

Laadukasta palvelua ja tutkimusta
Itä-Suomen yliopiston aivotutkimusyksikön
Biomarkkerilaboratoriossa.

Kokkola Tarja, Kärkkäinen Sari, Herukka Sanna-Kaisa. Kliinlab 39 (2), 72-75, 2022.

Alkuperäinen julkaisu

https://www.skky.fi/wp-content/uploads/2022/08/Kliinlab_2_2022_screen.pdf



Suomen Kliinisen Kemian Yhdistys
Föreningen för Klinisk Kemi i Finland

Laadukasta palvelua ja tutkimusta Itä-Suomen yliopiston aivotutkimusyksikön Biomarkkerilaboratoriossa

Tarja Kokkola, Sari Kärkkäinen, Sanna-Kaisa Herukka

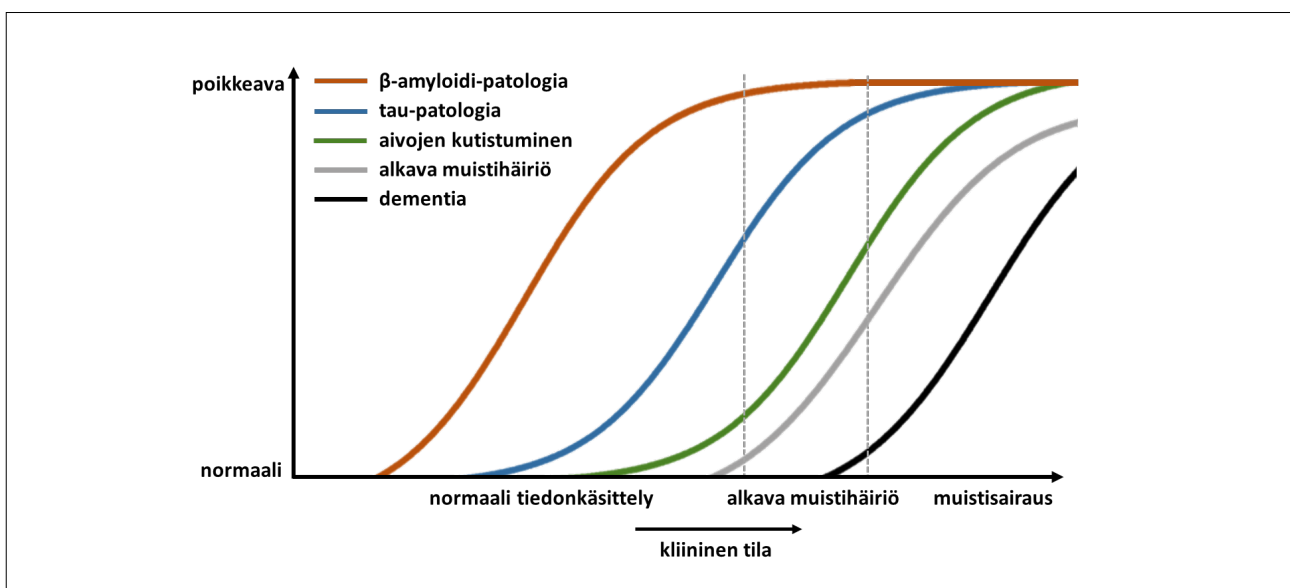
Yhteenveto

Itä-Suomen yliopiston Aivotutkimusyksikön Biomarkkerilaboratorio tekee ainoana Suomessa Alzheimerin taudin biomarkkereiden eli merkkiaineiden analytiikkaa. Alzheimer-merkkiaineet auttavat oikeaan diagnoosiin pääsemistä ja helpottavat taudin varhaista tunnistamista. Tähän saakka diagnostiikassa on käytetty ainoastaan selkäydinnesteenäytteitä, mutta mittausteknologian kehittyminen ja uudet aiempaa herkemmat menetelmät mahdollistavat jatkossa myös verinäytteiden käytön aivoperäisten biomarkkereiden analytiikassa. Biomarkkerilaboratorion tavoitteena on tarjota ensimmäiset veren merkkiainetestit diagnostiseen käyttöön vuoden 2022 aikana. Laboratoriossa tehdään

myös aktiivisesti tieteellistä tutkimusta, esimerkkinä Alzheimer-analytiikan kehittämiseen ja muiden neurologisten sairauksien merkkiaineisiin liittyvät tutkimukset.

Summary

Biomarker Laboratory of the Brain Research Unit at the University of Eastern Finland is the only laboratory in Finland offering diagnostic service of biomarkers of Alzheimer's disease. Results from biomarker analysis facilitate correct and early identification of Alzheimer's disease. Until now, only CSF samples have been used in diagnostics, but the development of measurement technologies and new, more sensitive methods will enable the use of



KUVA 1. Alzheimerin taudin patologisten muutosten hypoteettinen aikajana (mukailtu (1))

Tarja Kokkola
Laatukoordinaattori, dos., FT,
Itä-Suomen yliopisto
tarja.kokkola@uef.fi



Sari Kärkkäinen
Projektikoordinaattori, FM,
Itä-Suomen yliopisto
sari.karkkainen@uef.fi



Sanna-Kaisa Herukka
Yliopistotutkija, LL, FT,
Itä-Suomen yliopisto
sanna-kaisa.herukka@uef.fi



also blood samples in the analysis of brain-derived biomarkers. Biomarker Laboratory aims at introducing the first blood tests for Alzheimer biomarkers for diagnostic use during 2022. The laboratory is also active in scientific research, for example in developing Alzheimer's disease analytics and markers of other neurological diseases.

Alzheimerin taudin merkkiaineet diagnoosin tukena

Biomarkkerilaboratorio sijaitsee Itä-Suomen yliopiston Kuopion kampuksella, sen kliinisen tutkimuskeskuksen aivotutkimusyksikössä. Biomarkkerilaboratorio on ainoa Alzheimerin taudin diagnostisia merkkiaineanalyysijä tekevä laboratorio Suomessa. Laboratorion diagnostinen palvelututkimusvalikoima kattaa tällä hetkellä kolme selkäydinnesteestä mitattavaa merkkiainetta eli biomarkkeria: tau-proteiini (Li- Tau), fosforyloitunut tau (P181, Li-FosTau) ja β -amyloidi -peptidi (Li-BAM42). Nämä kolme merkkiainetta kuvastavat Alzheimerin taudin aivopatologiaa (Kuva 1, (1)). Taudin varhaisvaiheesta lähtien β -amyloidin 42 aminohappoa pitkä muoto kertyy aivoihin solunulkoisiksi sakkaumiksi, amyloidiplakeiksi, jolloin selkäydinnesteen liukoinen β -amyloidipitoisuus (BAM42) vähenee. Tau on puolestaan hermosolun sisäinen rakenneproteiini, jota vapautuu hermosolujen kuollessa. Selkäydinnesteen tau-pitoisuus lisääntyykin useissa neurodegeneratiivisissa sairauksissa ja myös aivovammojen seurauksena. Taun kokonaismäärää spesifisempi biomarkkeri Alzheimerin taudille on fosforyloitunut tau (P181), joka on yksi taun ylifosforyloituneista alamuodoista. Alzheimerin taudille tyypillisiä aivopatologisia löydöksiä ovat näistä ylifosforyloituneista tau- proteiineista koostuvat hermosäikekimput, jotka vaurioittavat hermosoluja ja kiihdyttävät tautiprosessia.

Selkäydinnesteen merkkiaineet eivät ole ensisijaisia testejä Alzheimerin tautia epäiltäessä, eivätkä ne sovellu käytettäväksi seulontatesteinä. Potilaan kliininen taudinkuva on tärkein lähtökohta muistisairauden selvittelylle. Seuraavassa vaiheessa potilaalle tehdään kognitiivinen tutkimus ja aivo-

jen rakenteellinen kuvaus sekä poissuljetaan muut kognition heikkenemistä aiheuttavat syyt mm. verikokein. Jos diagnoosi on niiden jälkeen vielä epäselvä, suositellaan merkkiaineanalyysijä (2). Merkkiaineista voi olla hyötyä etenkin lieväoireisilla potilailla taudin varhaisvaiheessa ja potilailla, joilla on epätyypillinen taudinkuva. Niiden tulokset voivat myös auttaa erottamaan Alzheimerin taudin masennuksesta ja muista muistisairauksista.

Alzheimerin tauti on yleisin neurodegeneratiivinen muistisairaus Suomessa. β -amyloidi 42 -pitoisuuden väheneminen ja fosforyloituneen taun pitoisuuden merkittävä lisääntyminen liittyvät spesifisesti juuri Alzheimerin tautiin, eikä näissä kahdessa merkkiaineessa tapahdu yhtä suuria muutoksia muissa muistisairauksissa, kuten otsa-ohimolohkorappeumassa tai Lewyn kappale -taudissa. Sekapatologiat Alzheimerin taudin ja muiden sairauksien välillä ovat kuitenkin yleisiä, ja merkkiainetulosten tulkinta vaatii kliinistä kokemusta muistisairauksien diagnostiikasta (3). Kolmesta Alzheimer-merkkiaineesta epäspesifisin on Taun kokonaismäärä, joka nousee hermosolutuhon yhteydessä. Erittäin korkea tau-pitoisuus viittaa hyvin nopeaan hermosoluja tuhoavaan prosessiin, akuuttiin aivotapantumaa tai aivovaurioon; esimerkiksi nopeasti etenevässä prionisairaudessa Creutzfeldt-Jakobin taudissa tau-pitoisuudet voivat olla yli 10 kertaa suurempia kuin Alzheimerin taudissa (4).

Kokemuksen ja laadunvarmistuksen tärkeä rooli Alzheimer-analytiikassa

Biomarkkerilaboratoriolla on Alzheimerin taudin biomarkkereissa pitkä ja kattava kokemus. Tieteellisen tutkimuksen aloitti professori **Tuula Pirttilä** 1990-luvun alussa ja palvelututkimustoiminta aloitettiin vuonna 2004. Laboratorion johtaja **Sanna-Kaisa Herukka** on työskennellyt biomarkkerilaboratoriossa jo väitöskirjatutkimuksestaan lähtien. Myös laboratorion muilla työntekijöillä on pitkäaikainen kokemus Alzheimer-analytiikasta ja sen erityispiirteistä. Laboratorion diagnostinen palvelututkimustoiminta akkreditoitiin vuonna 2018 (SFS-EN ISO 15189).



→ Selkäydinnesteen Alzheimerin taudin biomarkkereiden analyysiin liittyviä epävarmuustekijöitä tunnetaan muutamia. Näistä eniten hankaluuksia aiheuttaa hydrofobisen β -amyloidi 42 -peptidin sitoutuminen sen kanssa kosketuksissa oleviin pintoihin, kuten putkiin ja pipetinkärkiin. Esimerkiksi näytteen siirtäminen putkesta toiseen vaikuttaa β -amyloidi 42 -pitoisuuteen alentavasti. Tämän muutoksen suuruutta ei voida luotettavasti arvioida näytekohtaisesti, koska sitoutumisen voimakkuuteen vaikuttavat näytteen sisäiset ominaisuudet ja ulkoiset tekijät. Sitoutuminen on vähäisintä polypropyyleeniin, mutta vaihtelee eri toimittajien polypropyyleeniputkien välillä. Sitoutuminen myös lisääntyy, kun selkäydinnesteen tilavuus on pieni verrattuna putken kokoon. Laajan kansainvälisen tutkimusprojektin pohjalta tehtyjen suositusten mukaan β -amyloidi 42 -näytteille tuleekin käyttää vain validoituja näyteputkia ja näytetilavuuden on oltava riittävän suuri. Lisäksi selkäydinnestenäyte tulisi kerätä, lähettää ja analysoida samassa putkessa (5). Biomarkkerilaboratorion preanalyttinen ohjeistus ja näytteen käsittely on päivitetty vastaamaan uusimpia suosituksia ja biomarkkerilaboratorio myös toimittaa validoituja näyteputkia asiakkailleen.

Selkäydinnestenäytteiden analysointi tehdään immunokemian analyysointilaitteilla elektrokemiluminometrisilla menetelmillä (ECLIA, Roche Elecsys (6, 7)). Tau-analyysissä voidaan käyttää lisäksi ELISA-mittauksia, joilla saadaan selville tarkasti korkeat tau-pitoisuudet. Biomarkkerilaboratorion käyttämät normaalin ja patologisen raja-arvot on määritetty omien tutkimusten perusteella suomalaiselle väestölle sopiviksi. Sisäisessä laaduntarkkailussa käytetään kaupallisten kontrollien lisäksi koostumukseltaan testattavaa potilasmateriaalia vastaavia itse valmistettuja selkäydinnestekontrolleja. Laboratorio on aktiivisesti mukana Alzheimer's Associationin



KUVA 2. Biomarkkerilaboratorion Simoa HD-X analysaattori

toiminnassa ja on osallistunut tämän virallisen tutkijayhteisön järjestämiin laaduntarkkailukierroksiin niiden alusta lähtien (vuodesta 2009) (8).

Toiminnan kehittäminen tieteellisen tutkimuksen avulla

Laboratoriossa pyritään pysymään kehityksen eturintamassa uusien merkkiaineiden ja uusien analyysimenetelmien suhteen. Tieteellistä tutkimusta tehdään yhteistyössä kotimaisten ja kansainvälisten tutkimusryhmien kanssa. Tutkimusaiheina ovat mm. Alzheimerin taudin diagnostiset kriteerit, muistisairauksien erotusdiagnostiikka, tunnettujen biomarkkerien analytiikan kehitys sekä uudet biomarkkerit (esim. (9)). Lähimmät yhteistyökumppanit löytyvät joko samasta rakennuksesta (Kansallinen Neurokeskus, Aivotutkimusyksikön muut tutkimusryhmät) tai kadun allttavan tunnelin päästä (Kuopion yliopistollisen sairaalan neurologia ja neurokirurgia).

Uusia tuulia biomarkkerilaboratoriossa

Itä-Suomen yliopiston Aivotutkimusyksikön Biomarkkerilaboratoriossa on käytössä Quanterixin valmistama Simoa (Single Molecule Array) -mittausteknologia. Simoa-analysaattori on erittäin herkkä digitaalinen ELISA-laitte. Sillä pystytään määrittämään erilaisia biomarkkereita pikogrammojen pitoisuuksina sekä plasma- että seeruminäytteistä. Menetelmä perustuu magneettihelmien pinnalla tapahtuvaan ELISA-reaktioon. Magneettihelmet päällystetään spesifisellä sieppaajavasta-aineella, joka sitoo tutkittavan biomarkkeriproteiinin näytteestä. Reaktioon lisätään biotinyloitu sekundaarivasta-aine ja streptavidini- β -galaktosidaasientsyymi, jolloin magneettihelmen pinnalle muodostuu immunokompleksi biomarkkeriproteiinista, sekundaarivasta-aineesta ja entsyymistä. Alhaisilla pitoisuuksilla yksi magneettihelmi sitoo yhden tai ei yhtään immunokompleksia, suuremmilla pitoisuuksilla niitä voi sitoutua useita. Mittausta varten magneettihelmet ladataan Simoa-levyille, joissa on yli 200 000 mikroaivoa. Yhteen mikroaivoon mahtuu yksi magneettihelmi. Kaivoihin lisätään fluoresoiva substraatti ja syntyvä fluoresenssi kuvataan. Alhaiset biomarkkeriproteiinin pitoisuudet määritetään digitaalisesti vertaamalla fluoresoivien ja fluoresoimattomien kaivojen suhdetta, kun fluoresoivien kaivojen osuus on alle 70 %. Suuremmilla pitoisuuksilla käytetään fluoresenssin analogista mittausta (10).

Tällä hetkellä biomarkkerilaboratoriossa on validoitu tutkimuskäyttöön neurofilamentin kevytketjun NfL:n määrittäminen Simoalla ihmisen seeruminäytteistä. NfL (neurofilament light) on hermosolun rakenneproteiini, joka ylläpitää hermosolun muotoa ja viejähaarakkeiden läpimittaa. Hermosolun tuhoutuessa NfL pääsee vapautumaan solun ulkopuolelle ja lopulta verenkiertoon. Useissa aivoja rappeuttavissa sairauksissa veren NfL-pitoisuus nousee (11). Aiemmin NfL:a on pystytty mittaamaan selkäydinnestenäytteistä perinteisillä ELISA-menetelmillä. Herkän Simoa-teknologian myötä on avautunut mahdollisuus määrittää NfL verinäytteistä, mikä mahdollistaa helpomman näytteenoton neurologisten sairauksien diagnosointiin ja seurantaan.

Kohonneita veren NfL-arvoja tavataan mm. Alzheimerin taudissa, Lewyn kappale-taudissa, otsa-ohimolohkorapeudessa ja MS-taudissa (12). NfL:n määrittäminen seerumista voidaan käyttää neurologisten oireiden ilmaantuessa varhaisen vaiheen erotusdiagnostiikassa. Menetelmällä voidaan var-

Uusi laite mahdollistaa NfL-diagnostiikan validoinnin diagnostiseen käyttöön. NfL:n määrittäminen seerumista Simoa- menetelmällä validoidaan diagnostiseen käyttöön näillä näkymin syksyyn 2022 mennessä. Se tarkoittaa sitä, että lähitulevaisuudessa tulemme tarjoamaan sairaaloille kautta maan mahdollisuuden tilata meiltä NfL- määrittäksen seerumista diagnostisena palvelututkimuksena.

mentaa, onko kyseessä aivoja rappeuttava sairaus, jolloin seerumin NfL-pitoisuus on koholla vai esimerkiksi psykiatrisen sairaus, jolloin seerumin NfL-pitoisuus on matala (13, 14). Lisäksi NfL-pitoisuuden määrittäminen seerumista voisi toimia oivana seurantamenetelmänä esimerkiksi taudin kehityksen ja lääkityksen tehon seurannassa.

Tänä keväänä hyppäsimme askeleen eteenpäin NfL-diagnostiikan laadussa ja tarkkuudessa, kun saimme käyttöömmme uuden Simoa HD-X-analysaattorin, joka on ensimmäinen laite laatuaan Suomessa. Uusi laite mahdollistaa NfL-diagnostiikan validoinnin diagnostiseen käyttöön. NfL:n määrittäminen seerumis-

ta Simoa- menetelmällä validoidaan diagnostiseen käyttöön näillä näkymin syksyyn 2022 mennessä. Se tarkoittaa sitä, että lähitulevaisuudessa tulemme tarjoamaan sairaaloille kautta maan mahdollisuuden tilata meiltä NfL- määrittäksen seerumista diagnostisena palvelututkimuksena.

Simoa-menetelmällä on mahdollista määrittää seerumista tai plasmasta myös useita muita biomarkkereita kuten esimerkiksi FosTau, TDP-43 ja GFAP (14, 15). Näitä biomarkkereita olemme jo määrittäneet tieteellisten tutkimusten yhteydessä ja myös näitä tullaan tulevaisuudessa harkitsemaan tuleviksi diagnostisiksi palvelututkimuksiksi. ■

Kirjallisuus

1. Tienari P, Myllykangas L, Polvikoski T, et al. Alzheimerin taudin patogeneesi. Kirjassa Erkinjuntti T, Remes A, Rinne J, Soininen H, toim. Muistisairaudet. Kustannus Oy Duodecim 2018. Muistisairaudet. Käypä hoito -suositus. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2021 (viitattu 25.4.2022). www.kaypahoito.fi
2. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2018;14:535-62.
3. Lattanzio F, Abu-Rumeileh S, Franceschini A, et al. Prion-specific and surrogate CSF biomarkers in Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic accuracy in relation to molecular subtypes and analysis of neuropathological correlates of p-tau and Aβ42 levels. *Acta Neuropathol* 2017;133:559-78.
4. Hansson O, Rutz S, Zetterberg H, et al. E. Pre-analytical protocol for measuring Alzheimer's disease biomarkers in fresh CSF. *Alzheimers Dement* 2020;12:e12137.
5. Bittner T, Zetterberg H, Teunissen CE, et al. Technical performance of a novel, fully automated electrochemiluminescence immunoassay for the quantitation of β-amyloid (1-42) in human cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement* 2016;12:517-26.
6. Lifke V, Kollmorgen G, Manuilova E, et al. Elecsys Total-Tau and Phospho-Tau (181P) CSF assays: Analytical performance of the novel, fully automated immunoassays for quantification of tau proteins in human cerebrospinal fluid. *Clin Biochem* 2019;72:30-8.
7. The Alzheimer's Association QC program for CSF and blood biomarkers. <https://www.gu.se/en/neuroscience-physiology/the-alzheimers-association-qc-program-for-csf-and-blood-biomarkers> (viitattu 25.4.2022).
8. Vanninen A, Nakajima M, Miyajima M, et al. Elevated CSF LRG and Decreased Alzheimer's Disease Biomarkers in Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. *J Clin Med* 2021;10:1105.
9. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol* 2010;28:595-9.
10. Gordon BA. Neurofilaments in disease: what do we know? *Curr Opin Neurobiol* 2020;61:105-15.
11. Chouliaras L, Thomas A, Malpetti M, et al. Differential levels of plasma biomarkers of neurodegeneration in Lewy body dementia, Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2022 Jan 25;jnnp-2021-327788.
12. Katisko K, Cajanus A, Jääskeläinen O, et al. Serum neurofilament light chain is a discriminative biomarker between frontotemporal lobar degeneration and primary psychiatric disorders. *J Neurol* 2020;267:162-7.
13. Solje E, Benussi A, Buratti E, et al. State-of-the-Art Methods and Emerging Fluid Biomarkers in the Diagnostics of Dementia - A Short Review and Diagnostic Algorithm. *Diagnostics* 2021;11:788.
14. Katisko K, Cajanus A, Huber N, et al. GFAP as a biomarker in frontotemporal dementia and primary psychiatric disorders: diagnostic and prognostic performance. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2021;92:1305-12.