

# Biomarkeri u multiploj sklerozi

---

Grošić, Leonarda

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:106817>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Leonarda Grošić**

# **Biomarkeri u multiploj sklerozi**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Suvremene biokemijske tehnike Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Sandri Šuprahi Goreti na stručnom vodstvu tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Veliko hvala na podarenom trudu i vremenu, pristupačnosti, poticanju moje znatiželje i interesa te divnoj suradnji.*

*Najveće zahvale bih uputila svojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i podršci. Hvala mami Dubravki na svemu, jer sam zbog nje danas ovdje gdje jesam. Hvala tati Darku i sestri Graciji što su uvijek vjerovali u mene i moju upornost, nikad posumnjali u moje sposobnosti. Hvala bakama i djedovima na podršci tijekom cijelog mog školovanja.*

*Hvala Karlu. Za sve.*

*Mojim biokemičarkama, Mariji, Luciji i Nives veliko hvala, jer je uz njih bilo lakše studirati. Zajedničko studiranje otvorilo nam je vrata prijateljstva te ću se rado prisjećati svojih studentskih dana. Od srca hvala i mojim divnim kolegicama, prijateljicama Roberti i Heleni koje su bile uz mene tijekom mojih studentskih dana i uljepšale ih. Kolegici Ivani, za sve nesebično dane savjete i materijale od samog upisa fakulteta do zadnje godine, najveće hvala! Zahvaljujem se i prijateljicama, a posebno Valeriji, Petri i Dori. Pružile su mi puno podrške, riječi utjehe, uljepšale odlaske u Zagreb. Sreća je imati ljude kao što ste svi vi!*

*Ovaj diplomski rad posvećujem onome, koji danas više nije tu, a bio bi najponosniji.*

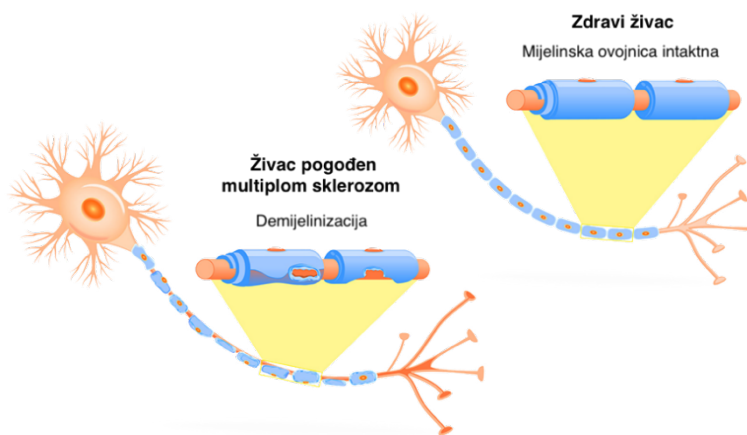
# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>4</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>5</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>6</b>
<b>4.1. Dijagnostika multiple skleroze .....</b>	<b>6</b>
4.1.1. Neuroradiološki nalazi .....	6
4.1.2. Analiza likvora .....	8
4.1.2.1. Oligoklonalne vrpce .....	9
4.1.2.2. IgG indeks.....	11
4.1.2.3. Reibergram .....	11
4.1.2.4. MRZ reakcija .....	13
4.1.3. Analiza krvnih pretraga.....	14
<b>4.2. Biomarkeri u multiploj sklerozi.....</b>	<b>14</b>
4.2.1. Prediktivni biomarkeri multiple skleroze.....	15
4.2.2. Dijagnostički biomarkeri multiple skleroze .....	16
4.2.3. Prognostički biomarkeri multiple skleroze .....	18
4.2.4. Biomarkeri terapijskog odgovora .....	20
4.2.5. Metode detekcije biomarkera .....	22
<b>4.3. Potencijalno nove dijagnostičke mogućnosti za dijagnostiku multiple skleroze ...</b>	<b>24</b>
4.3.1. Slobodna cirkulirajuća DNA .....	24
4.3.1.1. cfDNA kao biomarker multiple skleroze .....	25
4.3.1.2. Obrazac metilacije cfDNA kao biomarker dijagnoze i kliničkog stanja u relapsno-remitentnoj multiploj sklerozi.....	26
4.3.1.3. cfDNA kao biomarker gubitka oligodendrocita .....	27
4.3.2. MikroRNA.....	29
4.3.2.1. miRNA kao biomarker multiple skleroze.....	30
4.3.3. Sekvenciranje nove generacije .....	31
4.3.3.1. NGS kao nova metoda u dijagnostici i istraživanju multiple skleroze .....	33
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>37</b>

<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>38</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY.....</b>	<b>43</b>
<b>8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card.....</b>	<b>45</b>

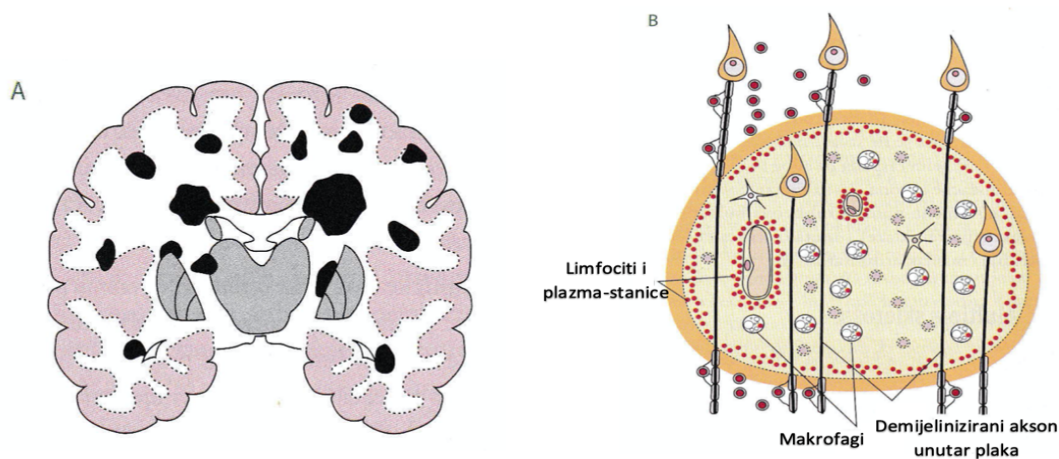
## 1. UVOD

Multipla skleroza (engl. *multiple sclerosis, MS*) je kronična upalna demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS). Uzrok MS je nepoznat, no smatra se da je MS multikomponentna bolest do koje dolazi prisutnošću genske predispozicije i autoimunskim odgovorom koji je potaknut infekcijom. Autoimunskim procesom dolazi do migracije perifernih T i B-stanica u SŽS, gdje reagiraju s mijelinskim ili neuronskim antigenima te stvaraju upalni proces koji rezultira demijelinizacijom, gubitkom aksona te odumiranjem neurona (Slika 1.). Dolazi do disfunkcije imunskog sustava te on napada vlastito tkivo, mijelinsku ovojnicu. Disfunkciju uzrokuje više čimbenika, genetički i okolišni. Genetički čimbenici koji se povezuju s 20 % pojavnosti MS su HLA geni, dok su za 5 % pojavnosti MS odgovorni ostali lokusi (non HLA). Okolišni čimbenici poput infekcija Epstein-Barr virusom, smanjena izloženost UV zračenju, manjak vitamina D, pretilost i pušenje također pokazuju povezanost s povećanim rizikom za razvoj MS. Bolest se u prosjeku javlja dva do tri puta češće kod žena nego kod muškaraca, a dijagnosticira se između dvadesete i pedesete godine života. (Bašić Kes i sur., 2021)



Slika 1. Demijelinizacija aksona u multiploj sklerozii; preuzeto i prilagođeno iz: [www.gncdubai.com](http://www.gncdubai.com)

Bolest karakteriziraju demijelinizacijska oštećenja, plakovi koji se mogu naći bilo gdje u bijeloj, ali i sivoj tvari SŽS-a (Slika 2.). Upala, demijelinizacija, astrogliozna, oštećenje oligodendrocita, neurodegeneracija, gubitak aksona i remijelinizacija dovode do formiranja plaka. (Bašić Kes i sur., 2021)



Slika 2. Patologija multiple skleroze. A - makroskopski se vide plakovi kao oštro ograničena područja koja su drugačije boje od okolne normalne moždane tvari. B - u plakovima se mikroskopski vidi demijelinizacija aksona uz infiltraciju limfocita, pokoja plazma-stanica i makrofag koji fagocitira oštećeni mijelin; preuzeto i prilagođeno iz:

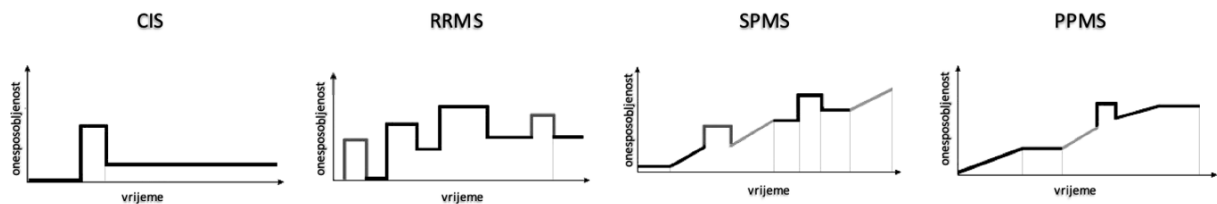
Damjanov i sur., 2018.

Početak bolesti može biti iznenadan ili postupan, a simptomi variraju pa tako mogu biti vrlo izraženi, a s druge strane i klinički neprepoznatljivi. MS je vrlo teška dijagnoza koja vrlo često uzrokuje invalidnost, nesposobnost za rad pa čak i ovisnost o tuđoj pomoći. Simptomi koji se javljaju kao početni znak MS najčešće su utrnulost udova, umor, poremećaji ravnoteže i hoda, dvoslike, gubitak vida na jednom oku, vrtoglavica, motorička slabost nogu. Tijekom progresije bolesti mogu se javiti kognitivni poremećaji, problemi s mokrenjem, smetnja hoda, seksualna disfunkcija, smetnje osjeta, Lhermitteov znak (osjećaj udara električne struje koji se širi kroz leđa prema nogama), pareza ličnog živca. (Bašić Kes i sur., 2015; Calabresi, 2004)

Nacionalno društvo za multiplu sklerozu (engl. *National Multiple Sclerosis Society*) donosi klasifikaciju multiple skleroze, koja se kroz godine mijenjala u skladu s najnovijim saznanjima. Prema klasifikaciji iz 2013., klinički oblici MS podijeljeni su na:

- klinički izolirani sindrom (engl. *clinically isolated syndrome, CIS*)
  - relapsno-remitentni oblik multiple skleroze (engl. *relapsing-remitting MS, RRMS*)
  - sekundarno-progresivni oblik multiple skleroze (engl. *secondary progressive MS, SPMS*)
  - primarno-progresivni oblik multiple skleroze (engl. *primary progressive MS, PPMS*)
- ([www.nationalmssociety.org](http://www.nationalmssociety.org))

Podjela kliničkih oblika zasnivala se na dominaciji upalne faze u RRMS, odnosno dominaciji neurodegenerativne faze u progresivnoj MS (Slika 3.). Relaps, napadaj ili egzacerbacija MS je pojava novog simptoma ili pogoršanje postojećeg, a remisija je definirana kao djelomično ili potpuno poboljšanje simptoma te tijekom nje nema progresije neuroloških simptoma, dok progresija označava progresivno pogoršanje neurološkog ispada tijekom vremena. (Bašić Kes i sur., 2021)



Slika 3. Klinički oblici multiple skleroze s obzirom na tijek bolesti. CIS: prva epizoda neuroloških simptoma koja traje najmanje 24 sata, a karakteristična je za MS, no još ne zadovoljava kriterije za dijagnozu MS, ali postoji rizik od nastanka MS. RRMS: najmanje jedno kliničko pogoršanje bolesti koje je rezultat demijelinizacije, nakon čega slijedi potpun ili djelomičan oporavak. SPMS: neurološki deficiti se kontinuirano i postupno pogoršavaju nakon razdoblja RRMS-a. PPMS: od početka bolesti dolazi do kontinuiranog pogoršanja bez razdoblja prolaznog poboljšanja.; preuzeto i prilagođeno iz: [www.my-ms.org](http://www.my-ms.org)

Rano liječenje u MS je od velike važnosti, jer dovodi do boljeg dugoročnog ishoda bolesti. Standard za liječenje relapsa MS je pulsna kortikosteroidna terapija, no ona nije učinkovita u sprječavanju relapsa niti je indicirana kao dugoročna terapija u liječenju. S obzirom da je dostupan veliki broj lijekova za MS, postoji problem kako se odlučiti za optimalno liječenje pacijenta. Postoji indukcijska strategija u liječenju MS gdje se za početak liječenja daje lijek visoke učinkovitosti, čak i u fazi CIS-a. Njoj suprotna strategija je eskalacijska gdje se u početnoj fazi bolesti pacijentu daje lijek umjerene učinkovitosti, ali dobrog sigurnosnog profila, a tek kada oni nemaju učinak, poseže se za lijekovima jače učinkovitosti, ali slabijeg sigurnosnog profila. Veliki problem u liječenju MS je praćenje bolesnika na terapiji. Unatoč liječenju MS lijekovima koji mijenjaju tijek bolesti (engl. *disease modifying drugs, DMDs*) koji mogu smanjiti godišnju stopu recidiva za 29 % do 68 %, simptomatsko liječenje simptoma MS može imati veći utjecaj na kvalitetu života bolesnika. (McGinley i sur., 2021; Brinar i sur., 2019)



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Multipla skleroza je bolest za koju se često kaže da je to bolest s tisuću lica zato jer sama prezentacija bolesti varira od pojedinca do pojedinca. Razlikuje se u samoj manifestaciji simptoma, kliničkoj slici i tijeku. (Bašić Kes i sur., 2021) S obzirom da je to izrazito klinički različita bolest, izazovna je za kliničko prepoznavanje, dijagnozu, praćenje tijeka bolesti i liječenje. Svakim danom se sve više pridodaje na važnosti pravodobne dijagnoze MS kako bi se mogli razvijati novi lijekovi, među kojima i lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti koji su učinkoviti u prvim stadijima bolesti, a kako bi se kvaliteta života oboljelih povećala, a one najgore posljedice bolesti odgodile. Osim toga, važno je imati mogućnost nadziranja kliničkog tijeka bolesti i liječenja kako bi se provjerilo je li terapija valjana. Stoga je MS čest predmet istraživanja te se intenzivno traže nove mogućnosti dijagnostike kako bi dijagnostika bila što usmjerenija i preciznija, ekonomičnija, neinvazivna za pacijente, a s druge strane kako bi se olakšalo praćenje tijeka bolesti, ali i terapije. Sam uzrok MS još uvijek je nepoznat, a razvoj novih metoda omogućuje uvid u dosad nepoznatu patogenezu bolesti.

U istraživanjima je pokazana mogućnost primjene novih biomarkera, cfDNA i miRNA, prilikom dijagnoze, praćenja tijeka bolesti i terapije MS koji bi kao takvi bili i neinvazivni biomarkeri. Također razvoj NGS-a (engl. *next generation sequencing*), metode sekvenciranja nove generacije, omogućio je otkrivanje novih čimbenika uključenih u patogenezi MS, potencijalnih biomarkera gena i novih meta za razvoj lijekova. Ovim preglednim radom željele su se prikazati dosadašnje spoznaje o biomarkerima MS, cfDNA i miRNA kao potencijalnim novim biomarkerima MS te primjena NGS metode istraživanju MS i njena potencijalna primjena u dijagnostici MS.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Za potrebe pisanja ovog diplomskog rada proučavana je stručna i znanstvena literatura vezana uz dijagnostiku multiple skleroze, biomarkere bolesti u kliničkoj praksi, potencijalno nove biomarkere multiple skleroze, sekvenciranje nove generacije. Pretražena je literatura iz PubMed baze podataka te znanstveni radovi i članci iz javno dostupnih znanstvenih časopisa.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Dijagnostika multiple skleroze

Postavljanje dijagnoze MS temelji se McDonaldovim kriterijima, koji su revidirani s vremena na vrijeme s ciljem povećanja dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti te kako bi se osigurala što ranije primjena odgovarajuća terapije. Ažuriranje McDonaldovih kriterija naglašava potrebu razlikovanja prve kliničke epizode, CIS-a od drugih neuroloških bolesti. Prema kriterijima moguće je postaviti dijagnozu MS nakon samo jednog kliničkog napadaja i na temelju samo jednog nalaza magnetne rezonance. Za postavljanje dijagnoze izrazito su važne neuroradiološke pretrage, magnetna rezonanca mozga i kralježnične moždine kojima se otkrivaju prisutne lezije, dok je analiza likvora i pozitivan nalaz oligoklonalnih vrpca u likvoru IgG tipa zlatni standard za potvrdu dijagnoze MS. Osnovni koncept za dijagnostiku MS je koegzistencija kliničkih znakova ili biomarkera koji ukazuju i na diseminaciju u prostoru (engl. *dissemination in space, DIS*; razvoj lezija na različitim mjestima SŽS-a) i na diseminaciju u vremenu (engl. *dissemination in time, DIT*; ukazuje na kroničnu bolest, razvoj novih lezija tijekom vremena).

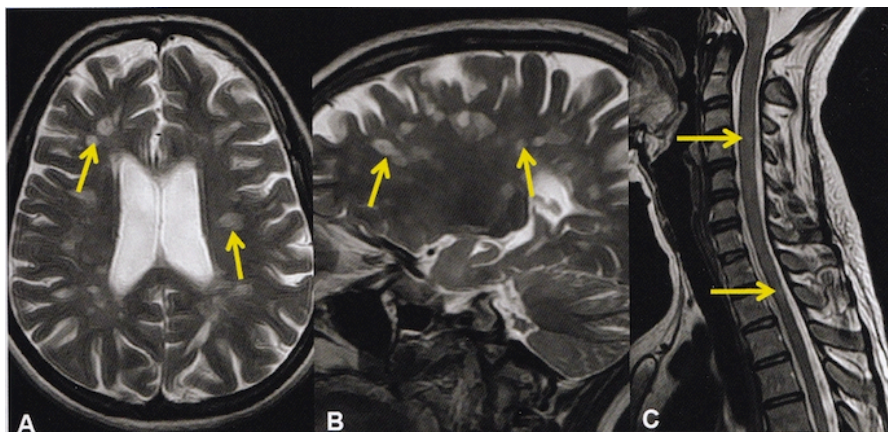
Bolest je vrlo heterogena i upravo zato dijagnostika MS može biti vrlo izazovna. Kod bolesnika s tipičnom kliničkom slikom RRMS i tipičnog nalaza magnetne rezonance mozga i vratne kralježnice postavljanje dijagnoze je jednostavno no poteškoće nastaju kada oboljeli imaju atipičnu prezentaciju bolesti, jednu epizodu bolesti ili progresivni tijek bolesti od samog početka. Tada je za dijagnozu potrebna daljnja dijagnostička obrada: različite krvne pretrage, analiza cerebrospinalne tekućine i elektrofiziološke pretrage. (Arneth i Kraus, 2021; Bašić Kes i sur., 2021; Lo Sasso i sur., 2019; Topić i sur., 2018)

#### 4.1.1. Neuroradiološki nalazi

Magnetna rezonancija (MR) je jedan od dijagnostičkih postupaka kojim se pomoću elektromagnetskih valova niske energije oslikavaju pojedini dijelovi tijela poput mozga, krvnih žila, kralježnice, zglobova, mišića. Tijekom pregleda bolesnik mora biti miran, jer svaki pomak tijekom snimanja koje traje približno 45 minuta remeti sliku i otežava interpretaciju snimke. Princip na kojem se zasniva MR je da se dio tijela koji se želi snimiti stavlja u područje jakog magnetskog polja, a kako je naše tijelo građeno od velikog udjela vode koja sadržava vodikove ione, upravo pod utjecajem magnetskog polja, protoni u vodikovim atomima postaju paralelni s magnetnim poljem te se tada emitiraju pulsni radiovalovi. Oni prolaskom kroz naše tijelo

pomiču protone u vodikovim atomima iz njihova položaja, a prestankom emitiranja radiovalova protoni se vraćaju u liniju paralelnu s magnetnim poljem. Prilikom vraćanja u navedeni položaj odašilju se signali koji se prihvaćaju tzv. radioprijamnikom te se kompjuterski pretvaraju u sliku. U MR snimkama koristi se gadolinijski kontrast (Gd), a primjenjuje se intravenski. (Brinar i sur., 2019)

Uz kliničku sliku, MR mozga s primjenom kontrasta i MR vratne kralježnice s primjenom kontrasta temelj je za postavljanje dijagnoze MS, kao što čine i osnovu za praćenje bolesti. MR je također bitna za postavljanje rane i točne dijagnoze. U 90-95 % oboljelih od MS javlja se patološki nalaz MR-a mozga, dok se u 75 % bolesnika javlja patološki nalaz kralježnične moždine. Pomoću nalaza MR-a s kontrastom mogu se razlikovati aktivne i kronične demijelinizacijske lezije: aktivne lezije nakupljaju kontrast, dok su kronične lezije one koje ne nakupljaju kontrast. Iako demijelinizacijske lezije, plakovi mogu biti lokalizirani u svim dijelovima SŽS-a, kod oboljelih od MS postoji nekoliko najčešćih lokalizacija demijelinizacijskog oštećenja: periventrikularno, jukstakortikalno (u području sive i bijele tvari) ili kortikalno, infratentorijalno te u kralježničnoj moždini (uglavnom u području vrata, eventualno toraksa). Prisutnost demijelinizacijskih lezija okomito na *corpus callosum* (žuljevito tijelo), tzv., Dawsonovih prstiju tipičan je nalaz MR mozga kod oboljelih od MS. MR snimke mozga pacijenata koji boluju od MS na kojima su vidljive demijelinizacijske lezije prikazane su na slici 4. (Bašić Kes i sur., 2021; Rovira i Auger, 2021)

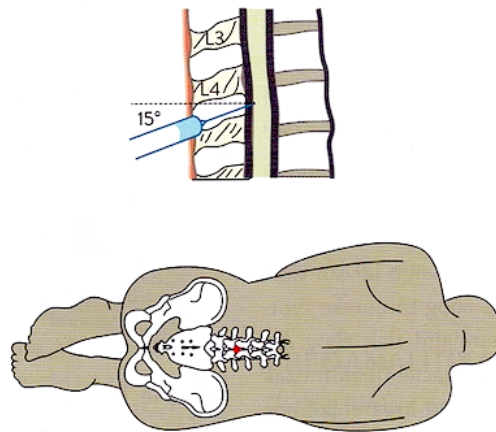


Slika 4. MR snimka mozga i vratne kralježnice kod oboljelog od MS. A - mnogobrojne male obostrane ovalne demijelinizacijske promjene. B - tipičan nalaz MR mozga: okomite demijelinizacijske lezije na *corpus callosum* (žuljevito tijelo), tzv. Dawsonovi prsti. C - male blijede demijelinizacijske promjene u obliku krpica za kralježničnoj moždini; preuzeto i prilagođeno iz: Bašić Kes i sur., 2021.

#### 4.1.2. Analiza likvora

Likvor (cerebrospinalna tekućina) je bezbojna, prozirna tekućina. Oblaže SŽS te na taj način mehanički štiti mozak, donosi hranjive sastojke za mozak i kralježničnu moždinu, a odnosi otpadne produkte. Također, likvor je transportni medij za biološki aktivne spojeve koji imaju ulogu kemijskih glasnika te održava homeostazu mozga, sudjeluje u regulaciji moždane cirkulacije i intrakranijalnog tlaka. U bolesti, cirkulacija, sastav i značajke likvora se mijenjaju te iz tog razloga likvor je važan ekstravaskularan uzorak u dijagnostici, prognozi i praćenju pojedinih bolesti. U odraslih osoba nalazi se oko 150 mL likvora koji je raspodijeljen između subarahnoidalnih prostora glave, kralježnične moždine i ventrikula. S obzirom na malu količinu likvora prisutnu kod ljudi, uzorak likvora je izrazito dragocjen, a uzima se lumbalnom punkcijom koja je invazivan dijagnostički postupak.

Tijekom lumbalne punkcije uvodi se igla u subarahnoidalni prostor lumbalne vreće ispod razine kralježnične moždine (Slika 5.). U odraslih se uglavnom izvodi između L3 i L5, a u djece između L3 i L4 lumbalna kralješka u tri sterilne polipropilenske epruvete bez aditiva. Epruvete se odmah nakon uzrokovanja trebaju dostaviti u laboratorij. Minimalni volumen likvora koji se uzima je 12 mL (4 mL po spremniku). (Nikolac Gabaj i sur., 2019)



Slika 5. Prikaz lumbalne punkcije; preuzeto i prilagođeno iz: Nikolac Gabaj i sur., 2019.

Pretrage likvora također su važan segment dijagnostike MS, iako one ne utječu na dijagnozu postavljenu na osnovi neuroradioloških nalaza, korisne su kod atipičnih slučajeva (Tablica 1.). Analizom likvora važno je utvrditi prisutnost oligoklonalnih vrpca koje čine zlatni standard za potvrdu dijagnoze MS te povišeni IgG indeks. Može biti prisutna limfocitna

pleocitoza te blaga proteinorahija, dok su ostali parametri uglavnom uredni. Također, paralelnom analizom uzorka seruma i krvi pomoću matematičko-statističkih modela moguće je otkriti poremećaje funkcije krvno-moždane barijere preko albuminskog kvocijenta te postoji li intratekalna sinteza IgG-a. Pomoću MRZ (morbili, rubeola, varicela-zoster) reakcije može se poboljšati specifičnost za MS, odrediti prediktivna vrijednost za MS i pretvorbu CIS u MS. (Bašić Kes i sur., 2021; Topić i sur., 2018)

Tablica 1. Preporučene pretrage i očekivani nalazi likvora u multiploj sklerozi; preuzeto i prilagođeno iz: Sertić i sur., 2015.

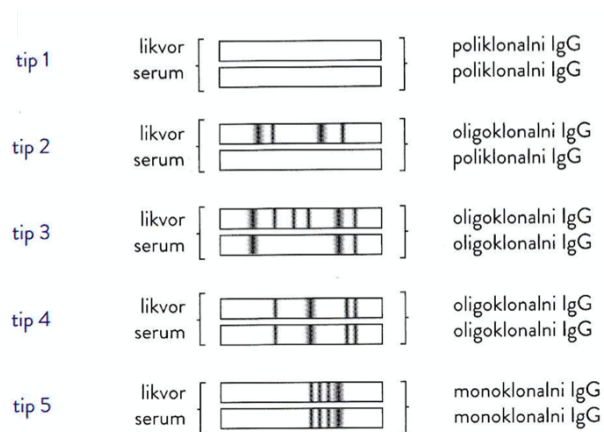
Pretrage likvora	Očekivani nalazi
Izgled	bistar, bezbojan
Ukupan broj stanica	0-40/ $\mu$ L
Diferencijalna slika	mononuklearne stanice
Ukupni proteini	0,4-0,7 g/L
Albuminski kvocijent	$< 20 \times 10^{-3}$
Imunoglobulini	IgG > IgM > IgA
Oligoklonalni Ig	pozitivni
Indeks specifičnih antitijela (ASI)	MRZ reakcija pozitivna

#### 4.1.2.1. Oligoklonalne vrpce

Imunološki odgovor unutar SŽS-a je uglavnom oligoklonalnog tipa što je pak uvjetovano postojanjem krvno-moždane barijere, specifičnom građom i položajem te SŽS-a. Imunokompetentne stanice tijekom upale ulaze u SŽS kroz oštećenu, aktiviranu krvno-moždanu barijeru, dok se limfociti B transformiraju u plazma stanice nakon antigenske stimulacije te počinju proizvoditi antitijela. No, s obzirom da je unutar SŽS-a malen broj B-stanica koje su stimulirane, stvara se isto tako i ograničen broj tipova pojedine klase imunoglobulina, zato jer jedan klon B-stanica stvara samo jednu klasu imunoglobulina određenog tipa lakih lanaca što se pak analizom likvora iskazuje kao pojava užih vrpca u području  $\gamma$ -globulinske frakcije - oligoklonalnih imunoglobulina. (Sertić i sur., 2015)

Kao što je već ranije rečeno, pozitivan nalaz oligoklonalnih vrpca zlatni je standard za potvrdu dijagnoze MS. Iako je dijagnostička uloga oligoklonalnih vrpca smanjena unutar trenutnih McDonaldovih kriterija iz 2017., nalaz može biti koristan kod atipičnih slučajeva. Oligoklonalne vrpce su uska područja gamaglobulina, a nastaju zbog dugotrajne antigen stimulacije B-limfocita u SŽS-u, a njihov pozitivan nalaz predstavljaju najmanje dvije vidljive vrpce u likvoru koje se ne vide u serumu. Oligoklonalne vrpce dokazuju se izoelektričnim fokusiranjem na agarozu što je ujedno i referentna metoda za dokaz oligoklonalnih vrpca, a analizira se uzorak seruma i likvora istodobno, nakon čega slijedi imunofiksacija pomoću koje se dobiju uzorci (Slika 6.) na temelju kojih je moguće zaključiti radi li se o:

- normalnom nalazu - tip 1
- multiploj sklerozi; nalaz upućuje na intratekalnu sintezu IgG - tip 2
- multiploj sklerozi i upali mozga uz sistemsku bolest; oligoklonske vrpce nalaze se u serumu, ali u znatno većem broju i u likvoru što upućuje na intratekalnu sintezu - tip 3
- sistemskoj upali; identične oligoklonske vrpce i u serumu i u likvoru, nalaz ne upućuje na intratekalnu sintezu nego na sistemnu imunosnu reakciju - tip 4
- mijelomu ili monoklonalnoj gamapatiji; izrazito izražene vrpce i u likvoru i u serumu, moguća monoklonalna proizvodnja antitijela - tip 5



Slika 6. Shematski prikaz načina interpretacije obrasca pojavnosti oligoklonalnih vrpca prema međunarodnom dogovoru; preuzeto i prilagođeno iz: Topić i sur., 2018.

Oligoklonalne vrpce su visoko osjetljive za dijagnosticiranje MS, pozitivne su u čak do 95 % oboljelih za MS. Specifičnost je razmjerno niska, jer su oligoklonske vrpce pozitivne i u drugim upalnim bolestima SŽS koje potiču humoralni imunosni odgovor unutar SŽS-a, poput

subakutnog sklerozirajućeg panencefalitisa, Guillan-Barreov sindroma, neurosifilisa, neuroborelioze. Stoga, dijagnostika MS se ne bi smjela temeljiti samo na pozitivnom nalazu oligoklonalnih vrpca, već se u obzir trebaju uzeti i neuroradiološki nalazi te klinička slika.

Patološka uloga oligoklonalnih vrpca za sada još uvijek nije poznata. Smatra se da broj vrpca ima prognostičku vrijednost te kako korelira s nalazom MR: bolesnici s manje oligoklonalnih vrpca ujedno imaju i manji broj aktivnih plakova i plazma-stanica. Također se smatra kako tijekom bolesti ne dolazi do promjene u broju vrpca i njihovom obrascu pojavnosti. Neki izvori kažu da niti terapija nema utjecaj na oligoklonske vrpce, dok su pak drugi izvori objavili mogući nestanak oligoklonskih vrpca u likvoru nakon pojedine terapije. Potrebna su daljnja istraživanja. (Bašić Kes i sur., 2021; Arrambide i sur., 2018; Topić i sur., 2018; Gastaldi i sur., 2017)

#### **4.1.2.2. IgG indeks**

U 85-95 % oboljelih od MS nalaze se povišeni imunoglobulini, odnosno IgG antitijela. Važno je utvrditi podrijetlo povišenih imunoglobulina, s obzirom da oni mogu biti sintetizirani u sustavnom krvotoku i sekundarno dospjeti u SŽS, a s druge strane mogu biti intratekalno sintetizirani. U fiziološkim uvjetima živčano tkivo nema sposobnost sinteze proteina, imunoglobulina, već su proteini u likvoru krvnog podrijetla. Intratekalna sinteza, odnosno sinteza imunoglobulina unutar SŽS-a je znak lokalizirane imunološke reakcije unutar živčanog tkiva što je prisutno u različitim neurološkim bolestima pa tako i u MS. Najčešće je riječ o IgG. Kako bi se utvrdilo podrijetlo imunoglobulina, određuje se IgG indeks. To je vrijednost do koje se dolazi usporedbom omjera između razine likvorskih IgG-a i likvorskih albumina te serumskih IgG-a i serumskih albumina. Normalan nalaz je unutar raspona 0,5 do 1,5, dok vrijednosti IgG indeksa veće od 2,0 upućuju na intratekalnu sintezu. (Bašić Kes i sur., 2021; Sertić i sur., 2018)

#### **4.1.2.3. Reibergram**

Kako bi se napravila kvantitativna procjena funkcije krvno-moždane barijere i intratekalne sinteze imunoglobulina potrebno je odrediti koncentracije albumina i pojedinih klasa imunoglobulina u likvoru i serumu pomoću kojih se zatim izračunavaju njihovi kvocijenti (Q). Q albumina je najbolji i najprecizniji biokemijski pokazatelj oštećenja funkcije krvno-moždane barijere, jer je jedino mjesto sinteze albumina jetra te sav albumin koji se nalazi unutar

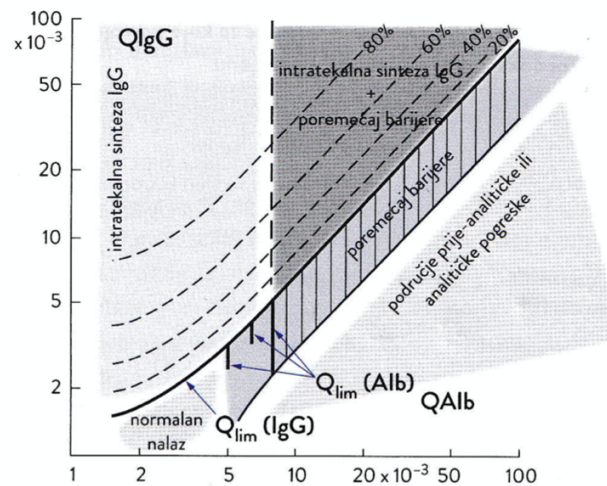


SŽS-a potječe s periferije pa je tako koncentracija albumina u likvoru odraz njegove koncentracije u serumu. Ukoliko dođe do oštećenja barijere, gubi se selektivnost i uslijed povećane propusnosti barijere, albumin, ali i IgG će ući u likvorski prostor. IgG koji je ušao u likvor zbog disfunkcije barijere važno je razlikovati od IgG-a koji je intratekalno sintetiziran.

Reiberov matematičko-statistički model (Slika 7.) omogućuje razlikovanje porasta koncentracije IgG-a uslijed disfunkcionalne barijere i porasta koncentracije IgG-a zbog intratekalne sinteze, a temelji se na odnosu koncentracija albumina i imunoglobulina (likvor/serum). Na Reibergramu razlikujemo pet područja:

- područje normalne funkcije barijere
- područje normalne funkcije barijere uz prisutnu intratekalnu sintezu IgG
- područje disfunkcije barijere/brzine izmjene likvora
- područje disfunkcije barijere/izmjene likvora uz intratekalnu sintezu IgG
- područje nesigurnog biološkog značenja (posljedica prijeanalitičke ili analitičke pogreške)

Matematičko-statistički model po Reiberu može se koristiti samo ako postoji ustaljeno stanje između sistemske cirkulacije i likvora. (Bašić Kes i sur., 2021; Topić i sur., 2018; Sertić i sur., 2015)



Slika 7. Grafički prikaz matematičko-statističkog modela prema Reiberu; preuzeto i prilagođeno iz: Topić i sur., 2018.

Granična vrijednost kvocijenta albumina ( $Q_{limAlb}$ ) je ovisna o dobi te bolesnici iste dobi imaju jednak  $Q_{limAlb}$ , a njome procjenjujemo funkciju barijere.  $Q_{Alb}$  temelj je za kvantifikaciju intratekalno sintetiziranog IgG-a te se uvrštava u formulu pomoću koje se

izračuna osobni granični kvocijent IgG-a ( $Q_{lim}IgG$ ). Svaki bolesnik ima svoj  $Q_{lim}IgG$  koji je pak ovisan o individualnom  $Q_{Alb}$ -u.

Ako je  $Q_{Alb} < Q_{lim}Alb$ , funkcija barijere je očuvana.

Ako je  $Q_{Alb} > Q_{lim}Alb$ , postoji poremećaj funkcije barijere.

Ako je  $Q_{IgG} > Q_{lim}IgG$ , nema intratekalne sinteze.

Ako je  $Q_{IgG} < Q_{lim}IgG$ , postoji intratekalna sinteza.

Ako je  $Q_{Alb} > Q_{lim}Alb$  i  $Q_{IgG} > Q_{lim}IgG$ , govorimo o području disfunkcije barijere/izmjene likvora sa sintezom IgG-a unutar SŽS-a.

Procjenjuje se da se kvantitativnom analizom intratekalna sinteza IgG-a otkrije u otprilike 75% pacijenata. Stoga je kvalitativna metoda osjetljivija iz razloga jer se obrazac pojavnosti IgG-a u likvoru uspoređuje s obrascem pojavnosti IgG-a u serumu za svakog pacijenta. (Bašić Kes i sur., 2015)

#### 4.1.2.4. MRZ reakcija

U otprilike 90 % bolesnika s MS-om može se dokazati intratekalni specifični imunosni odgovor na neurotropne viruse: ospice, rubeolu i varičelu zoster. Dokazivanje specifičnosti intratekalno stvorenih antitijela na navedene neurotropne viruse naziva se MRZ reakcije, gdje MRZ stoji kao skraćenica od *Measles, Rubella, Varicella Zoster*. Za procjenu intratekalne sinteze specifičnih antitijela izračunava se indeks specifičnih antitijela (engl. *Antibody Specificity Indeks, ASI*) za svaki patogen. Pri izračunu ASI uzima se u odnos kvocijent koncentracija specifičnog antitijela određene klase Ig ( $Q_{IgG_{pat-spec}}$ ) i ukupne koncentracije antitijela te iste klase ( $Q_{IgG}$ ):

$$ASI_{pat-spec} = \frac{Q_{IgG_{pat-spec}}}{Q_{IgG}}$$

Kada je  $ASI \geq 1,5$  za barem dva patogena, dokazana je intratekalna sinteza specifičnih antitijela, a kada je  $ASI < 0,5$  smatra se da je prisutna predanalitička ili analitička pogreška. Ukoliko se ASI ne može izračunati, jer je koncentracija antitijela na specifični patogen u serumu i likvoru nemjerljiva, tada se smatra da je  $ASI=1$ , odnosno da je negativan. Pozitivna MRZ reakcija rijetka je kod drugih upalnih neuroloških bolesti za razliku od pozitivnog nalaza oligoklonalnih vrpca te stoga poboljšava specifičnost za MS kod bolesnika s pozitivnim oligoklonalnim vrpcama. Specifičnost pozitivne reakcije za barem dva patogena veća je od 90

% za MS te se danas smatra najspecifičnijim biljekom MS. (Bašić Kes i sur., 2021; Toscano i Patti, 2021; Sertić i sur., 2015)

#### **4.1.3. Analiza krvnih pretraga**

Kod oboljelih od MS, nalazi krvnih pretraga uglavnom su uredni. Korisni su u diferencijalnoj dijagnozi koja podrazumijeva isključenje ostalih bolesti poput infekcija, autoimunskih sustavnih bolesti, endokrinih poremećaja, itd. Analiza često uključuje određivanje vitamina B<sub>12</sub>, hormona TSH, brzinu sedimentacije eritrocita i titar anti-nuklearnih antitijela, kao i test na lajmsku bolest i test na sifilis. Opsežnija procjena može uključivati i testove na anti-neutrofilna citoplazmatska protutijela, anti-fosfolipidna protutijela. (Bašić Kes i sur., 2021; Calabresi, 2004)

#### **4.2. Biomarkeri u multiploj sklerozi**

Biomarker je definiran kao biljeg koji se može objektivno izmjeriti i procijeniti te služi kao pokazatelj normalnih bioloških procesa, patoloških procesa ili farmakoloških reakcija na terapiju. U idealnom slučaju, biljeg koji je prisutan u ljudi s određenom bolešću, a nema ga u zdravih ljudi ili osoba s drugom bolešću ili obrnuto. Ako se bolest pogorša ili poboljša, koncentracija biomarkera trebala bi se ovisno o tome povećati ili smanjiti. Još jedna karakteristika idealnog biomarkera je da je siguran za pacijenta i lako ga je otkriti, u najboljem slučaju ne koristi se invazivna metoda. Analitička metoda detekcije trebala bi biti visoko točna i ponovljiva, a istovremeno brza, jednostavna i isplativa kako bi se osigurala sveobuhvatna provedba. Stoga bi rezultat metode detekcije trebao biti neosjetljiv na čimbenike kao što su prikupljanje uzoraka, obrada uzoraka i skladištenje uzoraka. (Nourian, 2021; Ziemssen i sur., 2019)

Zbog složenosti i heterogene etiologije ove bolesti, postavljanje dijagnoze, liječenje i procjena budućeg tijeka bolesti za svakog pojedinog pacijenta predstavlja izazov. Dijagnoza MS najčešće se postavlja onda kada je klinička slika već prisutna te su uočljive demijelinizacijske lezije. MR je izrazito skupa i nelagodna metoda za pacijenta, a koristi se prilikom postavljanja dijagnoze te praćenja tijeka bolesti. Međutim, primjena kliničkih i slikovnih biomarkera trenutno ne može dopustiti individualnu karakterizaciju i predviđanje. Kao rezultat toga, potreba za poboljšanjem dijagnostičkih postupaka, prognostičkih biljega i promicanjem učinkovitog praćenja odgovora pacijenata na liječenje, ali i sve veće znanje o

molekularnim mehanizmima koji dovode do kronične upale povećalo je interes za identifikaciju mnogih biomarkera aktivnosti bolesti. Sve veći značaj pridodaje se otkrivanju biomarkera za MS kojim će se bolest moći predvidjeti, dijagnosticirati, odrediti tip MS, pratiti tijek bolesti i učinkovitost terapije. Godinama su intenzivni naponi usmjereni na identifikaciju biomarkera koji su povezani s različitim aspektima MS. Što se ranije bolest otkrije, omogućuje raniji početak terapije i bolji ishod bolesti. S obzirom da bolest ima različitu kliničku prezentaciju od osobe do osobe, različit je i odgovor pacijenta na terapiju. MS zahtjeva individualiziranu terapiju. Već se desetljećima traga za dobrim biomarkerima MS koji bi bili specifični i osjetljivi za MS, ekonomični i neinvazivni. Lumbalna punkcija invazivan je postupak za pacijenta te se zato pokušavaju naći i biomarkeri u serumu s obzirom da je vađenje krvi rutinski postupak. Unatoč velikom broju studija i dugom popisu biomarkera kandidata, danas je vrlo mali broj biomarkera od kliničke vrijednosti. To je uglavnom zbog nedostatka usporedivosti i premalog broja ispitanika u većini studija. Međutim, postoji nedavni napredak u području biomarkera za MS. (Arneth i Kraus, 2021; Toscano i Patti, 2021; Bašić Kes i sur., 2021; Paap i sur., 2013)

#### **4.2.1. Prediktivni biomarkeri multiple skleroze**

Prediktivni biomarker je onaj biomarker koji predviđa, izražava mogućnost za razvijanje pojedine bolesti prije negoli ona sama nastupi i bude dijagnosticirana. Optički neuritis je akutni upalni demijelinizirajući poremećaj vidnog živca. Karakteristika optičkog neuritisa je jednostrani, subakutni i bolni gubitak vida. U nekim slučajevima, optički neuritis također može biti povezan s demijelinizirajućim poremećajima SŽS, uključujući multiplu sklerozu. Vidni živac jedna je od glavnih meta MS. 20% pacijenata sa MS ima optički neuritis kao jedan od prvih simptoma prije pojave bolesti, dok se tijekom bolesti optički neuritis može pojaviti u 50% pacijenata. Rizik od razvoja MS kod pacijenata s optičkim neuritisom se povećava s godinama, no ne razvijaju svi pacijenti s optičkim neuritisom MS. (Sadam i sur., 2021; Kale, 2016)

Najnovija studija identificirala je biomarkere iz uzorka krvi koji mogu procijeniti potencijalnu progresiju optičkog neuritisa u MS. Radi se o dva epitopa antitijela koji predviđaju rizik od razvoja MS nakon pojave optičkog neuritisa. Dva biomarkera epitopa razlikuju osobe s optičkim neuritisom, osobe s optičkim neuritisom nakon kojeg će se razviti MS od zdravih kontrola i pacijenata bez ikakve demijelinizirajuće bolesti. Daljnja karakterizacija otkrivenih epitopa antitijela je poželjna, jer bi oni mogli pružiti daljnje razumijevanje patofiziološkog konteksta iza progresije MS. Upravo ovakvi rezultati istraživanja pokazuju napredak

biomedicinskih znanosti te mogućnosti unaprijeđenja dijagnoze i terapije MS. (Sadam i sur., 2021)

Ono što je već poznato jest da su HLA geni povezani s nastankom MS. Najveći i prvi identificirani genetski čimbenik rizika je alel iz gena HLA-DRB1 klase MHC klase II, HLA-DRB1\*15:01, koji povećava rizik od MS oko tri puta, a upravo zbog toga može biti i prediktivni genetički biomarker MS. HLA-DRB1 gen je eksprimiran u stanicama koje predstavljaju antigen, a njegova funkcija je u predstavljanju određenih vrsta antigena CD4+ T stanicama. Opisano je više od 200 varijanti rizika, a svi su polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*). (Parnell i Booth, 2017)

Pokazalo se da je alel HLA-DRB1\*15:01 reguliran interakcijom s vitaminom D na genomskoj razini. Vitamin D se također može koristiti kao prediktivni biomarker MS u kombinaciji s navedenim genetičkim biomarkerom, jer smanjene razine vitamina D kod osoba s genetskom podlogom za MS su povezane s većim rizikom od pojave bolesti. Na taj način možemo razabrati osobe s velikim rizikom od obolijevanja od MS i prije nego što ona nastupi te potencijalno suplementacijom prehrane vitaminom D odgoditi pojavu bolesti. (Bašić Kes, 2015)

#### **4.2.2. Dijagnostički biomarkeri multiple skleroze**

Dijagnostički biomarkeri koriste se za potvrdu dijagnoze MS. Test koji se koristi za dijagnosticiranje bolesti često mjeri vrstu biomarkera koji se naziva "surogat". Biomarkeri koji su prikladni za dijagnozu MS moraju omogućiti razlikovanje pacijenata s MS-om i zdravih ljudi ili onih s drugim bolestima. Ranije opisane oligoklonalne vrpce, IgG indeks i MRZ reakcija su biomarkeri dijagnoze MS u kliničkoj praksi. Trenutno se MS ne može dijagnosticirati laboratorijskim određivanjem jednog parametra i čini se kako to još uvijek u skoroj budućnosti neće biti moguće, već će za dijagnostiku biti potreban panel biomarkera.

Akvaporin-4 je protein vodenog kanala koji astrociti eksprimiraju u SŽS-u i koji ima važnu ulogu u regulaciji homeostaze vode u SŽS-u. Antitijela usmjerena na ovaj protein mogu se otkriti u oko 75% pacijenata s poremećajem spektra optičkog neuromijelitisa (engl. *neuromyelitis optica spectrum optica, NMOSD*), ali ne i u pacijenata koji boluju od MS. To čini akvaporin-4 protutijela pogodnim za biomarkere s visokom specifičnošću. To je prvi klinički uspostavljen molekularni biomarker koji omogućuje razlikovanje različitih upalnih demijelinizirajućih bolesti SŽS-a. Pogodan je kod postavljanja dijagnoze MS upravo zato jer NMOSD i početak MS imaju preklapajuće simptome te ukoliko navedeni biomarker nije

prisutan, radi se o MS. Antitijela usmjerena na akvaporin-4 su dobar biomarker za diferencijalnu dijagnozu te se sve više koristi u kliničkoj praksi. (Nourian, 2021; Ziemssen i sur., 2019)

U nastavku su navedeni laboratorijski dijagnostički biomarkeri za koje se uvidjela klinička vrijednost no nisu još zaživjeli u kliničkoj praksi prilikom dijagnostike MS. Kod bolesnika s MS nađene su znatno veće razine serumskih autoantitijela na fragmente mijelinskog bazičnog proteina u usporedbi sa zdravim kontrolama te iz tog razloga se mogu upotrijebiti u postavljanju dijagnoze MS.

Potencijalna patogena uloga vitamina u MS može se zaključiti po višestrukim prethodnim epidemiološkim studijama koje su pokazale povezanost zemljopisne širine i izloženosti suncu s relativnim rizikom za razvoj bolesti. Koncentracija vitamina D kod oboljelih od MS su znatno niže u odnosu na zdrave pojedince.

Lambda i kapa slobodni laki lanci predstavljaju osjetljiv pokazatelj intratekalne sinteze kod upalnih poremećaja SŽS-a te imaju tendenciju akumulacije zajedno s imunoglobulinima. Kapa slobodni lanci pokazuju jaču korelaciju s MS, od lambda slobodnih lanca.

Dušikov oksid (NO) i njegovi metaboliti mogu uzrokovati mitohondrijska oštećenja i hipoksiju tkiva što dovodi do daljnjih oštećenja u MS lezijama. Zabilježene su visoke razine NO u serumu i likvoru kod upalnih neuroloških poremećaja pa tako i kod MS.

Kisikovi reaktivni spojevi (engl. *reactive oxygen species, ROS*) oštećuju oligodendrocite i mijelin oksidativne procese. Kolesterol mijelina razgrađuje se na 7-ketokolesterol, čija je razina u likvoru pacijenata s MS-om povišena.

Lipokalini su obitelj proteina koji prenose male hidrofobne molekule, sudjelujući u nekoliko procesa imunološkog sustava. Utvrđeno je da je razina lipokalina 2 u likvoru povećana u oboljelih od MS.

S100B je protein koji veže kalcij, prvenstveno je izražen u astrocitima, a povišene vrijednosti u likvoru koreliraju s cerebralnom ozljedom. Postoje izvještaji o povećanju koncentracije S100B u bolesnika s RRMS-om, ali zasad nedostaje dokaza.

Protein koji ima jaču korelaciju s MS od S100B je glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein, GFAP*). GFAP je strukturni protein astrocita čija se razina u likvoru povećava zajedno s gliozom. Visoke vrijednosti u likvoru pronađene su u pacijenata sa SPMS-om, ali rijetko u bolesnika s RRMS-om.

Topiva molekula Nogo-A je mijelinska komponenta SŽS-a koja inhibira popravak aksona. Njegova prisutnost u likvoru je vrlo specifična za MS, jer se ne može izolirati u drugim autoimunim ili zaraznim neurološkim poremećajima te je stoga dobar dijagnostički biomarker.

N-acetil aspartat (NAA) je aminokiselina, visoko izražena u neuronima, koja aktivno prenosi molekule vode. Razine u serumu i u cerebrospinalnoj tekućini bile su značajno veće u bolesnika s RRMS-om, u usporedbi sa kontrolama i pacijentima s NMO-om. Stoga, NAA bi mogla biti od pomoći u i diferencijalnoj dijagnozi između MS i NMO. (Toscano i Patti, 2021; Katsavos i Anagnostouli, 2013)

#### 4.2.3. Prognostički biomarkeri multiple skleroze

Prognostički biomarker pomaže naznačiti kako se bolest može razviti kod pojedinca kada je poremećaj već dijagnosticiran. Prisutnost ili odsutnost prognostičkog markera može biti korisna za odabir pacijenata za liječenje, ali ne predviđa izravno odgovor na liječenje. Biomarkeri za prognozu MS mogu pružiti informacije o tijeku aktivnosti bolesti i ukazati na konverziju u drugi oblik MS, na primjer iz CIS-a u RRMS ili iz RRMS u SPMS.

Detekcija oligoklonalnih vrpca IgG u likvoru povezana je s pretvorbom iz CIS-a u MS i stoga se može opisati kao biomarker za prognozu MS. Oligoklonalne vrpce povećavaju rizik od klinički potvrđene MS i progresije invaliditeta.

Oligoklonalne vrpce IgM u likvoru neki znanstvenici smatraju lošim prognostičkim biomarkerom koji korelira s progresijom invaliditeta i kvalitativno i kvantitativno te prisutnost IgM protiv određenih mijelinskih lipida može značiti agresivniji tijek bolesti.

Protein CHI3L1 (engl. *chitinase-3-like-1*) je glikozidaza koju luče monociti, mikroglija i aktivirani astrociti. Fiziološka uloga CHI3L1 u SŽS-u je nepoznata, međutim raspodjela ovog proteina u upalnim lezijama sugerira da bi to mogla biti važna komponenta astrocitnog odgovora za moduliranje upale. Obično se detektira u likvoru. U studiji je dokazana koncentracija CHI3L1 čimbenik rizika za pretvorbu iz CIS-a u MS. Visoke razine CHI3L1 također su povezane s bržim napredovanjem invaliditeta. Iako CHI3L1 još nije klinički uspostavljen, on je obećavajući kandidat kao biomarker prognoze MS i vjerojatno odgovora na liječenje.

Neurofilamenti (engl. *neurofilaments*, *NF*) su neuronski citoskeletni proteini koji se sastoje od lakog (NFL), srednjeg (NFM) i teškog (NFH) lanca, a određuju promjer aksona. Ako dođe do aksonskog ili neuronskog oštećenja, oslobađaju se NF i mogu se otkriti u likvoru i krvi. Pacijenti s MS-om imaju povišene razine NFL-a u usporedbi s kontrolnom skupinom, s jakom povezanošću vrijednosti izmjerenih istodobno u likvoru i serumu. Razine NFL-a u serumu također koreliraju s novim MRI lezijama, stupnjem invaliditeta i stopom atrofije mozga. Nadalje, NFL je također prikladan kao biomarker za konverziju iz CIS-a u MS. Općenito, čini

se da određivanje serumske koncentracije NFL-a, za koju nije potrebna lumbalna punkcija, korelira s mnogim kliničkim karakteristikama MS te se stoga može zamisliti kao budući prognostički biomarker u kliničkoj praksi. S druge strane, čini se da lanci NFH bolje koreliraju s progresijom bolesti, pri čemu je značajno povišenje zabilježeno samo u progresivnim oblicima bolesti.

Matriks metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinases*, *MMP*) su cink-endopeptidaze. MMP imaju ulogu u remodeliranju tkiva, angiogenezi i migraciji stanica, ali i kod upala. Tijekom upale brojne molekule sposobne su aktivirati MMP. Smatra se da su MMP odgovorne za disfunkciju krvno-moždane barijere u MS jer razgrađuju bazalnu membranu kapilara i čvrstog spoja. Također razgrađuju mijelin bazični protein što pogoduje prolasku leukocita s periferije u SŽS. Pronađene su visoke razine MMP kod oboljelih od MS, a te razine koreliraju s aktivnosti bolesti.

Mijelin bazični protein i njegovi fragmenti nađeni su u velikim koncentracijama u likvoru pacijenata s relapsom te sugerira na progresiju bolesti.

Adhezijska molekula neuronske stanice (engl. *neuronal cell adhesion molecule*, *N-CAM*) smatra se biomarkerom popravka i remijelinacije. Utvrđeno je da su koncentracije N-CAM-a niže tijekom relapsa, a potom se postupno povećavaju i dobro koreliraju s remisijom.

Osteopontin je fosfoprotein koji proizvodi makrofag, što povećava razinu IFN- $\gamma$  i IL-12 i smanjuje razinu neuroprotektivnog IL-10. Razina osteopontina u serumu i likvoru povećana je tijekom relapsa MS.

Fetuin-A je kalcijem regulirani glikoprotein. Uočene su njegove visoke koncentracije u aktivnim demijelinizirajućim lezijama te nam na taj način daje informacije o aktivnosti bolesti i sugerira na relaps. Čini se da fetuin-A antagonizira protuupalni TGF- $\beta$ 1.

C-X-C kemokin-13 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand*, *CXCL13*) jedan je od najmoćnijih kemoatraktanata B stanica te ih mobilizira prema aktivnim demijelinizacijskim lezijama. Povećane razine CXCL13 u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata s MS-om su izmjerene u usporedbi sa zdravim kontrolama. Pokazana je povezanost povišenih razina CXCL13 s aktivnošću bolesti.

Vaskularni endotelni faktor rasta A (engl. *vascular endothelial growth factor A*, *VEGF-A*) je faktor angiogeneze s neuroprotektivnim svojstvima. VEGF-A mogao bi poslužiti kao biomarker progresije od RRMS do SPMS jer je uočen pad koncentracije prilikom progresije.

Mikrotubuli predstavljaju glavnu strukturnu komponentu citoskeleta, koja se sastoji od dvije podjedinice, A- i B-tubulina. Usko su povezani s tau proteinom i mikrofilamentima,



osobito aktinom. Povišene vrijednosti tubulina i aktina u likvoru zabilježene su u progresivnim oblicima bolesti, što dobro korelira s invaliditetom.

Tau je protein citoskeleta čija je osnovna uloga stabilizacija mikrotubula. Zabilježene su visoke razine tau proteina u likvoru u bolesnika s MS-om. Istodobno povišenje vrijednosti Tau i NF-H u likvoru kod bolesnika s CIS-om ima prediktivnu vrijednost konverzije u MS.

Zabilježene su niske razine neurotrofnog moždanog čimbenika (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, *BDNF*) prilikom progresije bolesti, demijelinizacije i aksonalnog oštećenja, a više razine metaloproteinaza u serumu i likvoru kod oboljelih od MS, a pogotovo tijekom relapsa.

Također visoke razine kapa slobodnih lakih lanaca koje su detektirane kod oboljelih od MS, smatraju se visoko predvidljivim za konverziju CIS-a u MS te koreliraju sa stupnjem invaliditeta, dok su razine vitamina D u neliječenih pacijenata s MS-om u obrnutoj korelaciji s aktivnošću bolesti-manja koncentracija vitamina D, veća je mogućnost od relapsa. Više koncentracije dušikovog oksida i njegovih metabolita u likvoru povezane su s većom mogućnosti od napredovanja invaliditeta te duljim trajanjem relapsa.

Glijalni fibrilarni kiselinski protein prema izmjeranim vrijednostima u likvoru dobro korelira s progresijom invaliditeta. Prisutnost Nogo-A u likvoru bolesnika s MS-om predstavlja loš prognostički marker aksonalnog popravka te su otkrivene i smanjene vrijednosti N-acetilaspargata u lezijama, a smanjenje likvorskog N-acetilaspargata korelira s progresijom invaliditeta. (Toscano i Patti, 2021; Lo Sasso i sur., 2019; Ziemssen i sur., 2019; Katsavos i Anagnostouli, 2013)

#### **4.2.4. Biomarkeri terapijskog odgovora**

Za personalizirano liječenje MS, biomarkeri odgovora na terapiju mogli bi biti korisni za razlikovanje pacijenata s obzirom na njihov ishod povezan s učinkovitošću i nuspojavama (oni koji su odgovorili na terapiju i oni koji nisu odgovorili, kao i bolesnici sa i bez nuspojava na lijekove). Biomarkeri odgovora na liječenje mogu se primijeniti na sve tretmane ili biti specifični samo za određeni tretman. Zahvaljujući progresivnom rasvjetljavanju patofiziologije MS, sada su dostupni brojni načini liječenja koji mijenjaju tijek bolesti sa specifičnim mehanizmima djelovanja. Međutim, ne reagiraju svi pacijenti jednako na liječenje. Kako bi se svaki pacijent mogao liječiti individualno optimiziranim liječenjem MS u pravo vrijeme, potrebno je poznavati biomarkere za predviđanje terapijskog odgovora i praćenje njegove učinkovitosti.

Neutralizirajuća antitijela mogu se stvoriti kao odgovor na primjenu uglavnom proteinskih lijekova i spriječiti njihov stvarni mehanizam djelovanja. Takva antitijela su otkrivena u serumu. U terapiji interferonom- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), neutralizirajuća antitijela proizvode se u do 40% pacijenata, ovisno o vrsti IFN-a. To se obično događa tijekom prve 2 godine liječenja. Pokazalo se da neutralizirajuća antitijela protiv IFN- $\beta$  smanjuju njegov pozitivan učinak na godišnju stopu recidiva, progresiju invaliditeta i aktivnost MR. Stoga se preporučuje promjena terapije u roku od 3 do 6 mjeseci ako se dobiju dva pozitivna rezultata testa. Stoga, neutralizirajuća antitijela protiv IFN- $\beta$  predstavljaju prognostički biomarker za loš odgovor na terapiju.

Neutralizirajuća antitijela mogu se također formirati tijekom terapije s natalizumabom, monoklonskim antitijelom protiv integrina na leukocitima. U prosjeku u 6 % pacijenata liječenih natalizumabom neutralizirajuća se antitijela otkrivaju barem jednom. U > 90 % slučajeva to se događa tijekom prva tri mjeseca liječenja. Neutralizirajuća antitijela snižavaju serumsku razinu natalizumaba te su povezana sa smanjenom učinkovitošću terapije.

Biomarkeri koji pokazuju korelaciju s aktivnošću bolesti u pacijenata s RRMS-om mogu pružiti važne indikacije za terapijski odgovor. Budući da je oslobađanje NFL-a povezano s nastankom oštećenja aksona i NFL-a, koncentracija korelira s aktivnošću bolesti, protein bi mogao biti takav biomarker za terapijski odgovor. Nekoliko je studija već pokazalo prosječno smanjenje količine NFL-a u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata s MS-om nakon liječenja natalizumabom, fingolimodom, mitoksantronom ili rituksimabom ili alemtuzumabom.

Prema studijama, pacijenti na terapiji s natalizumabom imali su niže vrijednosti CXCL13 od pacijenata koji su primali terapiju IFN- $\beta$ . Druga studija također je navela smanjenje razine CXCL13 nakon konverzije iz IFN- $\beta$ , glatiramer acetata ili teriflunomida u fingolimod. Prema tim rezultatima, CXCL13 bi mogao biti prikladan biomarker za učinkovitost terapija kod MS.

Kao biomarkeri terapijskog odgovora potencijal pokazuju i vitamin D te BDNF. Koncentracija vitamina D je povećana kod pacijenata koji dobro reagiraju na terapiju s IFN- $\beta$ , dok je razina BDNF-a u likvoru povećana kod onih koji dobro reagiraju na glatiramer-acetat. MMP pokazuju terapijski odgovor na IFN- $\beta$  tako što se koncentracija smanjuje. Lipokalin 2 i fetuin-A su kod osoba koje dobro reagiraju na natalizumab u likvoru sniženi, a kod dobre reakcije na terapiju s metilprednizolonom koncentracija mijelin bazičnog proteina u likvoru se smanjuje. Lijekovi iz skupine DMD povećavaju razinu N-CAM-a, dok fingolimod ne. Razine ekspresije slobodnog  $\alpha 4$  integrina na perifernim mononuklearnim krvnim stanicama mogu poslužiti kao biomarker terapijske učinkovitosti natalizumaba te biomarker rizika za

progresivnu multifokalnu leukoencefalopatiju. Pozitivna MRZ reakcija ukazuje na primarno imunološki odgovor posredstvom B-stanica, vodeći terapijski izbor prema relevantnom imunomodulacijskom sredstvu. (Toscano i Patti, 2021; Ziemssen i sur., 2019; Katsavos i Anagnostouli, 2013)

#### **4.2.5. Metode detekcije biomarkera**

Detekcija biomarkera u tjelesnim tekućinama, poput krvi, urina i likvora, važna je za ranu dijagnozu. Poteškoće u postojećim tehnologijama za otkrivanje biomarkera, dovode do toga da se potencijal pojedinih biomarkera ne istražuje potpuno. Biomarkeri su često prisutni u vrlo niskim koncentracijama, pomiješani s raznim drugim tvarima što otežava njihovu identifikaciju. U mnogim slučajevima je otkrivanje biomarkera u vrlo niskim koncentracijama teško i vremenski zahtjevno. Kako bi određeni biomarker mogao pronaći svoju svrhu u kliničkoj praksi, važno je imati dobru metodu za njegovu detekciju. Cilj znanstvenika na području otkrivanja biomarkera je razviti pouzdanu, isplativu metodu za otkrivanje biomarkera za prognozu, dijagnozu i praćenje određene bolesti. Nadalje, biomarkeri se također mogu koristiti za nadziranje tijeka liječenja praćenjem smanjenja/povećanja njegove koncentracije. Idealna dijagnostička metoda trebala bi omogućiti da se biomarker specifično, osjetljivo, jednoznačno i ekonomski povoljno odredi kad pacijenti dolaze na redovne kontrole. Ostvaren je ogroman napredak na području tehnologija za detekciju biomarkera te su razvijene različite metode otkrivanja biomarkera. (Nourian, 2021; Nimse i sur., 2016)

Metode koje se koriste prilikom detekcije biomarkera za MS su: ELISA, imunofluorescencija, protočna citometrija, PCR, nefelometrija, Western blot, izoelektrično fokusiranje.

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) je najčešća metoda za dokazivanje specifičnih topljivih proteina u plazmi. Postoje brojni komercijalno dostupni setovi za detekciju različitih proteina od interesa, a prema protokolima standardizacije, testovi se lako mogu ponoviti u različitim laboratorijima. Nedostaci su relativno niska osjetljivost i visoka cijena. Ova enzimoimunokemijska metoda temelji se na reakciji antigen-antitijela. Izvođenje ELISA metode zahtijeva uporabu barem jednog specifičnog antitijela usmjerenog na antigen koji se istražuje, a provodi se na standardiziranim mikrotitarskim pločicama s jažicama. Koristi se za dokazivanje proteinskih biomarkera MS.

Imunofluorescencija kao metoda ima općenito mnogo širi potencijal od ELISA-e. Može detektirati proteine, peptide, haptene i antitijela s mnogo većom osjetljivošću. Tehnike

imunofluorescencije koriste afinitet određenog antitijela prema njegovom epitopu, a ta antitijela usmjerena na analit obilježena su fluorescentnim bojama, fluorokromima. Imunofluorescencijski testovi pokazuju visoku osjetljivost, detektirajući analite u vrlo malim koncentracijama. Poput ELISA-e, ova je tehnika visoko ponovljiva i dostupna u različitim laboratorijima.

Protočna citometrija relativno je jednostavna i reproducibilna metoda za proučavanje staničnih subpopulacija u uzorcima. Simultano određuje i analizira fizikalna svojstva pojedinih čestica, uglavnom stanica. Potrebno je pripremiti uzorak prije same analize na protočnom citometru, što znači da se stanice u imunokemijskoj reakciji obilježavaju jednim ili više fluorescentnih obilježivača, tj. sa specifičnim antitijelima za pojedinu skupinu ili podskupinu stanica. Potom se suspenzija tako obilježenih stanica analizira na protočnom citometru na način da stanice prolaze jedna po jedna kroz usku kapilaru. Glavni nedostatak ove metoda je da rukovanje uzorkom može utjecati na rezultate (vrijeme od prikupljanja uzorka do obrade, postupci odvajanja, zamrzavanje) kao i kvaliteta samog uzorka (prisutnost ugruška, mjehurića). Nadalje, metoda zahtijeva specijaliziranu i skupu opremu. Ovom metodom može se detektirati npr.  $\alpha 4$  integrin.

Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction, PCR*) može pouzdano otkriti segment DNA molekule. Bitne komponente metode su početnice (kratki fragmenti DNA, sljedovi komplementarni ciljnom području koji želimo detektirati) i DNA polimeraza koja provodi sintezu novih DNA lanaca. Osnova metode PCR-a je opetovano umnažanje određenog segmenta DNA pomoću DNA polimeraze. Broj DNA molekula eksponencijalno se povećava te je iz malog broja kopija molekula kalupa koje su prisutne na početku reakcije moguće napraviti veliku količinu DNA. Međutim, kako bi bile korisne za otkrivanje markera, tehnike moraju biti kvantitativne, a to je upravo PCR u stvarnom vremenu (npr. Taqman metoda). Smatra se da PCR u stvarnom vremenu ima potencijal za široku uporabu u kliničkim ispitivanjima, zbog svoje relativne metodološke jednostavnosti, ponovljivosti i specifičnosti. PCR-om se mogu detektirati HLA polimorfizmi koji su faktori rizika za MS.

Nefelometrija je metoda procjene koncentracije analita u različitim tjelesnim tekućinama. Tekući uzorak obasjava svjetlost pod određenim kutom, a nakon toga se procjenjuje stupanj rasipanja svjetlosti. Tehnike nefelometrije naširoko se primjenjuju, pouzdano reproduciraju mnogi različiti laboratoriji.

Western blot je metoda koja se primjenjuje za određivanje važnih obilježja proteinskih antigena, od identifikacije do određivanja molekularne mase antigena. Metoda se sastoji od nekoliko koraka: pripreme uzorka, elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, prijenosa proteina

na membranu, blokiranja nespecifičnog vezanja, imunokemijske reakcije sa specifičnim protutijelima i detekcija. Obilježivač detekcijskog protutijela (monoklonskog ili poliklonskog) je enzim koji pretvara topljivi supstrat u obojeni produkt, fluorescentni precipitat ili kemiluminiscentni spoj.

Izoelektrično fokusiranje je metoda koja koristi fenomen različite izoelektrične točke (pI) između različitih molekula, kako bi ih razdvojila. U tu se svrhu koriste akrilamidni gelovi s gradijentom pH. Primjenjuje se za odvajanje smjese proteina pa tako i imunoglobulina. Referentna je metoda za otkrivanje oligoklonskih imunoglobulina u likvoru za dijagnozu MS. Nakon izoelektričnog fokusiranja slijedi imunofiksacija. Antiserum se prelije preko gela što omogućuje vezanje proteina i njegovog specifičnog antitijela. Neprecipitirani proteini se isperu sa gela, a precipitirani proteini oboje kako bi postali vidljivi. (Dodig, 2015; Katsavos i Anagnostouli, 2013; Bielekova i Martin, 2004)

### **4.3. Potencijalno nove dijagnostičke mogućnosti za multiplu sklerozu**

Kako bi se unaprijedila dijagnostika MS, a samim time i terapija te kvaliteta života oboljelih, novi biomarkeri MS od velikog su znanstvenog interesa. Intenzivno se istražuju novi potencijalni biomarkeri koji će omogućiti što raniju i bolju diferencijalnu dijagnostiku, točnije otkrivanje stadija bolesti, praćenje terapije te predviđanje ishoda bolesti. Svoju primjenu u dijagnostici MS u novije vrijeme pronašle su i slobodna cirkulirajuća DNA te mikroRNA, a njihov se dijagnostički potencijal i dalje pomno istražuje.

Razvoj nove tehnologije i novih metoda širi vidike znanstvenicima i daje u uvid dosad nepoznate činjenice. Metoda sekvenciranja nove generacije razvila se izuzetno brzo, a omogućila je otkrivanje dosad nepoznate genske podloge MS te uvid u potencijalno nove biomarkere. Pomoću nje se pokušava razriješiti individualizirana terapija, terapija koja će za bolesnike biti najpogodnija i najdjelotvornija, a izazivati najmanje nuspojava.

#### **4.3.1. Slobodna cirkulirajuća DNA**

Slobodna cirkulirajuća DNA (engl. *cell-free DNA*, *cfDNA*) od svog otkrića pa sve do danas zanimljiv je predmet istraživanja. Njena primjena u kliničke svrhe svakim danom sve više raste. Brzi razvoj molekularnih tehnika podupire istraživanje cfDNA kao neinvazivnu dijagnostiku poboljšavajući praćenje bolesti, kliničku odluku te ishod bolesti, a može se naći u različitim tjelesnim tekućinama, pa tako i u lako dostupnom serumu kod zdravih i kod nezdravih

ispitanika. cfDNA našla je svoju veliku primjenu u prenatalnoj dijagnostici i onkologiji, no interes za njenu primjenu ne staje, već se širi pa je tako cfDNA pronašla svoju potencijalnu primjenu kod autoimune bolesti, MS. CfDNA predstavlja relevantno neinvazivno sredstvo za personaliziranu medicinu.

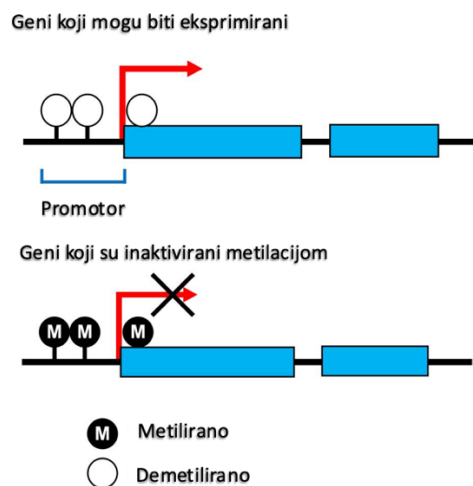
Svojstva cfDNA upućuju na to da je njeno porijeklo povezano s mehanizmima stanične smrti. cfDNA je dvolančana i visokofragmentirana. Veličine je 150 bp, a to odgovara veličini nukleosoma, osnovne organizacijske jedinice DNA molekule u jezgri, odnosno veličini fragmenta otpuštenih iz stanice nakon apoptoze. (Mondelo-Macía i sur.,2021; Ranucci, 2019; Volik i sur., 2016)

#### **4.3.1.1. cfDNA kao biomarker multiple skleroze**

Korištenjem novih tehnologija, uspješno su identificirane i kvantificirane jedinstvene sekvence cfDNA u krvi pacijenata s multiplom sklerozom. Najčešći oblik multiple skleroze, RRMS praćena je jedinstvenim otiskom specifičnih DNA sekvenci koje pružaju značajnu kliničku osjetljivost i specifičnost, a mogu se detektirati preko cfDNA. Kodirajući geni koji su različito zastupljeni u serumu oboljelih od MS kodiraju citoskeletne proteine, regulatore rasta izražene u mozgu i receptore uključene u transdukciju signala živčanog sustava. Kodirajući geni razlikuju RRMS u njenoj aktivnosti i mogu razlikovati pacijente u relapsu i remisiji, dok nekoliko ponavljajućih sekvenci, poput dugih raspršenih elemenata (engl. *long interspersed nuclear element, LINE*), razlikuju se kod svih pacijenata s multiplom sklerozom u odnosu na zdrave pojedince. Ovi podaci pokazuju da su sekvence cfDNA, uočene u serumu oboljelih, karakteristične za RRMS te aktivnost bolesti i pokazuju potencijal kao novi klinički biomarker za dijagnozu, praćenje odgovora pacijenata na terapiju i aktivnosti bolesti, a pogodan je kao takav jer je uzorak serum pacijenta. Laboratorijski testovi koji se temelje na serumu uvelike bi smanjili troškove medicinske njege i pružili jednostavnu laboratorijsku analizu aktivnosti bolesti i praćenja terapije, a uz odgovarajuću validaciju pokazuju potencijalnu mogućnost da zamijene MRI. Podaci koji se mogu dobiti iz cfDNA, također ukazuju na to da bi proučavanje cfDNA moglo imati primjenu i u rješavanju patogeneze multiple skleroze. (Beck i sur., 2010, Dunaeva M, 2018)

#### 4.3.1.2. Obrazac metilacije cfDNA kao biomarker dijagnoze i kliničkog stanja u relapsno-remitentnoj multiplo sklerozi

Promjene metilacije DNA povezane s bolestima nedavno su dobile na značaju za razvoj biomarkera. Metiliranje DNA je mehanizam koji kontrolira transkripciju u eukariotima tako što je potiskuje, a događa se pretežno na CpG dinukleotidima. Citozin koji prethodi gvaninu se modificira dodatkom metilne skupine (Slika 8.). (Dunaeva i sur., 2018; Cooper i Hausman, 2010)



Slika 8. Metilacija DNA molekule, preuzeto i prilagođeno iz: [www.ncc.go.jp](http://www.ncc.go.jp)

Abnormalna DNA metilacija i ekspresija gena povezana je s različitim bolestima. cfDNA privlači pozornost kao biomarker zbog svoje lake dostupnosti, a opet i zbog dijagnostičke vrijednosti te također omogućuje analizu obrasca metilacije. S obzirom na činjenice da je multipla skleroza bolest imunološke aktivacije, upale središnjeg živčanog sustava, ozljede oligodendrocita i neurona te glioze, može se pretpostaviti da bolest može izazvati promjene u metilaciji cfDNA. Upravo ta hipoteza je i potvrđena analizom metilacije cfDNA kod pacijenata s RRMS-om u remisiji, pacijenata s RRMS-om u relapsu te kod zdravih pojedinaca te su pronađeni specifični metilirani obrasci. Također, uviđeno je da se u uzorcima od pacijenata s multiplo sklerozom cfDNA nalazi u nekoliko puta većoj koncentraciji u odnosu na kontrolnu skupinu. Povišena koncentracija i specifični obrasci metilacije cfDNA u pacijenata s RRMS-om vjerojatno su povezani s procesom bolesti i s njima povezanom prekomjernom imunološkom aktivacijom, upalom i staničnom smrću.

cfDNA obrasci metilacije bili su ispitivani i uspoređeni kod kontrolne grupe i oboljelih od RRMS-om u remisiji te je identificirano tri obrasca metilacije koji su se pokazali specifični za bolest i stanje. Upravo prema obrascu metilacije cfDNA mogu se diskriminirati pacijenti koji boluju od RRMS i zdravi pojedinci, isto kao i pacijenti s RRMS-om koji se trenutno nalaze u remisiji i relapsu. Petnaest gena promotora bilo je identificirano kao geni promotori od interesa koji se razlikuju u metilaciji kod kontrolne grupe i oboljelih od RMMS u remisiji, dok se kod usporedbe kontrolne grupe i oboljelih od RRMS u relapsu identificiralo 14 gena promotora koji su drugačije metilirani. Također, uspoređen je metilacijski obrazac između oboljelih od RMMS u relapsu i remisiji te je pronađeno 5 gena promotora od interesa, a te razlike u cfDNA između pacijenata u remisiji i relapsu mogu odražavati različite stanične događaje i dinamičke pomake između upale, ozljede stanica ili popravka tkiva.

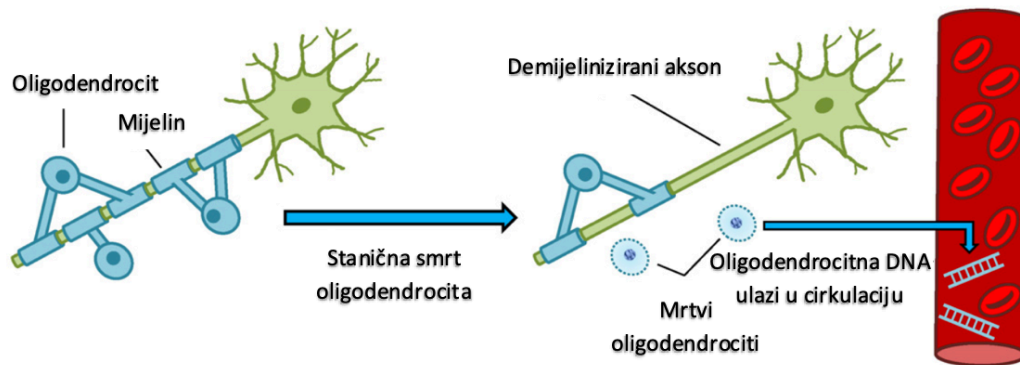
S obzirom na to da ne postoje posebni obrasci metilacije vezani za spol, dob i rasu, uočene razlike su uglavnom, ako ne i isključivo, u korelaciji s procesom bolesti. Stoga je dokazano da pacijenti s RRMS-om pokazuju jedinstvene profile metilacije cfDNA koji se mogu koristiti za razvoj novih klinički važnih biomarkera za bolest. cfDNA nudi mogućnosti kao neinvazivan dijagnostički biomarker RRMS te se smatra kako bi se mogao razviti i u prediktivni biomarker relapsa i kako bi cfDNA mogla biti korisna za procjenu učinkovitosti terapije te individualizaciju liječenja pacijenata. Općenito, čini se da je metilacija DNA obećavajuća alternativa za ranu dijagnozu i praćenje MS, ali i drugih autoimunih bolesti. Korištenje analize epigenetike preko cfDNA, dalje naznake personalizirane medicine u budućnosti. Potrebne su studije za daljnju karakterizaciju povezanosti statusa metilacije cfDNA i multiple skleroze. (Mondelo-Macía i sur.,2021; Dunaeva i sur., 2018; Liggett i sur., 2010)

#### **4.3.1.3. cfDNA kao biomarker gubitka oligodendrocita**

Stanice koje proizvode mijelin u središnjem živčanom sustavu, oligodendrociti (engl. *oligodendrocytes*, *ODC*) umiru od autoimunskog odgovora koji rezultira demijeliniziranim lezijama. Demijelinizirane lezije mogu se vizualizirati MRI, međutim, ovaj je postupak skup i ne može otkriti difuznu ili blagu degeneraciju mijelina niti mjeriti aktivni gubitak ODC-a. Mali mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (engl. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*, *MOG*) je protein specifičan za središnji živčani sustav i koji se eksprimira samo pomoću ODC-a kao sastavni dio mijelina - ODC se smatraju jedinim izvorom MOG proteina u mozgu. Kako ODC umiru zbog autoimunskog odgovora, otpuštaju svoju genomsku DNA koja ulazi u cirkulaciju što je i prikazano na slici 9.. Upravo zbog tih činjenica, istraživani su obrasci metilacije gena



MOG, koji je izražen prvenstveno u ODC. Specifičnost MOG-a u ODC-ima sugerira da MOG gen može imati jedinstvene obrasce metilacije u ODC-ima, koji se mogu koristiti za otkrivanje DNA porijeklom upravo iz ODC-a u krvi i procjenu aktivnosti bolesti u pacijenata s MS-om. (Olsen i sur. 2016)



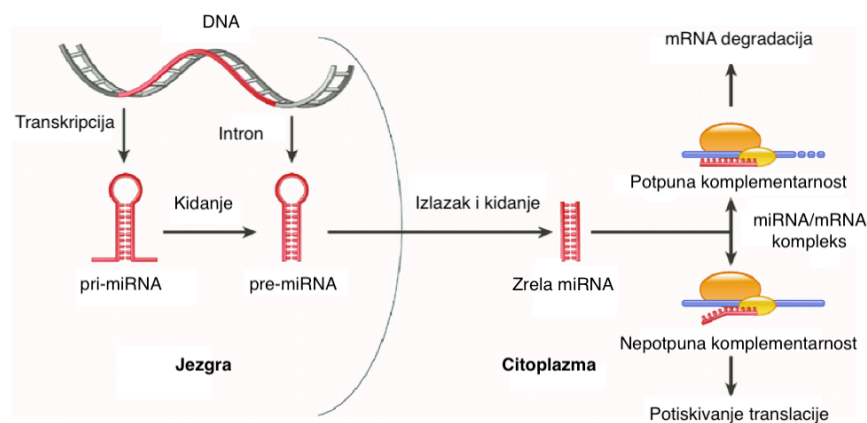
Slika 9. Oligodendrociti koji proizvode mijelin umiru i otpuštaju genomsku DNA u cirkulaciju, preuzeto i prilagođeno iz: Olsen i sur., 2016.

Istraživanja su pokazala kako MOG gen porijeklom iz DNA ODC-a zaista pokazuje jedinstveni obrazac metilacije u SŽS-u. Kako je demetilacija gena MOG jedinstvena za ODC, u usporedbi s drugim vrstama stanica SŽS-a, Schwannovim stanicama i perifernim tkivima, te razlike u metilaciji mogu se koristiti kao biomarker gubitka ODC-a. Također, uviđeno je kako su razine cfDNA ODC-a s demetiliranim MOG genom povećane u pacijenata s RRMS u relapsu u usporedbi s osobama u remisiji i zdravim pojedincima Ovi podaci pokazali su korisnost cfDNA za otkrivanje aktivne faze bolesti.

Biomarker sposoban za mjerenje gubitka ODC-a može unaprijediti sposobnost dijagnosticiranja progresije MS-a zajedno s trenutnim tehnikama snimanja magnetnom rezonancom, omogućiti bolju prognozu bolesti i modeliranje gubitka ODC-stanica te za mjerenje kliničke učinkovitosti novih terapijskih sredstava. Diferencijalno metilirani MOG gen u cfDNA pokazuje veliki potencijal kao minimalno invazivni biomarker gubitka ODC-a u RRMS-u te je također pokazana korelacija s aktivnošću bolesti. Prikupljanje cfDNA je isplativ, minimalno invazivan postupak koji se može primijeniti za dijagnosticiranje, prognozu i praćenje učinkovitosti liječenja. (Olsen i sur. 2016)

### 4.3.2. MikroRNA

MikroRNA je kratka nekodirajuća RNA koja regulira ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini vezanjem na komplementarne sekvence na 3' ili 5' UTR (engl. *untranslated region*) što obično rezultira translacijskom represijom ili degradacijom mRNA koja dovodi do smanjenja količine proteina. Biosinteza miRNA sastoji se od niza koraka koji počinju u jezgri i završavaju u citoplazmi. Funkcija i biosinteza miRNA pokzane su na slici10.. Osim što postoje unutar stanice, miRNA su otkrivene u nekoliko tjelesnih tekućina, uključujući plazmu, serum, cerebrospinalnu tekućinu, majčino mlijeko, urin, suze, spermu i sline. U izvanstaničnom odjeljku završavaju kao posljedica stanične smrti (apoptoze ili nekroze) ili ozljede. Izvanstanična miRNA nije samo ostatak mrtvih stanica. Utvrđeno je da izvanstanična miRNA obavlja širok spektar funkcija, poput prijenosa signala između stanica, moduliranja procesa uključenih u angiogenezu, neurogenezu, proliferaciju, apoptozu.



Slika 10. Biosinteza i funkcija mikroRNA, preuzeto i prilagođeno iz: Andreasen, 2018.

Disregulirana ekspresija miRNA povezana je s pojavom bolesti kao što su imunološke bolesti, neurološke bolesti, kardiovaskularne bolesti i rak. Promjene u sastavu i koncentraciji miRNA u izvanstaničnom odjeljku u mnogim su slučajevima povezane s patološkim procesima koji se odvijaju u tijelu, što im može omogućiti da se u nekim slučajevima koriste kao biološki biljezi aktivnosti bolesti. miRNA su vrlo stabilne u krvi, otporne su na cirkulirajuće ribonukleaze i teška stanja poput produženog skladištenja, smrzavanje-odmrzavanje i ekstremni pH zbog njihovog pakiranja u lipidne vezikule kao što su egzosomi, vezanje za protein koji veže RNA i povezanost s lipoproteinom visoke gustoće. Njihova stabilnost, zajedno s razvojem osjetljivih metoda detekcije i kvantifikacija čine ih idealnim kandidatima za novu klasu

neinvazivnih, osjetljivih biomarkera. (Piotrkowska i sur., 2021; Kacperska i sur., 2016; Gandhi, 2015)

#### **4.3.2.1. miRNA kao biomarker multiple skleroze**

S obzirom na visoku stabilnost miRNA u izvanstaničnom odjeljku (plazmi), njihovu specifičnost za tkiva i jake povezanosti s patološkim procesima koji su u osnovi multiple skleroze, čini se da je ova mala molekula dobra meta za istraživače koji pokušavaju otkriti nove biljege bolesti. MiRNA u imunološkom sustavu djeluje uglavnom reguliranjem transkripcijskih faktora, proapoptotičnog proteina i gotovo svakog elementa kaskade transdukcije signala. Određene miRNA uključene su u poticanje akutne upalne reakcije reguliranjem proizvodnje antitijela i oslobađanjem medijatora upale. Štoviše, miRNA modificiraju transkripte za proteine uključene u remijelinizaciju, neurogenezu i gliogenezu.

Određivanje točnog profila ekspresije miRNA u MS i njegova korelacija s profilom gena može dovesti do otkrića novih patofizioloških procesa. Pokazivanje da promjene u sastavu i koncentraciji izvanstanične miRNA mogu u nekim slučajevima biti u korelaciji s određenim aspektima osnovne bolesti (poput stadija bolesti), što bi moglo dovesti do njihove uporabe kao biomarkera MS-a. Otkrivanje karakterističnog profila ekspresije miRNA moglo bi biti od ključne važnosti u ranoj dijagnozi MS-a te profili ekspresije mogu biti karakteristični za određeni tijek bolesti. Brojne studije temeljene na miRNA provedene su u pacijenata s MS-om kako bismo procijenili njihov potencijal kao biomarkera te je utvrđeno kako njihov profil ekspresije varira. Prema profilu ekspresije pojedinih miRNA moguće je utvrditi razliku između zdravih pojedinaca i osoba koje boluju od MS, pacijenta u remisiji i relapsu te razliku između relapsno-remitentne MS i progresivne MS, a također se promjena ekspresije miRNA zamjećuje i prilikom odgovora na terapiju.

Primijećena su i ograničenja u studijama, potencijalno zbog nedostatka pouzdane platforme za testiranje, malog broja pacijenata i nedostatka snažne validacije. Kako bi se razvio biomarker temeljen na miRNA za MS ili bilo koju drugu bolest, najvažniji preduvjet je sposobnost kvantificiranja miRNA. Zbog niske koncentracije miRNA u tjelesnim tekućinama, njihova kvantifikacija je izazovna. Osim toga, kvantificiranje miRNA u serumu/plazmi može se promijeniti kontaminacijom miRNA koje su izašle iz staničnih komponenti krvi, bilo putem hemolize tijekom uzorkovanja, obrade ili prijenosom cijelih stanica u serumu/plazmi. Svi ti čimbenici predstavljaju veliki problem u pronalaženju pouzdanih i sigurnih miRNA.

Trenutno postoji mnogo miRNA kao potencijalnih markera neuroinflamacije i neurodegeneracije, ali su poželjne daljnje studije kako bi se potvrdili ti biomarkeri kao korisni alati u kliničkoj primjeni. Analiza disregulacije razine miRNA i rezultirajućih promjena razine ekspresije ciljne mRNA/proteina mogla bi pridonijeti boljem razumijevanju etiologije multiple skleroze, kao i novih alternativnih metoda dijagnoze i liječenja ove bolesti. Uočeno je da se kod multiple skleroze profil miRNA mijenja unutar SŽS-a i imunološkog sustava, što rezultira promijenjenim razinama ekspresije gena u mnogim tipovima stanica uključenih u bolest. Uočena je i uloga miRNA u regulaciji razine ekspresije neuroprotektivnih proteina, uključujući neurotrofine, proteine toplinskog šoka i sirtuine, u razvoju multiple skleroze. Istraživanja sugeriraju da razine pomno odabranih miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi mogu poslužiti kao biomarkeri upale i neurodegenerativnih procesa u bolesnika s multiplom sklerozom. Potrebna su daljnja istraživanja i rješavanje ograničenja. Međutim, dosadašnje studije ukazuju na to da miRNA imaju ulogu u budućnosti biomarkera MS-a. (Pietrasik i sur., 2021; Piotrkowska i sur., 2021; Kacperska i sur., 2016; Gandhi, 2015)

#### **4.3.3. Sekvenciranje nove generacije**

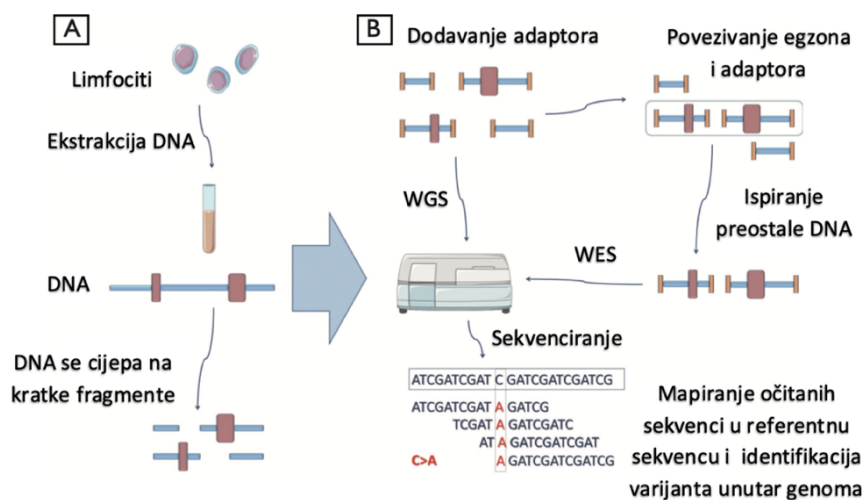
Prve metode DNA sekvenciranja bile su Maxam-Gilbertova metoda i Sangerova dideoksi metoda. Maxam-Gilbert metoda temelji se na kemijskoj modifikaciji DNA i kasnijem kidanju DNA okosnice na točno određenim mjestima uz modificirane nukleotide što generira niz fragmenata koje se razlikuju za jedan nukleotid. Sangerovo sekvenciranje koristi specifične nukleotide (dideoksi nukleotide) kojima nedostaje 3'-OH skupina. Stoga, kada su takvi nukleotidi ugrađeni DNA polimeraza ne može stvoriti fosfodietersku vezu, što rezultira prekidom rastućeg lanca DNA na tom mjestu. Sangerova dideoksi metoda sekvenciranja ubrzo je postala standard za sekvenciranje.

Potreba za sekvenciranjem velikih genoma po nižim cijenama pokrenula je razvoj mnogih tehnologija nove generacije. Sekvenciranje nove generacije (engl. *next generation sequencing*, *NGS*) brzo se razvilo, a nove metode se stalno komercijaliziraju. To su visokoprotočne tehnologije sekvenciranja, koje paralelnim sekvenciranjem omogućuju stvaranje milijuna sekvenci odjednom te su zazvane još i masivno paralelne metode sekvenciranja. Napredak u razvoju tehnika sekvenciranja doveo je do sve veće primjene NGS-a te omogućio bolje razumijevanje prirode mnogih bolesti i unaprijedio mogućnosti njihovog liječenja. Na prvi pogled, ove nove metode mogu se činiti skupima, ali reakcije se odvijaju paralelno često u količinama nanolitara, pikolitara ili zeptolitara u malim komorama, pa je stoga

cijena po paru baza nominalna. Brojne su prednosti NGS tehnologije, a prije svega mogućnost istovremene analize golemog broja uzoraka, kojom je omogućeno masivno paralelo sekvenciranje ogromnog broja ciljnih regija gena i otkrivanje višestrukih mutacija u istoj analizi. Još jedna značajna prednost očituje se u skraćenom vremenu analize te u znatno manjoj količini DNA/RNA potrebne za reakciju.

Cjelogenomsko sekvenciranje (engl. *whole genome sequencing, WGS*) uključuje analizu varijacija u pojedinačnom nukleotidu i razlika broja kopija u svim parovima baza DNA, dok cjeloegzomsko sekvenciranje (engl. *whole exome sequencing, WES*) se koristi za analize mutacija i razlika u broju kopija prepisanih eksona. (Sertić i sur. 2018; Slatko i sur., 2016)

Glavni koraci u NGS-u su priprema uzorka, sekvenciranje i analiza podataka (Slika 11.). Genomska DNA ekstrahirana i pocijepana na kratke fragmente dužine otprilike 350 baznih parova. Svakom fragmentu dodaje se adaptor koji omogućuje hibridizaciju svakog fragmenta. WES nastavlja hibridiziranjem fragmenata sa sondama koje su komplementarne sa svim egzonima u genomu, koji se zatim povezuju dok se preostala DNA ispire. Kod WGS-a nisu potrebni dodatni koraci nakon dodavanja adaptera i knjižnica je u tom trenutku spremna za sekvenciranje. Nakon što su rezultati WES-a ili WGS-a dostupni, milijuni kratkih očitanih sekvenci točno se mapiraju u referentnu sekvencu genoma, a varijante unutar genoma se identificiraju. (Sun i sur., 2021; Jiang i sur., 2014)



Slika 11. Pojednostavljeni prikaz sekvenciranja nove generacije. A - priprema uzorka.

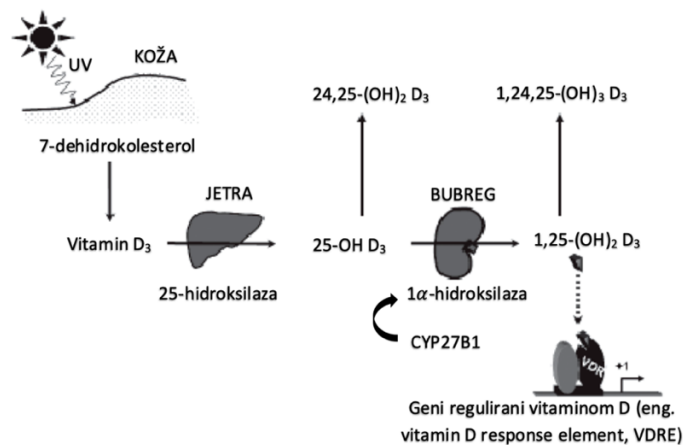
B - sekvenciranje i analiza podataka; preuzeto i prilagođeno iz: Jiang i sur., 2014.

#### 4.3.3.1. NGS kao nova metoda u dijagnostici i istraživanju multiple skleroze

Brojne neurološke bolesti imaju utvrđene dokaze o genskom doprinosu za razvitak bolesti. Genetički čimbenici rizika koji su u osnovi mnogih rijetkih i uobičajenih neuroloških bolesti ostaju slabo razumljivi zbog multifaktorske i heterogene prirode ovih poremećaja baš kao i MS. Iako su svegenomske studije povezanosti (engl. *genome-wide association study*, *GWAS*) uspješno otkrile brojne gene koji su povezani za različite bolesti, omjeri vjerojatnosti povezani s alelima rizika općenito su niski i predstavljaju samo mali dio procijenjene nasljednosti. Ovi rezultati ukazuju na to da postoje rijetki geni (prisutni u < 5 % populacije) koji obično imaju veliki učinak i ne mogu se uhvatiti GWAS-om. Uz sve niže cijene tehnologije NGS-a, WGS-a i WES-a, omogućila se brza identifikacija rijetkih varijanti s velikim učinkom na razvitak bolesti, što je učinilo ogroman napredak u razumijevanju osnove mnogih mendelskih neuroloških stanja, kao i složenih neuroloških bolesti. MS je prikladna za oba pristupa: sporadični slučajevi mogu se okarakterizirati GWAS-om, dok slučajevi koji predstavljaju pozitivnu obiteljsku anamnezu, snažno upućujući na mendelski oblik bolesti, dobri su kandidati za studije temeljene na NGS-u. NGS tehnologija omogućila je identifikaciju rijetkih varijanti s velikim učinkom, uključujući missense ili nonsense zamjene jedne baze, kao i male insercije ili delecije, koje imaju važne implikacije u predviđanju rizika, dijagnosticiranju i liječenju neuroloških bolesti pa tako i MS.

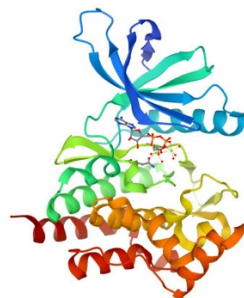
Iako uzrok MS i dalje ostaje nedokučiv, činjenica je da genetski čimbenici doprinose razvitku MS. GWAS-om je identificirana HLA klasa II, kao i ne-HLA lokuse koji su povezani s ovom bolešću. Međutim, ti aleli nisu ni potrebni ni dovoljni da izazovu nastanak MS, a rijetke varijante koje bi mogle imati veće učinke, GWAS ne može detektirati, no WES-om su identificirane dvije rijetke varijante koje značajno doprinose razvitku MS. (Jiang i sur., 2014)

Jedna studija je WES-om u skupini pacijenata koji boluju od MS identificirala rijetku funkcionalnu varijantu (p.R389H) unutar CYP27B1. Gen kodira enzim 1 $\alpha$ -hidroksilazu koji aktivira vitamin D (Slika 12.), a ova varijanta dovodi do gubitka funkcije gena, što utječe na 1- $\alpha$ -hidroksilaciju vitamina D i povezano je s nastankom MS. (Ramagoplan i sur., 2011)



Slika 12. Sinteza i metabolizam vitamina D. Gen CYP27B1 kodira enzim  $1\alpha$ -hidroksilazu koji je odgovora za sintezu aktivnog oblika vitamina D, 1, 25-dihidroksikolekalciferola; preuzeto i prilagođeno iz: Morris, 2005.

Druga studija je pak identificirala novu mutaciju (rs55762744) u TYK2, tirozin kinaze (Slika 13.) koja modulira funkciju više gena povezanih s imunološkim sustavom. Također je povezana s neuobičajeno visokom učestalošću nastanka MS. (Dyment i sur., 2012)



Slika 13. Struktura tirozin kinaze u kompleksu s ADP-om; preuzeto i prilagođeno iz: [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)

Ovi rezultati istraživanja potvrdili su kako NGS ima potencijalnu novu primjenu u dijagnostici MS. Metoda NGS otvorila je vrata pronalaska novih gena biomarkera. Intenzivno se istražuju geni koji imaju veliki značaj u patogenezi bolesti, a njihova karakterizacija bi uvelike mogla pomoći i u pronalasku nove, djelotvornije terapije. Stoga, već postoji iskustvo u ciljanom sekvenciranju genskih panela koji se koriste za precizno otkrivanje genskih varijacija povezanih s bolestima, te na tržištu postoje testovi za mutacije u različitim bolestima i tisućama

gena. Geni uključeni u razvoj MS uglavnom uključuju regulatore mijelinizacije, regulatore aktivacije i signalizacije T stanica i adaptivne imunološke regulatore.

Interleukin-8 (IL-8) izražen je u raznim upalnim i autoimunskim bolestima. Smatra se da IL-8 može potaknuti prijenos leukocita u središnji živčani sustav i izazvati fagocitozu na mjestu infekcije, što je povezano s oštećenjem krvno-moždane barijere. GWAS-om je otkriveno najmanje dvanaest drugih gena izvan IL-8 lokusa koji skromno povećavaju vjerojatnost od obolijevanja od MS. Neki od tih gena su COL11A2, DPH5, EXTL2, ALAS2, CA1, SNCA i drugi. Kako bi pružili bolje usluge za kliničko istraživanje IL-8 i drugih gena povezanih s nastankom MS, nudi se mogućnost panela za istraživanja. Dostupna je opsežna knjižnica gena povezanih s multiplom sklerozom iz kojih se mogu odabrati geni uključeni u istraživanje. Uvedene su ciljane tehnologije sekvenciranja za učinkovito detektiranje, validaciju i provjeru ključnih gena koji utječu na razvoj multiple skleroze prisutne na tržištu. Dakle, ovakva istraživanja mogu pružiti novi način za pronalaženje patogeneze MS, što je korisno za istraživanje novih strategija liječenja. Prilagođeni sadržaj panela temelji se na najnovijim podacima istraživanja o multiploj sklerozi. Moguće je odabrati sadržaj panela koji je od interesa (Slika 14.), a nudi se i personalizirani panel prema prilagođenim zahtjevima istraživača. Uzorak za analizu može biti krv, likvor ili izolirana DNA. ([www.cd-genomic.com](http://www.cd-genomic.com))

<i>ALAS2</i>	<i>AQP4</i>	<i>CA1</i>	<i>CD24</i>
<i>CD26</i>	<i>CD28</i>	<i>CD58</i>	<i>CD226</i>
<i>COL11A2</i>	<i>CYP27B1</i>	<i>DPH5</i>	<i>EXTL2</i>
<i>FcRL3</i>	<i>HBB</i>	<i>HDAC6</i>	<i>HLA-DRB1</i>
<i>IL2RA</i>	<i>IL7R</i>	<i>IL8</i>	<i>IL11</i>
<i>IL17</i>	<i>IL21</i>	<i>IL32</i>	<i>MAP7</i>
<i>MUCL1</i>	<i>S1PR1</i>	<i>SNCA</i>	<i>TNFRSF1A</i>

Slika 14. Popis gena koje tvrtka CD-Genomics nudi za odabir za prilagođene panele za istraživanja povezanosti gena i razvitka multiple skleroze; preuzeto i prilagođeno iz:

[www.cd-genomics.com](http://www.cd-genomics.com)



Primjena NGS-a u MS trenutačno je usmjerena na identifikaciju novih biomarkera, koji sudjeluju u patogenezi MS kroz različite biološke procese koji utječu na imunološke stanice u urođenom i stečenom imunitetu. Iako ova metoda je trenutno dostupna samo za istraživanja, a ne i za kliničko-dijagnostičku primjenu, s obzirom na obećavajuće rezultate dosadašnjih studija smatra se kako bi mogla dobiti svoju primjenu i izvan istraživačke domene i uvelike olakšati dijagnostiku i odabir individualizirane terapije za MS. NGS bi jednog dana mogao zamijeniti neke od dosadašnjih metoda koje se koriste za dijagnozu bolesti. (Sun i sur., 2021)

## 5. ZAKLJUČAK

1. uzrok MS još uvijek je nepoznat, a razvoj novih metoda i biljega omogućuje uvid u dosad nepoznatu patogenezu bolesti
2. oligoklonalne vrpce, IgG indeks i MRZ reakcija su biomarkeri dijagnoze MS u kliničkoj praksi
3. prognostički biomarkeri za MS mogu pružiti informacije o tijeku aktivnosti bolesti i ukazati na konverziju u drugi oblik MS (detekcija oligoklonalnih vrpca IgG u likvoru, detekcija oligoklonalnih vrpca IgM u likvoru, CHI3L1, NF, N-CAM, MMP)
4. biomarkeri terapije u postupku istraživanja i implementacije (CXCL13, NFL, vitamin D, BDNF)
5. u istraživanjima je pokazana mogućnost primjene novih biomarkera, cfDNA i miRNA, prilikom dijagnoze, praćenja tijeka bolesti i terapije MS koji bi kao takvi bili neinvazivni biomarkeri
6. razvoj metode sekvenciranja nove generacije, omogućio je otkrivanje novih čimbenika uključenih u patogenezu MS, potencijalnih biomarkera gena i novih meta za razvoj lijekova

## 6. LITERATURA

Andreasen S. Molecular features of adenoid cystic carcinoma with an emphasis on microRNA expression. *APMIS*, 2018, 126, 7-57.

Arneth B, Kraus J. Laboratory biomarkers of Multiple Sclerosis (MS). *Clin Biochem*, 2021, 21, 275-277.

Arrambide G, Tintore M, Espejo C, Auger C, Castillo M, Río J, Castelló J, Vidal-Jordana A, Galán I, Nos C, Mitjana R, Mulero P, de Barros A, Rodríguez-Acevedo B, Midaglia L, Sastre-Garriga J, Rovira A, Comabella M, Montalban X. The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. *Brain*, 2018, 4, 1075-1084.

Bašić Kes V i sur. Multipla skleroza. Zagreb, Medicinska naklada, 2021, str. 1-62, 125.

Bašić Kes V i sur. Neuroimunologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 83-88, 94-117.

Beck J, Urnovitz HB, Saresella M, Caputo D, Clerici M, Mitchell WM, Schütz E. Serum DNA Motifs Predict Disease and Clinical Status in Multiple Sclerosis. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2010, 12, 312-319.

Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain*, 2004, 127(7), 1463-78.

Brinar V i sur. Neurologija za medicinare. Zagreb, Medicinska naklada, 2019, str. 137-138, 332-337.

Calabresi PA. Diagnosis and management of multiple sclerosis. *Am Fam Physician*, 2004, 10, 1935-1944.

Custom Multiple Sclerosis Panel, 2021., <http://www.cd-genomics.com>, pristupljeno 18.10.2021.

Custom NGS Panel, 2021., <http://www.cd-genomics.com>, pristupljeno 18.10.2021.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica - molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str 286.

Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M (ur.). Patologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 823-825.

Dodig S. Imunokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 122-165.

Dunaeva M, Derksen M, Pruijn GJM. LINE-1 Hypermethylation in Serum Cell-Free DNA of Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients. *Mol Neurobiol*, 2018, 55, 4681-4688.

Dyment DA, Cader MZ, Chao MJ, Lincoln MR, Morrison KM, Disanto G, Morahan JM, De Luca GC, Sadovnick AD, Lepage P, Montpetit A, Ebers GC, Ramagopalan SV. Exome sequencing identifies a novel multiple sclerosis susceptibility variant in the TYK2 gene. *Neurology*, 2012, 79, str. 406-411.

Epigenetics, <https://www.ncc.go.jp/en/>, pristupljeno: 15.10.2021.

Gandhi R. miRNA in multiple sclerosis: search for novel biomarkers. *Multiple Sclerosis Journal*, 2015, 21, 1095-103.

Gastaldi M, Zardini E, Franciotta D. An update on the use of cerebrospinal fluid analysis as a diagnostic tool in multiple sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017, 17, 31-46.

Sun H, Shen XR, Fang ZB, Jiang ZZ, Wei XJ, Wang ZY, Yu XF. Next-Generation Sequencing Technologies and Neurogenetic Diseases. *Life (Basel)*, 2021, 11(4), 361.

Jiang T, Tan MS, Tan L, Yu JT. Application of next-generation sequencing technologies in Neurology. *Ann Transl Med*, 2014, 2(12), 125.

Kacperska MJ, Walenczak J, Tomasik B. Plasmatic microRNA as Potential Biomarkers of Multiple Sclerosis: Literature Review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine : Official Organ Wroclaw Medical University*, 2016, 25, 775-779.

Kale N. Optic neuritis as an early sign of multiple sclerosis. *Eye Brain*. 2016, 8, 195-202.

Katsavos S, Anagnostouli M. Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview. *Mult Scler Int*, 2013, 2013, 1-20.

Liggett T, Melnikov A, Tilwalli S, Yi Q, Chen H, Replogle C, Feng X, Reder A, Stefoski D, Balabanov R, Levenson V. Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 2010, 290, 16-21.

Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, Bellia C, Ciaccio M. Cerebrospinal Fluid Analysis in Multiple Sclerosis Diagnosis: An Update. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 55(6), 245.

Nimse SB, Sonawane MD, Song KS, Kim T. Biomarker detection technologies and future directions. *Analyst*, 2016, 141, 740-755.

Nourian NA. Molecular Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Journal of Reviews in Medical Sciences*, 2021, 1, 117-127.

McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA*, 2021, 325, 765–779.

Mondelo-Macía P, Castro-Santos P, Castillo-García A, Muínelo-Romay L, Diaz-Peña R. Circulating Free DNA and Its Emerging Role in Autoimmune Diseases. *J Pers Med*, 2021, 11(2), 151.

Morris HA. Vitamin D: a hormone for all seasons-how much is enough? *Clin Biochem Rev*, 2005, 26, str. 21-32.

Multiple Sclerosis: New drug repairs nerve damage, 2006., <https://www.gncdubai.com>, pristupljeno 21.11.2021.

Nikolac Gabaj N i sur. Ekstravaskularni uzorci u laboratorijskoj medicini. Zagreb, Medicinska naklada, 2019, str. 42-63.

Nourian NA. Molecular Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Journal of Reviews in Medical Sciences*, 2021, 1, 117-127.

Olsen JA, Kenna LA, Tipon RC, Spelios MG, Stecker MM, Akirav EM. A Minimally-invasive Blood-derived Biomarker of Oligodendrocyte Cell-loss in Multiple Sclerosis. *EBioMedicine*, 2016, 10, 227-235.

Paap BK, Hecker M, Koczan D, Zettl UK. Molecular Biomarkers in Multiple Sclerosis. *J Clin Cell Immunol*, 2013, S10, 1-9.

Parnell GP, Booth DR. The Multiple Sclerosis (MS) Genetic Risk Factors Indicate both Acquired and Innate Immune Cell Subsets Contribute to MS Pathogenesis and Identify Novel Therapeutic Opportunities. *Front. Immunol.*, 2017, 18(8), 425.

Pietrasik S, Dziedzic A, Miller E, Starosta M, Saluk-Bijak J. Circulating miRNAs as Potential Biomarkers Distinguishing Relapsing-Remitting from Secondary Progressive Multiple Sclerosis. A Review. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21), 11887.

Piotrkowska D, Miller E, Kucharska E, Niwald M, Majsterek I. Association of miRNA and mRNA Levels of the Clinical Onset of Multiple Sclerosis Patients. *Biology (Basel)*, 2021, 10, str.

Ramagopalan SV, Dymant DA, Cader MZ, Morrison KM, Disanto G, Morahan JM, Berlanga-Taylor AJ, Handel A, De Luca GC, Sadovnick AD, Lepage P, Montpetit A, Ebers GC. Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 2011, 70, 881-906.

Ranucci R. Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases. *Methods Mol Biol*, 2019, 1909, 3-12.

Rovira À, Auger C. Beyond McDonald: updated perspectives on MRI diagnosis of multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*, 2021, 21, 895-911.

Sadam H, Pihlak A, Jaago M, Pupina N, Rähni A, Toots M, Vaheri A, Nieminen JK, Siuko M, Tienari PJ, Palm K. Identification of two highly antigenic epitope markers predicting multiple sclerosis in optic neuritis patients. *EBioMedicine*, 2021 64,103211.

Sertić J i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 124-140.

Sertić J, Gamulin S, Sedlić F (ur.). Molekularna genetika-novosti u dijagnostici i terapiji. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 49-57.

Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.*, 2018, 122 (1), e59.

Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 246-252.

Toscano S, Patti F. CSF biomarkers in multiple sclerosis: beyond neuroinflammation. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 2021, 8, 14-41.

Types of MS, 2021., <https://www.nationalmssociety.org>, pristupljeno: 21.11.2021.

Types of Multiple Scerosis, 2021., <https://my-ms.org>, pristupljeno: 21.11.2021.

Tyk2 (JH1) in complex with adenosine di-phosphate, 2013, <http://www.rcsb.org>, pristupljeno: 18.10.2021.

Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer SHaped by Emerging Technologies. *Mol Cancer Res*, 2016, 14, 898 – 908.

Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*, 2019, (16), 272.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### Sažetak

Multipla skleroza (engl. *multiple sclerosis, MS*) je kronična upalna demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS). Uzrok MS je nepoznat, no smatra se da je MS multikomponentna bolest do koje dolazi prisutnošću genske predispozicije i autoimunskim odgovorom koji je potaknut infekcijom. Razvoj novih metoda i biljega omogućuje uvid u dosad nepoznatu patogenezu bolesti. Standardi za dijagnostiku MS su oligoklonalne vrpce, IgG indeks i MRZ reakcija u kliničkoj praksi. Prognostički biomarkeri za MS mogu pružiti informacije o tijeku aktivnosti bolesti i ukazati na konverziju u drugi oblik MS (detekcija oligoklonalnih vrpca IgG u likvoru, detekcija oligoklonalnih vrpca IgM u likvoru, CHI3L1, NF, N-CAM, MMP). Biomarkeri terapije (CXCL13, NFL, vitamin D, BDNF) u postupku su istraživanja i implementacije. U istraživanjima je pokazana mogućnost primjene novih biomarkera, cfDNA i miRNA, prilikom dijagnoze, praćenja tijeka bolesti i terapije MS koji bi kao takvi bili neinvazivni biomarkeri. Razvoj metode sekvenciranja nove generacije, omogućio je otkrivanje novih čimbenika uključenih u patogenezi MS, potencijalnih biomarkera gena i novih meta za razvoj lijekova.



## Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS). The cause of MS is unknown, but MS is thought to be a multicomponent disease caused by the presence of a genetic predisposition and an autoimmune response triggered by infection. The development of new methods and markers provides insight into the unknown pathogenesis of the disease. Standards for the diagnosis of MS are oligoclonal bands, IgG index and MRZ reactions in clinical practice. Prognostic biomarkers for MS can provide information on the course of disease activity and indicate conversion to another form of MS (detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid, detection of oligoclonal bands IgM in cerebrospinal fluid, CHI3L1, NF, N-CAM, MMP). Biomarkers of therapy (CXCL13, NFL, vitamin D, BDNF) are in the process of research and implementation. Research has shown the possibility of using new biomarkers, cfDNA and miRNA, in the diagnosis, monitoring of the course of the disease and therapy of MS, which as such would be non-invasive biomarkers. The development of a new generation sequencing method has made it possible to discover new factors involved in the pathogenesis of MS, potential gene biomarkers and new targets for drug development.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
Samostalni kolegij: Suvremene biokemijske tehnike  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### BIOMARKERI U MULTIPLOJ SKLEROZI

Leonarda Grošić

#### SAŽETAK

Multipla skleroza (engl. *multiple sclerosis, MS*) je kronična upalna demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS). Uzrok MS je nepoznat, no smatra se da je MS multikomponentna bolest do koje dolazi prisutnošću genske predispozicije i autoimunim odgovorom koji je potaknut infekcijom. Razvoj novih metoda i biljega omogućuje uvid u dosad nepoznatu patogenezu bolesti. Standardi za dijagnostiku MS su oligoklonalne vrpce, IgG indeks i MRZ reakcija u kliničkoj praksi. Prognostički biomarkeri za MS mogu pružiti informacije o tijeku aktivnosti bolesti i ukazati na konverziju u drugi oblik MS (detekcija oligoklonalnih vrpca IgG u likvoru, detekcija oligoklonalnih vrpca IgM u likvoru, CHI3L1, NF, N-CAM, MMP). Biomarkeri terapije (CXCL13, NFL, vitamin D, BDNF) u postupku su istraživanja i implementacije. U istraživanjima je pokazana mogućnost primjene novih biomarkera, cfDNA i miRNA, prilikom dijagnoze, praćenja tijeka bolesti i terapije MS koji bi kao takvi bili neinvazivni biomarkeri. Razvoj metode sekvenciranja nove generacije, omogućio je otkrivanje novih čimbenika uključenih u patogenezi MS, potencijalnih biomarkera gena i novih meta za razvoj lijekova.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 46 stranica, 14 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 53 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: multipla skleroza, biomarkeri, dijagnostika multiple skleroze, cfDNA, miRNA, sekvenciranje nove generacije

Mentor: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Biochemistry and Molecular Biology  
Independent course: Modern Biochemical Techniques  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

## BIOMARKERS OF MULTIPLE SCLEROSIS

Leonarda Grošić

### SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS). The cause of MS is unknown, but MS is thought to be a multicomponent disease caused by the presence of a genetic predisposition and an autoimmune response triggered by infection. The development of new methods and markers provides insight into the unknown pathogenesis of the disease. Standards for the diagnosis of MS are oligoclonal bands, IgG index and MRZ reactions in clinical practice. Prognostic biomarkers for MS can provide information on the course of disease activity and indicate conversion to another form of MS (detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid, detection of oligoclonal bands IgM in cerebrospinal fluid, CHI3L1, NF, N-CAM, MMP). Biomarkers of therapy (CXCL13, NFL, vitamin D, BDNF) are in the process of research and implementation. Research has shown the possibility of using new biomarkers, cfDNA and miRNA, in the diagnosis, monitoring of the course of the disease and therapy of MS, which as such would be non-invasive biomarkers. The development of a new generation sequencing method has made it possible to discover new factors involved in the pathogenesis of MS, potential gene biomarkers and new targets for drug development.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 46 pages, 14 figures, 1 table and 53 references. Original is in Croatian language.

Keywords: multiple sclerosis, biomarkers, diagnosis of multiple sclerosis, cfDNA, miRNA, next generation sequencing

Mentor: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2022.