propada aksonov (beljakovine nevrofilamentov), razraščanja in aktivacije mikroglije (hitinazi podobna beljakovina YKL-40, znana tudi kot CH3L1 (angl. *chitinase 3-like 1*)) in označevalcih astroglioze, npr.

glialna fibrilarna kislina beljakovina (angl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP).

Nevrofilamenti so gradniki celičnega skeleta aksonov. Sestavljeni so iz beljakovin različnih velikosti – lahke verige nevrofilamentov (angl. *neurofilament light chain*, NfL) (~ 70 kDa), srednje verige nevrofilamentov (angl. *neurofilament medium chain* NfM) (~ 150 kDa) in težke verige nevrofilamentov (angl. *neurofilament heavy chain* NfH) (~ 200 kDa). Njihovo fiziološko obnavljanje je počasno, šele propad aksonov v okviru nevrodegenerativne bolezni, travme, vnetja ali kapi vodi v sproščanje večjih količin nevrofilamentov v zunajcelično tekočino, likvor, lahko tudi v kri, odvisno od obsega poškodbe (9). Najbolj preučevani pri MS so NfL. Zvišane koncentracije NfL v likvorju napovedujejo nove zagone bolezni in pojav novih lezij na MR ter so povezane s hitrostjo in stopnjo okrevanja po zagonu. Raziskave so pokazale, da so NfL v likvorju povezani z akutno aksonsko okvaro (vrednosti so praviloma višje do 3 mesece po zagonu) in so manj primerni za napovedovanje dolgoročne prizadetosti pri MS (9). Zvišane vrednosti NfL v likvorju niso specifične za posamezno bolezen (le za proces propadanja aksonov), zato jih vedno interpretiramo v kliničnem kontekstu. Bistveno višje koncentracije kot pri MS na primer opazimo pri hitro napredujočih degenerativnih boleznih, kot sta amiotrofična lateralna skleroza ali frontotemporalna demenca (9). Pri zdravih preiskovancih so koncentracije NfL v likvorju močno odvisne od starosti preiskovanca, zato v Laboratoriju za likvorsko diagnostiko vrednosti običajno podajamo tudi kot mnogokratnik pričakovanih koncentracij glede na starostno kategorijo.

Procesi astroglije in aktivacije mikroglije so po drugi strani bolj povezani z napredovanjem prizadetosti zaradi MS. YKL-40 je glikoprotein, ki nastaja v astrocitih in celicah mikroglije. V kliničnih raziskavah je pri bolnikih z recidivno-remitentno obliko

multiple skleroze (RRMS) in pri bolnikih s primarno progresivno obliko multiple skleroze (PPMS) YKL-40 bolje sovpadal s stopnjo prizadetosti pri MS kot NfL. GFAP je označevalec brazgotinjenja pri MS, kar je pomemben patološki substrat progresije pri bolezni. Pri zgodnji MS je GFAP v likvorju povezan z napredovanjem prizadetosti zaradi bolezni. V eni izmed raziskav je serumski GFAP bolje predvidel stopnjo prizadetosti pri MS kot GFAP v likvorju, kar lahko pojasnimo z neposrednim prehajanjem GFAP v kri in slabšo stabilnostjo GFAP v likvorju (10). Vlogo serumskega GFAP pri PPMS skušamo trenutno ovrednotiti v raziskovalnem projektu Evropskega konzorcija za biološke označevalce pri MS (projekt BioMS *eu*). Serumski GFAP sicer izkazuje klinično uporabnost tudi pri napovedovanju aktivnosti bolezni v spektru optičnega nevromielitisa (11).

Eden od pomembnih vidikov MS je izboljšanje simptomov (remisija) z zmanjšanjem vnetja in remielinizacijo, zato bi bili izjemno pomembni biološki označevalci regeneracije bolezni. Rastni dejavnik GAP43 (angl. *growth associated protein 43*) označuje integriteto sinaps in regeneracijo tkiva. V raziskavah so ugotovili, da je znižanje GAP43 v likvorju značilno za napredujočo MS, ni pa ga mogoče opaziti pri zgodnji RRMS (12).

BIOLOŠKI OZNAČEVALCI ZA SPREMLJANJE POTEKA IN AKTIVNOSTI BOLEZNI

Ob številnih terapevtskih možnostih je stalno spremljanje bolnika z MS nujno. Trenutno si pri vrednotenju stanja najbolj pomagamo s kliničnimi (zagoni, napredovanje prizadetosti) in radiološkimi označevalci aktivnosti bolezni (nove ali obarvane lezije na MR glave). Sodobne, visoko občutljive metode (Simoa® in kemiluminiscenca) že omogočajo določanje nizkih koncentracij beljakovin iz osrednjega živčevja v serumu ali plazmi. Glavna prednost določanja bio-

loških označevalcev v periferni krvi je neposreden odraz aktivnosti bolezni v času. Največ podatkov imamo o serumskem NfL, nekaj pa tudi o serumskem GFAP. Koncentracije NfL v serumu zelo dobro korelirajo z NfL v likvorju in so zato povezane z zagoni in aktivnostjo bolezni na MR glave. Ob uvedbi imunskega zdravljenja se koncentracije NfL v serumu znižajo, nivo znižanja pa je povezan z učinkovitostjo zdravila (9). Velika raziskava na več kot 10.000 vzorcih pri več kot 5.000 bolnikih z MS je pokazala, da so serumski NfL precej zanesljivo napovedali klinično in radiološko aktivnost bolezni. Bolniki z višjimi koncentracijami NfL v serumu so imeli večje tveganje za aktivnost bolezni, četudi so bili opredeljeni kot klinično stabilni. Serumske koncentracije NfL pri bolnikih, ki so prejeli monoklonska protitelesa (alemtuzumab, okrelizumab, rituksimab ali natalizumab), so bile primerljive z vrednostmi pri kontrolnih preiskovancih, pri tistih na osnovnem zdravljenju (interferon β ali glatiramer acetat) pa so ostale zvišane (13). Rezultati omenjene raziskave so pokazali, da bi NfL v serumu lahko uporabili za ugotavljanje subklinične aktivnosti pri posameznikih z MS. Serumski NfL bi lahko služili tudi kot

primerjalni kazalec učinkovitosti različnih zdravil v kliničnih raziskavah. Praktična težava pri uporabi NfL v serumu ostaja ne povsem pojasnjen vpliv morebitnih pridruženih, pogostih nevroloških bolezni (poškodbe glave, zgodnja Alzheimerjeva bolezen) in vpliv nekaterih sistemskih bolezni, kot sta sladkorna bolezen in ledvična odpoved, za kateri je znano, da sta povezani z višjimi serumskimi koncentracijami NfL.

ZAKLJUČEK

Z naraščanjem terapevtskih možnosti postaja vse pomembnejše spremljanje uspešnosti terapije in prilagajanje zdravljenja posamezniku. Laboratorijske preiskave likvorja so nam v veliko pomoč pri postavitvi diagnoze in delno tudi pri napovedovanju prognoze MS. Prednost likvorskih bioloških označevalcev je, da odražajo bolezenski proces v času, ko je bila preiskava opravljena. S prihajajočimi biološkimi označevalci v serumu bi lahko še bolje spremljali potek bolezni in zgodaj prepoznali nezadostno učinkovitost zdravil. Z nadaljnjo standardizacijo merilnih postopkov in ustrezno klinično validacijo bomo lahko najobetavnejše med njimi verjetno kmalu uporabljali tudi v klinični praksi.

LITERATURA

1. Rot U, Brecl-Jakob G, Šega-Jazbec S, et al. Disease-modifying therapy for multiple sclerosis in Slovenia: Analysis of 20 years of treatment. *RAD CASA – Medical Sciences*. 2022; 552 (58–59): 28–34.
2. Rotstein D, Montalban X. Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2019; 15 (5): 287–300.
3. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol*. 2006; 13 (9): 913–22.
4. Rot U, Mesec A. Clinical, MRI, CSF and electrophysiological findings in different stages of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2006; 108 (3): 271–4.
5. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebi F, et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: A multicenter study. *Mult Scler*. 2016; 22 (4): 502–10.
6. Emeršič A, Anadolli V, Krsnik M, et al. Intrathecal immunoglobulin synthesis: The potential value of an adjunct test. *Clin Chim Acta*. 2019; 489: 109–16.
7. Leurs CE, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte BI, et al. Kappa free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: A large multicenter study. *Mult Scler*. 2020; 26 (8): 912–23.
8. DiSano K, Gilli F, Pachner A. Intrathecally produced CXCL13: A predictive biomarker in multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin* 2020; 6 (4): 2055217320981396.
9. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018; 14 (10): 577–89.
10. Abdelhak A, Hottenrott T, Morenas-Rodriguez E, et al. Glial activation markers in CSF and serum from patients with primary progressive multiple sclerosis: Potential of serum GFAP as disease severity marker? *Front Neurol*. 2019; 10: 280.
11. Aktas O, Smith MA, Rees WA, et al. Serum glial fibrillary acidic protein: A neuromyelitis optica spectrum disorder biomarker. *Ann Neurol*. 2021; 89 (5): 895–910.
12. Rot U, Sandelius A, Emeršič A, et al. Cerebrospinal fluid GAP-43 in early multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2018; 4 (3): 2055217318792931.
13. Benkert P, Meier S, Schaedel S, et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: A retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol*. 2022; 21 (3): 246–57.