

# Neurofilamenty ľahkých reťazcov a aktivita ochorenia u pacientov so sclerosis multiplex

doc. MUDr. Jarmila Szilasiová, PhD.<sup>1</sup>, MUDr. Miriam Fedičová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Neurologická klinika UPJŠ LF a UNLP v Košiciach

<sup>2</sup>Neurologická klinika Univerzitná nemocnica L. Pasteura v Košiciach

Cieľom účinnej liečby sclerosis multiplex najnovšími preparátmi je zabrániť progredujúcej disabilite pacienta. Nenaplnenou potrebou pre dennú prax je absencia validných laboratórnych biomarkerov, ktoré by nám okrem zobrazovacích metód, ako sú magnetická rezonancia mozgu a miechy, ukázali práve prebiehajúcu aktivitu ochorenia u jednotlivého pacienta a efekt podávanej liečby. Neurofilamenty ľahkých reťazcov (NfL) sa považujú za nešpecifický biomarker neurodegenerácie a dajú sa ľahko vyšetriť z krvi. V tejto práci predkladáme prehľad výsledkov štúdií hodnotiacich vzťahy hladín krvných NfL k parametrom aktivity ochorenia, zápalovej aj neurodegeneratívnej manifestácii a odpovedi na liečbu.

**Kľúčové slová:** sclerosis multiplex, aktivita ochorenia, neurofilamenty, biomarkery.

## Neurofilament light chain and disease activity in patients with multiple sclerosis

The goal of effective treatment of multiple sclerosis with the latest drugs is to prevent the patient's progressive disability. Unmet need for daily practice is the absence of valid laboratory biomarkers, which, in addition to imaging methods such as magnetic resonance imaging of the brain and spinal cord, would show us the current activity of the disease in an individual patient and the effect of treatment. Neurofilament light chain (NfL) is considered to be a non-specific biomarker of neurodegeneration and is easily examined from the blood. In this work, we present an overview of the results of studies evaluating the relationships between blood NfL levels and disease activity, inflammatory and neurodegenerative manifestations and response to treatment.

**Key words:** multiple sclerosis, disease activity, neurofilament, biomarkers.

## Úvod

Sclerosis multiplex (SM) je ochorenie s variabilnou manifestáciou a nepredvídateľným priebehom. V posledných dvoch dekádach došlo k výraznej expanzii nových imunosupresívnych liekov s cieľom predísť zápalu a neurodegenerácii pri SM. Aktivitu ochorenia a responzivnosť na liečbu DMT (disease modifying therapy) stanovujeme v súčasnosti hodnotením klinických a rádiologických vyšetrení magnetickou rezonanciou (MR).

V klinických parametroch sa posudzujú výskyt relapsu a jeho závažnosť, miera celkového funkčného postihnutia chorobou – disability (vyjadrená stupňom v stupnici EDSS).

V rádiologických parametroch sa hodnotí zmena na MR mozgu/miechy, t. j. nové alebo zväčšené lézie v T2 váženom obraze a v postkontrastnom náleze gadolínium enhancujúce lézie (Gd+ lézie). Je známe, že medzi klinickým a rádiologickým nálezom nie je priama korelácia (klinicko-rádiologický paradox), MR poskytuje nešpecifický nález a iba slabou predikuje budúcu aktivitu ochorenia. Ďalším markerom aktivity SM je miera atrofie mozgu, ktorá predstavuje stratu objemu mozgového tkaniva. Tento parameter nie je súčasťou štandardného protokolu vyhodnotenia aktivity ochorenia a má niekoľko obmedzení vo využití v bežnej praxi. Pokles objemu moz-

gu je etiopatologicky nešpecifický, závisí od mnohých faktorov, najmä hydratácie tkanív. Preto sa intenzívne hľadajú biomarkery, ktoré sa špecificky týkajú štruktúry neurónov a ich funkcie. Zápalový proces je pri SM od začiatku sprevádzaný neurodegeneratívnymi zmenami v CNS. Pozornosť sa sústreďuje na identifikáciu biomarkerov ochorenia, ktoré by dokázali identifikovať mieru neurodegenerácie pri SM. Známe laboratórne diagnostické biomarkery SM sú oligoklonálne pásy Ig v likvore.

## Neurofilamenty

Neurofilamenty sú cytoskeletálne proteíny, úzko viazané na neuroaxonálne kom-



KORESPONDENČNÁ ADRESA AUTORKY:

doc. MUDr. Jarmila Szilasiová, PhD., jarmila.szilasiova@upjs.sk

Neurologická klinika UPJŠ LF a UNLP v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

Cit. zkr: Neurol. praxi 2021; 22(3): 212–216

Článok prijat redakci: 30. 12. 2020

Článok prijat k publikaci: 31. 1. 2021

**INZERCE**

partmenty (Khalil et al., 2018). Tieto heteropolyméry tvoria triplety ľahkých (NfL), stredne ťažkých (NfM) a ťažkých (NfH) reťazcov. Ich rôzne zastúpenie, kombinácie a koncentrácie závisia od jednotlivých typov neurónov, lokalizácie v axóne a stupňa vývoja.

Koncentrácie NfL sú zvýšené pri mnohých neurologických ochoreniach spojených s poškodením axónov (Khalil et al., 2018). Neurofilamenty ľahkých reťazcov sa považujú za nešpecifický marker neurodegenerácie a konečné štádium neuro-axonálneho rozpadu rôznej etiopatogenézy. Poškodenie neurónov CNS vedie k ich uvoľneniu a zvýšeniu hladín v likvore a krvi, pričom ich koncentrácia odráža rýchlosť uvoľňovania z neurónov. Predpokladá sa, že sa NfL dostávajú do krvi a likvoru prostredníctvom arachnoidálnych granulácií, ako aj lymfatickými cestami cez subarachnoidálne a perivaskulárne priestory. Hladiny NfL v likvore sú až 500-krát vyššie ako v krvi. Pri sledovaní pooperačných hladín NfL sa zistilo, že najvyššie hodnoty v likvore aj sére boli 1 mesiac po operácii a na východiskovú hodnotu sa vrátili po 6 až 9 mesiacoch. U pacientov so SM sa hodnoty NfL zvyšovali 5 mesiacov pred relapsom, vrcholili pri klinickom nástupe relapsu a klesli v priebehu 4–5 mesiacov (Akgun et al., 2019). Tieto dáta sú aj východiskom k úvahe, že štvrtročné hodnotenie NfL by mohlo predstavovať optimálny interval sledovania ich dynamiky.

Vek je hlavná fyziologická premenná ovplyvňujúca hodnoty NfL. Hladiny sa pri zdravých kontrolách zvyšujú o 2,2 % ročne (Disanto et al., 2017; Barro et al., 2018). U osôb nad 60 rokov možno pozorovať prudší nárast hladiny sNfL spolu s interindividuálnou variabilitou hladín NfL. Predpokladá sa, že tieto zmeny odrážajú proces starnutia, ako aj komorbiditu. Ďalšie faktory okrem samotného neurologického ochorenia, ktoré môžu meniť hladinu neurofilamentov, sú BMI a tiež vaskulárne rizikové faktory (Manouchehrinia et al., 2020). Je preto dôležité stanoviť referenčné hodnoty podľa vekových skupín (z databázy zdravých kontrol) spolu s vyhodnotením efektu komorbidít (cerebrovaskulárne choroby, diabetes, fajčenie) na krvné hladiny NfL.

Ultrazenzitívna, v súčasnosti preferovaná metodika stanovenia hladín NfL v sére (sNfL) alebo plazme (pNfL) je SiMoA. Platforma

Quanterix využíva technológiu jednej molekuly (SiMoA), je komerčne dostupná a vykazuje dobrú analytickú presnosť (interassay koeficienty a variačné koeficienty sú < 10 %) (Kuhle et al., 2018). Okrem metódy SiMoA sa používajú aj ďalšie vysoko citlivé platformy, ako neuropanel na analýzu ligačného proteínu Olink (Olink proximity ligation protein analysis neuropanel). Medzi nové automatizované systémy patrí systém Cobas Elecsys od spoločnosti Roche a immunoassay systém ADVIA od spoločnosti Siemens.

Korelácia medzi hladinami NfL v sére/plazme a hladinami v likvore bola preukázaná vo viacerých štúdiách (Khalil et al., 2018) s pacientmi s RRSM (relaps remitujúca sclerosis multiplex), ako aj progresívnou SM (Disanto et al., 2017). Koncentrácie NfL v sére sú približne o 20 % vyššie v porovnaní s plazmou.

Viac ako 15 rokov sú predmetom výskumu protilátky proti NfL. Metódou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) možno stanoviť v likvore aj sére protilátky proti ľahkým, stredným a ťažkým reťazcom neurofilamentov (anti-NfL, anti-NfM, anti-NfH). Bartoš a kol. vo svojej práci analyzovali sérové a likvorové hladiny IgG a IgM protilátok anti-NfL a zistili, že hladiny protilátok IgG v likvore boli u pacientov so SM zvýšené v porovnaní s inými zmiešanými ochoreniami. Protilátky IgG boli znížené u SM pacientov liečených kombinovanou imunosupresiou na rozdiel od neliečených. Medzi hladinami protilátok anti-NfL typu IgM neboli medzi skupinami SM a inými ochoreniami rozdiely, hodnoty IgM anti-NfL boli vyššie u pacientov s neurodegeneratívnymi chorobami. V závere práce konštatujú, že protilátky IgG a IgM anti-NfL nie sú užitočným biomarkerom axonálneho poškodenia alebo subtypov SM (Bartoš et al., 2007).

## Klinické využitie neurofilamentov

Neurofilamenty sú vysokosenzitívnym biomarkerom poškodenia neurónov, bez ohľadu na príčinu. Pri použití NfL ako biomarkera v klinických štúdiách možno vplyv veku a komorbidít regulovať výberom pacientov alebo kovariačnou analýzou, avšak v reálnej praxi personalizovanej medicíny je na správnu interpretáciu potrebné poznať presnejšie dynamiku NfL a všetky kofaktory.

Databáza noriem NfL je nevyhnutný nástroj, ktorý umožnil kvantitatívne modelovanie progresie ochorenia SM a poskytol relevantný nástroj hodnotenia aktivity SM a odpovede na liečbu. Tieto modely už boli vyvinuté a sú dostupné v klinických štúdiách pri Alzheimerovej a Parkinsonovej chorobe. U pacientov s Alzheimerovou chorobou a amyotrofickou laterálnou sklerózou sa priemerná koncentrácia NfL v sére zvyšuje mesiace alebo roky pred objavením sa prvých klinických prejavov (Preische et al., 2019; Benatar et al., 2018).

## Neurofilamenty a sclerosis multiplex

U pacientov so SM boli NfL analyzované vo viacerých aspektoch a v posledných 2 rokoch bolo publikovaných viac ako 200 prác o vzťahu NfL k jednotlivým atribútom ochorenia. NfL sa javia ako citlivý biomarker aktivity SM, progresie, odpovede na liečbu a prognózy ochorenia.

Koncentrácie NfL sú u pacientov so SM zvyčajne oveľa nižšie ako pri progresívnych primárnych neurodegeneratívnych ochoreniach, ktoré vykazujú rýchlejšiu stratu neurónov. Priemerné koncentrácie NfL v sére alebo plazme sú vyššie pri relapsujúcich a progresívnych formách SM v porovnaní so zdravými kontrolami (Disanto et al., 2017; Kuhle et al., 2019; Barro et al., 2018). Mnohé retrospektívne štúdie a výsledky štúdií tretej fázy u pacientov s relapsujúcou SM ukázali, že pNfL, sNfL, ako aj likvorové hodnoty sú sľubným biomarkerom SM (Disanto et al., 2017; Barro et al., 2018; Novakova et al., 2017; Kuhle et al., 2019). NfL vykazujú asociácie s aktivitou ochorenia v akútnej fáze (vrátane korelácie s východiskovým objemom T2 lézií a počtom enhancujúcich T1 lézií) a sú prediktívnym faktorom následnej aktivity na MR, miery straty objemu mozgu, miery relapsov a zhoršenia disability. Môžu byť užitočné v identifikácii dlhodobu stabilizovaného stavu pacienta na danej liečbe, v odlíšení pseudorelapsu ochorenia, prípadne môžu nahradiť každoročné vyšetrenie magnetickou rezonanciou (Filippi et al., 2020).

Zvýšená koncentrácia NfL v likvore sa pozorovala u pacientov s rádiologickým izolovaným syndrómom, rizikovým faktorom pre neskorší prechod do klinicky definitívnej SM (Matute-Blanch et al., 2018).

Prierezové štúdie ukázali významné korelácie medzi vysokými hodnotami NfL a zápalovými faktormi, ako relaps SM a lézie na MR (Barro et al., 2018; Novakova et al., 2017; Kuhle et al., 2019). Okrem zápalovej aktivity reflektujú hladiny NfL i neurodegeneratívne zmeny, progresiu a akumuláciu disability. Pacienti s progresívnou formou SM majú vyššie hladiny NfL ako osoby s RRSM rovnakého pohlavia a veku. Významné korelácie sa zistili medzi vysokou hladinou NfL a väčšou progresiou choroby vrátane skóre disability, konverzie do sekundárnej progresie, atrofie na MR mozgu a zhoršením kognitívnych funkcií (Disanto et al., 2017; Novakova et al., 2017; Kuhle et al., 2019; Filippi et al., 2020; Jakimovski et al., 2020). V prospektívnych štúdiách, ktoré sa zaoberali sledovaním dynamiky NfL v dlhodobom horizonte, sa potvrdil vzťah medzi zvýšením NfL 5 mesiacov pred objavením sa klinického relapsu, s najvyššími hladinami NfL v dobe manifestácie relapsu. Pokles hladín NfL na východiskové hodnoty bol v rozmedzí 4–5 mesiacov (Akgün et al., 2019). Najvyššie hodnoty NfL boli spojené s takmer 80 % rádiologickou a klinickou aktivitou.

## Neurofilamenty a odpoveď na liečbu SM

Na základe viacerých publikovaných prác sa javia NfL ako vhodný biomarker farmakodynamiky a odpovede na liečbu, ukazovateľ efektu hodnoteného lieku aj v klinických štúdiách so SM. Výsledky štúdií s relabujúcou SM naznačujú, že sérové a plazmatické koncentrácie NfL odpovedajú konzistentne do 3–6 mesiacov od začiatku protizápalovej liečby a korelujú aj s dátami klinickými a zobrazovacími. Zmeny v hladinách NfL pri liekoch s vyššou účinnosťou, ako je alemtuzumab a fingolimod, boli väčšie ako odpoveď na interferón-beta (Kuhle et al., 2019).

V odpovedi na DMT liečbu sa v retrospektívnych analýzach pozoroval dlhodobý pokles hladín NfL v skupinách pacientov s dobrým klinickým aj rádiologickým efektom lieku. Ukázali to pozorovania pri relapsujúcich formách SM s liečbou injekčnými preparátmi (Disanto et al., 2017), dimetylfumarátom (Akgün et al., 2019), fingolimodom (Kuhle et al., 2019), natalizumabom

(Gunnarsson et al., 2011), rituximabom (de Flon et al., 2019), okrelizumabom (Cross et al., 2019), ofatumumabom (Hauser et al., 2020) a alemtuzumabom (Akgün et al., 2019). Pokles hladín NfL pozorovaný pri rozdielnych typoch DMT liečby zodpovedá približne hierarchii účinnosti týchto liekov. V súlade s tým sa ukázali výsledky nedávno publikovanej švédskej štúdie v kohorte s viac ako 1 000 pacientmi liečenými niektorým zo šiestich liekov, kde najväčší pokles hladín pNfL bol pri alemtuzumabe (48 %) a najmenší pri teriflunomide (7 %), ostatné preparáty vykazovali stredný pokles hladín NfL (Delcoigne et al., 2020).

U pacientov so sekundárne progresívnou SM sa pozoroval pokles NfL pri siponimode (Kuhle et al., 2018), okrelizumabe (Bar-Or et al., 2019) a natalizumabe (Kapoor et al., 2019). Pri primárne progresívnej forme došlo k zníženiu hladín NfL pri liečbe fingolimodom (Kuhle et al., 2018) a okrelizumabom (Bar-Or et al., 2019). Vzhľadom na nedostatok validných biomarkerov pri progresívnej forme SM sa NfL čoraz viac považuje za dôležitý sekundárny koncový ukazovateľ v 2. a 3. fáze štúdií nových liekov (Kapoor et al., 2020).

## NfL ako prediktívny biomarker SM

Fialová a kol. analyzovala hladiny NfL v li kvore a sére a protilátky anti-NfL IgG. Zistili, že najvyššie hodnoty protilátok boli u pacientov s CIS (klinicky izolovaný syndróm), ktorí konvertovali do SM (klinicky definitívnej), na rozdiel od pacientov s CIS, u ktorých sa následne SM nerozvinula (Fialová et al., 2013). V tomto kontexte sa javia protilátky anti-NfL ako vhodné potenciálne biomarkery signalizujúce axonálne poškodenie už vočasnej fáze SM.

V mnohých štúdiách sa ukázali NfL ako prediktívny faktor nasledujúcich relapsov, aktivity v MR, progresie disability, atrofie mozgu a miechy a zhoršenia kognitívnych funkcií (Disanto et al., 2017; Barro et al., 2018; Siller et al., 2018; Kuhle et al., 2017; Jakimovski et al., 2020). Výsledky 5-ročnej švajčiarskej longitudinálnej štúdie u viac ako 1 200 pacientov s úpravou hodnôt NfL vzhľadom na vek ukázali, že vysoké hladiny NfL boli spojené s vyšším rizikom relapsu a novej aktivity na MR v nasledujúcom roku dokonca

aj u tých, ktorí vykazovali status NEDA – No Evident Disease Activity (Yaldizli et al., 2018; Lublin 2012). Vyššie hodnoty NfL sa javia ako nezávislý faktor zvýšeného rizika klinickej aj rádiologickej (MR) aktivity choroby v nasledujúcom roku, čo vedie k úvahe, že NfL môže byť užitočný nástroj v predpovedi subklinickej aktivity SM. NfL v skorej fáze SM boli asociované s klinickou aj MR aktivitou ochorenia pozorovanou o 10 rokov neskôr (Chitnis et al., 2018).

## Limity interpretácie hladín NfL

NfL je cytoskeletálny proteín, ktorý sa môže uvoľňovať v dôsledku takmer akéhokoľvek typu poškodenia mozgu. NfL nie je špecifický pre SM, a teda akékoľvek neurologické ochorenie alebo poranenie môže skresliť interpretáciu NfL v populácii SM. Pochopenie vplyvu rôznych komorbídnych stavov, ako sú cerebrovaskulárne choroby, cukrovka a fajčenie na sérové koncentrácie NfL, je ďalším dôležitým krokom vo vývoji NfL ako nástroja personalizovanej medicíny pri SM, najmä u pacientov s progresívnou SM.

## Výzvy vo výskume NfL

Súčasná dáta ukázali, že sNfL predstavujú senzitívny biomarker sclerosis multiplex využiteľný pri všetkých fenotypoch SM v sledovaní aktivity ochorenia a odpovede na liečbu. Pred ich zavedením do rutínnej praxe je niekoľko dôležitých otázok: štandardizácia metódy odberu vzoriek a testov pre porovnateľnosť výsledkov NfL, stanovenie normatívnej databázy hladín NfL u zdravých osôb s prihliadnutím na vek a komorbiditu, hlbšia analýza a objasnenie prediktívnej hodnoty východiskových hladín NfL, definovanie modelov zmien hladín NfL pri rôznych liekoch DMT, vzťah medzi hladinami NfL a klinickými a zobrazovacími nálezmi. Osobitným problémom je určenie podielu zápalovej aktivity vrátane aktivovanej mikrogliie a iných chorobných procesov na zmenách NfL. Všetky doterajšie nálezy si vyžadujú hlbšiu analýzu a údaje z prospektívnych dlhodobých sledovaní na interpretáciu výsledkov NfL na individuálnej úrovni, na vytvorenie modelu, ktorý by mohol podporiť využitie NfL v klinických skúšaní. Tieto štúdie by mali objasniť podiel neurodegenerácie a akútnej zápalovej

aktivity v dlhodobých zmenách disability a NFL; rozsah a časový priebeh trajektórie hladín NFL po akútnej zápalovej príhode (relaps alebo aktivita MR lézií). Koncentrácie NFL sú dynamické, zvýšené niekoľko mesiacov po relapse, preto je potrebné definovať prahovú úroveň zmeny koncentrácie NFL.

## Záver

Neurofilamenty sa javia ako užitočný doplnkový laboratórny biomarker, ktorý spolu s klinickým a MR nálezom umožňuje presnejšie hodnotenie aktivity SM. Širšie zavedenie do klinickej rutine praxe si ešte vyžaduje upresniť niekoľko dôležitých otázok, predov-

šetkým vekovo upravené normatívne hodnoty a medzné hodnoty, optimálnu frekvenciu testovania a štandardizáciu laboratórnych metód stanovenia NFL pre ich lepšiu porovnateľnosť.

*Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0057/2018.*

## LITERATÚRA

1. Akgün K, Kretschmann N, Haase R, Proschmann U, Kitzler HH, Reichmann H, Ziemssen T. Profiling individual clinical responses by high-frequency serum neurofilament assessment in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2019; 6: 1–12.
2. Bar-Or A, Thaneil GA, Harp CT, Cross AH, Hauser SL, Kuhle J, Leppert D, Oksenberg J, Model F, Flore D, Koendgen H, Mehta L, Hendriks R, Fischer S, Manfrini M, Herman AE. Blood neurofilament light levels are lowered to a healthy donor range in patients with RMS and PPMS following ocrelizumab treatment. *Mult Scler J* 2019; 25: 52.
3. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas Ch, Amann M, Naegelin Y, Leppert D, Gobbi C, Granziera C, Yaldizli Ö, Michalak Z, Wuertel J, Kappos L, Parmar K, Kuhle J. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain* 2018; 141: 2382–2391.
4. Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Kukal J, Malbohan I, Piřha J. Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 2007; 116(2): 100–107.
5. Benatar M, Wu J, Andersen PM, Lombardi V, Malaspina A. Neurofilament): 100 – 107. light: a candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenotypic conversion. *Ann Neurol*. 2018; 84: 130–139.
6. Cross A. Ocrelizumab treatment reduced levels of neurofilament light chain and numbers of B cells in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing multiple sclerosis in the OBOE study S56.008. *Neurology* 2019; 92: 52.
7. Delcoigne B, Manouchehrinia A, Barro Ch, Benkert P, Michalak Z, Kappos L, Leppert D, Tsai JA, Plavina T, Kieseier BC, Lycke J, Alfredsson L, Kockum I, Kuhle J, Olsson T, Piehl F. Blood neurofilament light levels segregate treatment effects in multiple sclerosis. *Neurology* 2020; 94(11): e1201–e1212.
8. Disanto G, Barro C, Benkert P, Benkert P, Naegelin Y, Schadelin S, Giardiello A, Zecca Ch, Blennow K, Zetterberg H, Leppert D, Kappos L, Gobbi C, Kuhle J, Swiss multiple sclerosis cohort study group. Serum neurofilament light: a biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017; 81: 857–870.
9. Fialová L, Bartoš A, Švarcová J, Zimová D, Kotouřová J, Malbohan I. Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2013; 262(1–2): 113–120.
10. Filippi P, Vestenická V, Šiarnik P, Siváková M, Čopíková-Cudráková D, Belan V, Hanes J, Novák M, Kollár B, Turčani P. Neurofilament light chain and MRI volume parameters as markers of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Neuro Endocrinol Lett*. 2020; 41: 17–26.
11. de Flon P, Laurell K, Sundström P, Blennow K, Söderström L, Zetterberg H, Gunnarsson M, Svenningsson A. Comparison of plasma and cerebrospinal fluid neurofilament light in a multiple sclerosis trial. *Acta Neurol Scand*. 2019; 139(5): 462–468.
12. Gunnarsson M, Malmström C, Axelsson M, Sundström P, Dahle Ch, Vrethem M, Olsson T, Piehl F, Norgren N, Rosengren L, Svenningsson A, Lycke J. Axonal damage in relapsing multi-

- ple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *J Ann Neurol*. 2011; 69(1): 83–89.
13. Hauser SL, Bar-Or A, Cohen JA, Comi G, Correale J, Coyle PK, Cross AH, de Seze J, Leppert D, Montalban X, Selmaj K, Wiendl H, Kerlough C, Willi R, Li B, Kakarieka A, Tomic D, Goodyear A, Pingili R, Häring DA, Ramanathan K, Merschhemke M, Kappos L, ASCLEPIOS I and ASCLEPIOS II Trial Groups. Ofa-tumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2020; 383(6): 546–557.
14. Chitnis T, Gonzalez C, Healy BC, Saxena S, Rosso M, Barro Ch, Michalak Z, Paul A, Kivisakk P, Diaz-Cruz C, Sattarnejad N, Piere IV, Glanz BI, Tomic D, Kropshofer H, Haring D, Leppert D, Kappos L, Bakshi R, Wiener H, Kuhle J. Neurofilament light chain serum levels correlate with 10-year MRI outcomes in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018; 5(12): 1478–1491.
15. Jakimovski D, Zivadinov R, Ramanathan M, Hagemeier J, Weinstock-Guttman B, Tomic D, Kropshofer H, Fuchs TA, Barro C, Leppert D, Yaldizli Ö, Kuhle J, Benedict RH. Serum neurofilament light chain level associations with clinical and cognitive performance in multiple sclerosis: a longitudinal retrospective 5-year study. *Mult Scler*. 2020; 26(13): 1670–1681.
16. Kapoor R, Sellebjerg F, Hartung HP, Arnold DL, Freedman MS, Jeffery D, Miller A, Edwards KR, Singh CM, Chang I, Ren Z, Sangurdekar D, Zhu B, Sheikh S, Mehta D, Ho PR, Campbell N, Edwards M, Fisher E, Kieseier BC, Rudick RA, Plavina T. Natalizumab reduces serum concentrations of neurofilament light chain in secondary progressive multiple sclerosis patients from the phase 3 ASCEND study. *Mult Scler J*. 2018; 24: 988.
17. Kapoor R, Smith KE, Allegretta M, Arnold DL, Carroll W, Comabella M, Furlan R, Harp C, Kuhle J, Leppert D, Plavina T, Sellebjerg F, Sincok C, Teunissen ChE, Topalli I, von Raison F, Walker E, Fox RJ. Serum neurofilament light as a biomarker in progressive multiple sclerosis. *Neurology* 2020; 95: 436–444.
18. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattlinger T, Barro Ch, Kappos L, Comabella M, Fazekas F, Petzold A, Blennow K, Zetterberg H, Kuhle J. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018; 14: 577–589.
19. Kuhle J, Nourbakhsh B, Grant D, Morant S, Barro C, Yaldizli Ö, Pelletier D, Giovannoni G, Waubant E, Gnanapavan S. Serum neurofilament is associated with progression of brain atrophy and disability in early MS. *Neurology* 2017; 88(9): 826–831.
20. Kuhle J, Barro C, Hrusovsky K, Chang L, Jeromin A, Bridel C, Bar-Or A, Bittner S, Brück W, Bielekova B, Chitnis T, Comi G, Comabella M, Arrambide G, Montalban X, Datwani A, Fluck M, Fox R, Freedman M, Furlan R, Gnanapavan S, Giovannoni G, Havari E, Khalil M, Leppert D, Kropshofer H, Valentin MA, Oksenberg J, Piehl F, Plavina T, Sormani MP, Lehmann S, Thouvenot E, Ziemssen T, Zipp F, Gross C, Wiendl H, Kappos L, Michalak Z, Blennow K, Zetterberg H, Teunissen C, Wilson D. International multi-site analytical validation of the Simoa NF-light assay in human serum samples from multiple sclerosis patients. *Mult Scler J*. 2018; 24: 249–251.

21. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U, Meinert R, Barro C, Dahlke F, Tomic D, Leppert D, Kappos L. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology* 2019; 92: E1007–E1015.
22. Kuhle J, Kropshofer H, Barro Ch, Meinert R, Haring DA, Leppert D, Tomic D, Dahlke F, Kappos L. Siponimod reduces neurofilament light chain blood levels in secondary progressive multiple sclerosis patients. *Neurology* 2018; 90(15S): S8.006.
23. Kuhle J, Kropshofer H, Haring DA, Barro C, Dahlke F, Leppert D, Tomic D. Neurofilament light levels in the blood of patients with secondary progressive MS are higher than in primary progressive MS and may predict brain atrophy in both MS subtypes. *Mult. Scler. J*. 2018; 24: 111–80.
24. Manouchehrinia A, Piehl F, Hillert J, Leppert D, Barro C, Michalak Z, Benkert P, Lycke J, Alfredsson L, Kappos L, Piehl F, Olsson T, Kuhle J, Kockum I. Confounding effect of blood volume and body mass index on blood neurofilament light chain levels. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020 Jan; 7(1):139–143.
25. Lublin FD. Disease activity free status in MS. *Mult Scler Relat Disord*. 2012; 1(1): 6–7.
26. Matute-Blanch C, Villar LM, Alvarez-Cermeno JC, Rejdak K, Evdoshenko E, Makshakov G, Nazarov V, Lapin S, Midaglia L, Vidal-Jordana A, Drulovic J, García-Merino A, Sánchez-López AJ, Havrdova E, Saiz A, Lufriu S, Alvarez-Lafuente R, Schroeder K, Zettl U, Galimberti D, Ramió-Torrentà L, Robles R, Quintana E, Hegen H, Deisenhammer F, Río J, Tintoré M, Sánchez A, Montalban X, Comabella M. Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome. *Brain* 2018; 141: 1085–1093.
27. Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, Axelsson M, Khademi M, Gunnarsson M, Malmström C, Svenningsson A, Olsson T, Piehl F, Blennow K, Lycke J. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology* 2017; 89: 2230–2237.
28. Novakova L, Axelsson M, Khademi M, Zetterberg H, Blennow K, Malmström C, Piehl F, Olsson T, Lycke J. Cerebrospinal fluid biomarkers as a measure of disease activity and treatment efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurochem*. 2017; 141(2): 296–304.
29. Preische O, Schultz SA, Apel A, Kuhle J, Kaeser SA, Barro Ch, Gräber S, Kuder-Bulletta E, LaFougere Ch, Laske Ch, Wöglein J, Levin J, Masters CL, Martins R, Schofield PR, Rossor MN, Graff-Radford NR, Salloway S, Ghetti B, Ringman JM, Noble JM, Chhatwal J, Goate AM, Benzinger TL, Morris JC, Bateman RJ, Wang G, Fagan AM, McDade EM, Gordon BA, Jucker M. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2019; 25: 277.
30. Siller N, Kuhle J, Muthuraman M, Barro C, Uphaus T, Gropa S, Kappos L, Zipp F, Bittner S. Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 2018.
31. Yaldizli O. Value of serum neurofilament light chain levels as a biomarker of suboptimal treatment response in MS clinical practice. *ECTRIMS Online Library*. Dec 10, 2018.