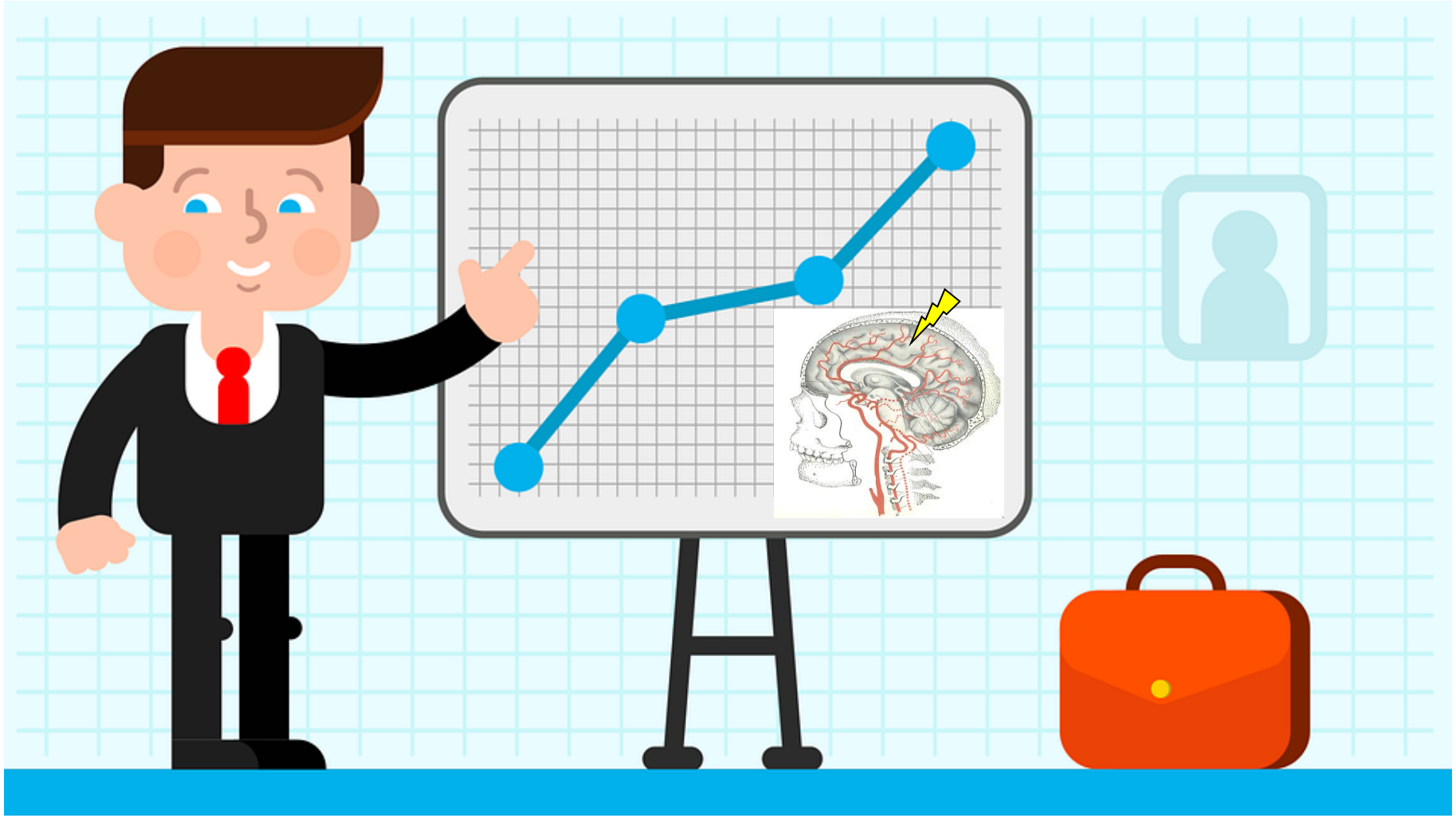
Den vetenskapliga utvecklingen inom strokeområdet



231024

STROKE CENTRUM VÄST

Lars Rosengren
Föreståndare CSV

Neuromarkörerna GFAp (glial fibrillary acidic protein) och NFL (neurofilament light) ur ett historiskt perspektiv

231024

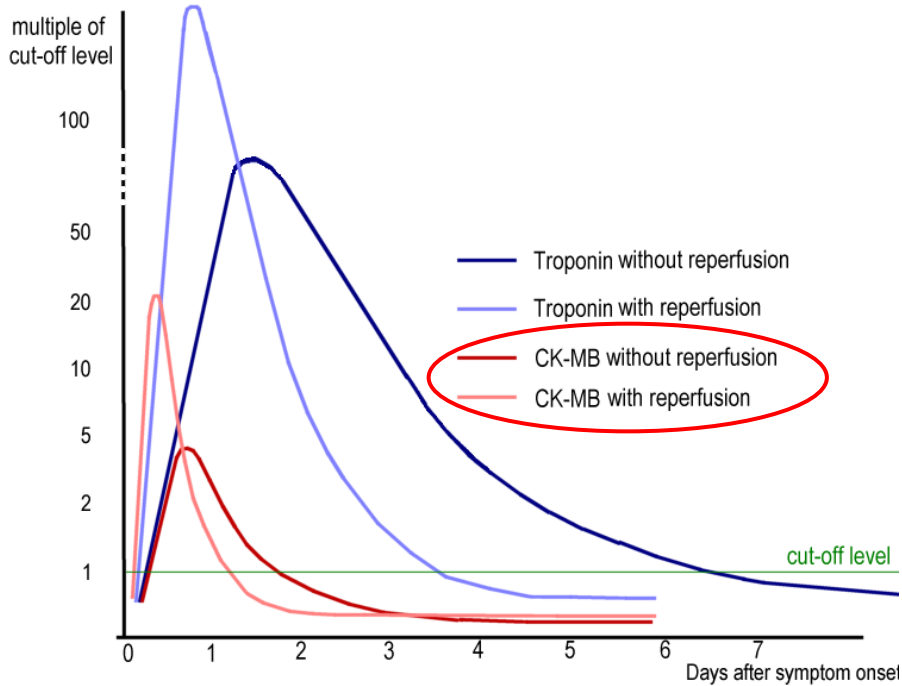
STROKE CENTRUM VÄST

Lars Rosengren
Föreståndare CSV

På 70-talet- fanns inga hjärnspecifika biomarkörer för sönderfall av hjärnvävnad som kunde mätas i plasma

Jmf CKMB vid hjärtinfarkt.
Motsvarande möjlighet borde finnas för sönderfall av hjärnan, t ex vid stroke

Min målsättning var då att starta utvecklingen av metoder för att mäta hjärnspecifika biomarkörer i vävnad, CSF och på sikt plasma.

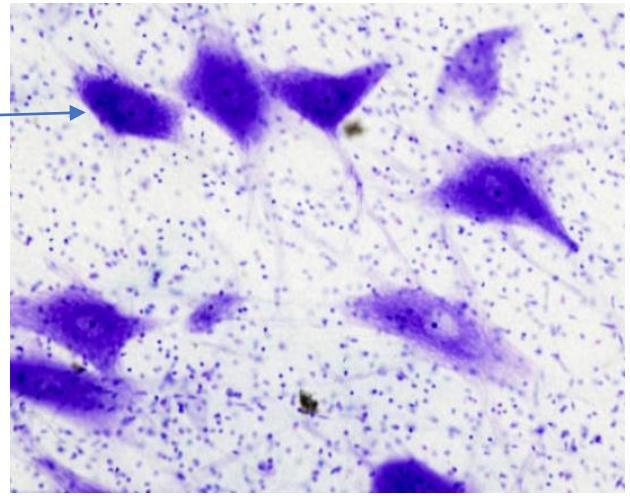


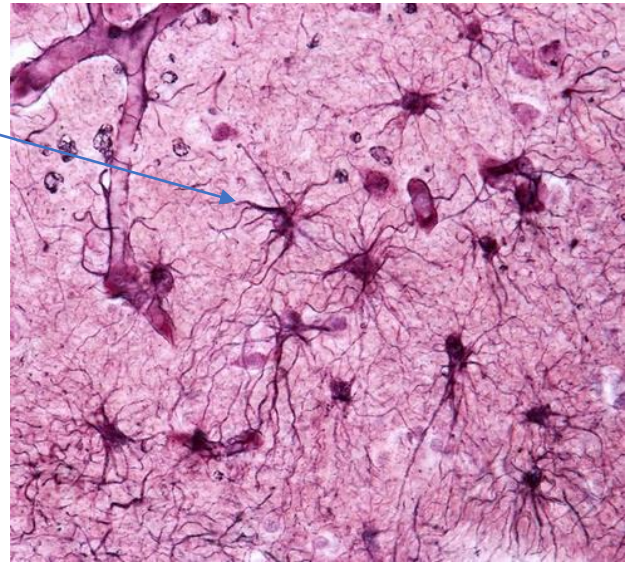
Centrala nervsystemets celler:

Nerveceller

Gliaceller

- Astrocyter
- Mikroglia
- Oligodendrocyter
- Ependymceller



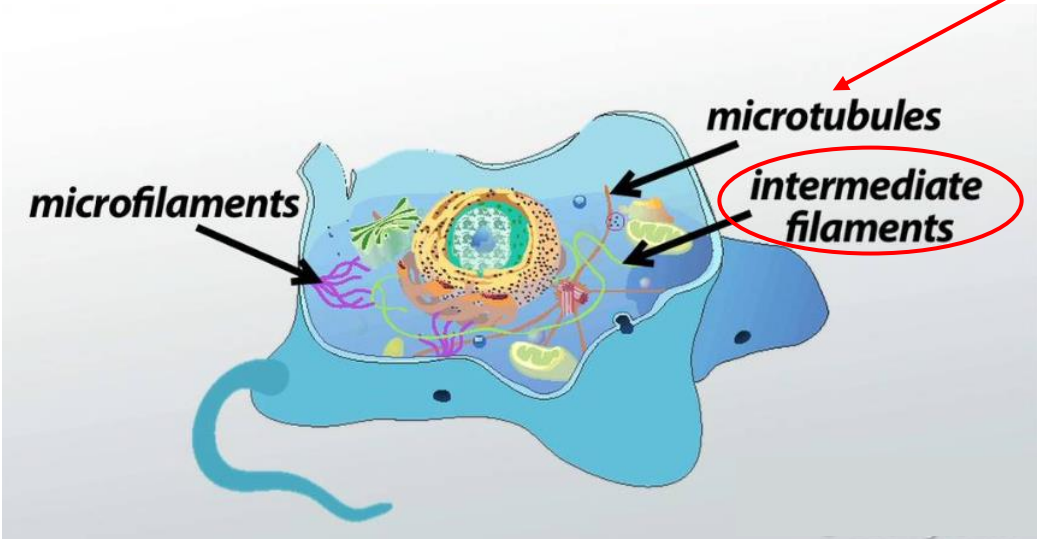


Intermediärfilament är viktiga strukturer i nervceller och astrocyter

Intermediärfilament:

- Neurofilament
- Gliafilament

kopplat till Tau (tubulin associated unit)



STROKE CENTRUM VÄST

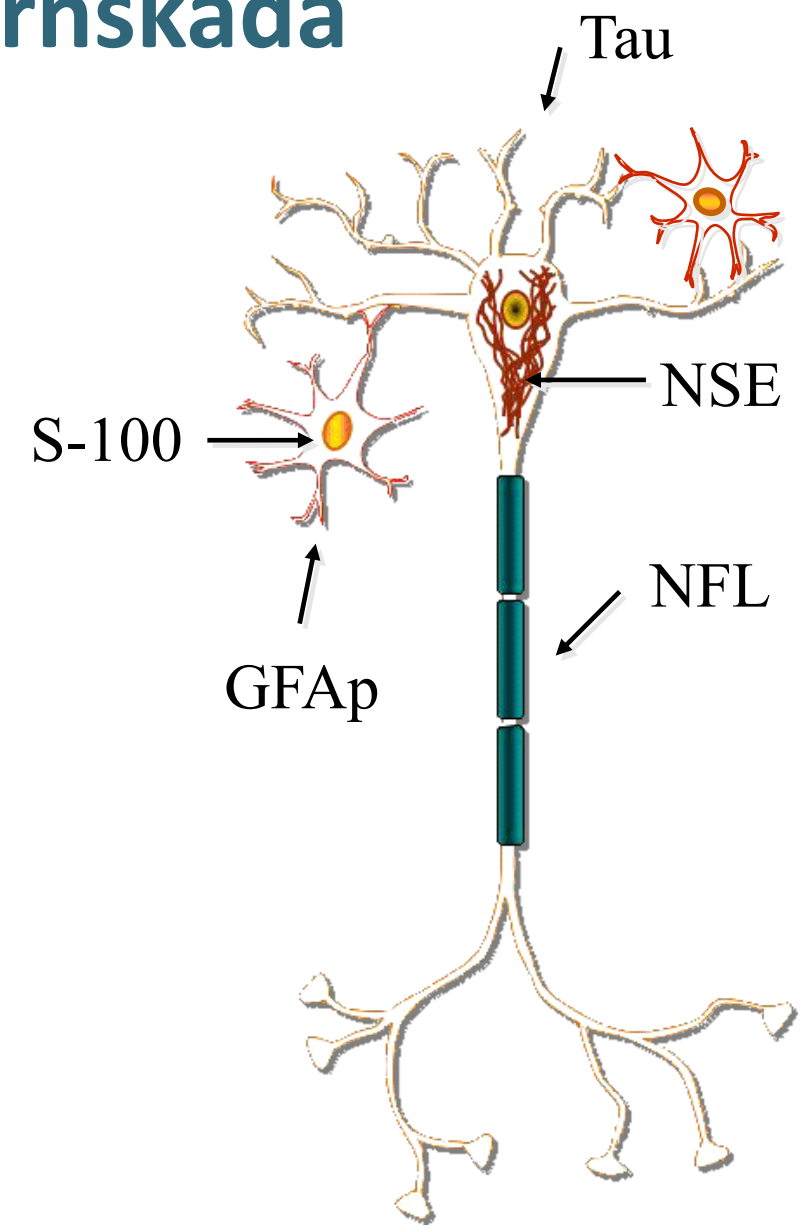
Biokemiska markörer för hjärnskada

NFp (Neurofilament proteins)

- **NFL**
- **NFM**
- **NFH**

GFAp (Glial fibrillary acidic protein)

Tau (tubulin associated unit)
NSE (neuronspecifikt enolas)
S-100



Till slutet av 70-talet- fanns inga hjärnspecifika biomarkörer för nervceller eller astrocyter som kunde kvantifieras i vare sig vävnad, CSF eller serum

GFAp: RIA (radioimmunoassay) Palfreyman et al -79; ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Rosengren et al -84)
NFL: ELISA Karlsson et al -89

S100B som finns i astrocyter är inte hjärnspecifik (fettvävnad, brosk, hud)

NSE (neuronspecifikt enolas) som finns i nerveller är inte hjärnspecifik (erytrocyter, trombocyter)

Tau protein (tubulin associated unit) är hjärnspecifik, kom -95 (Blennow et al)

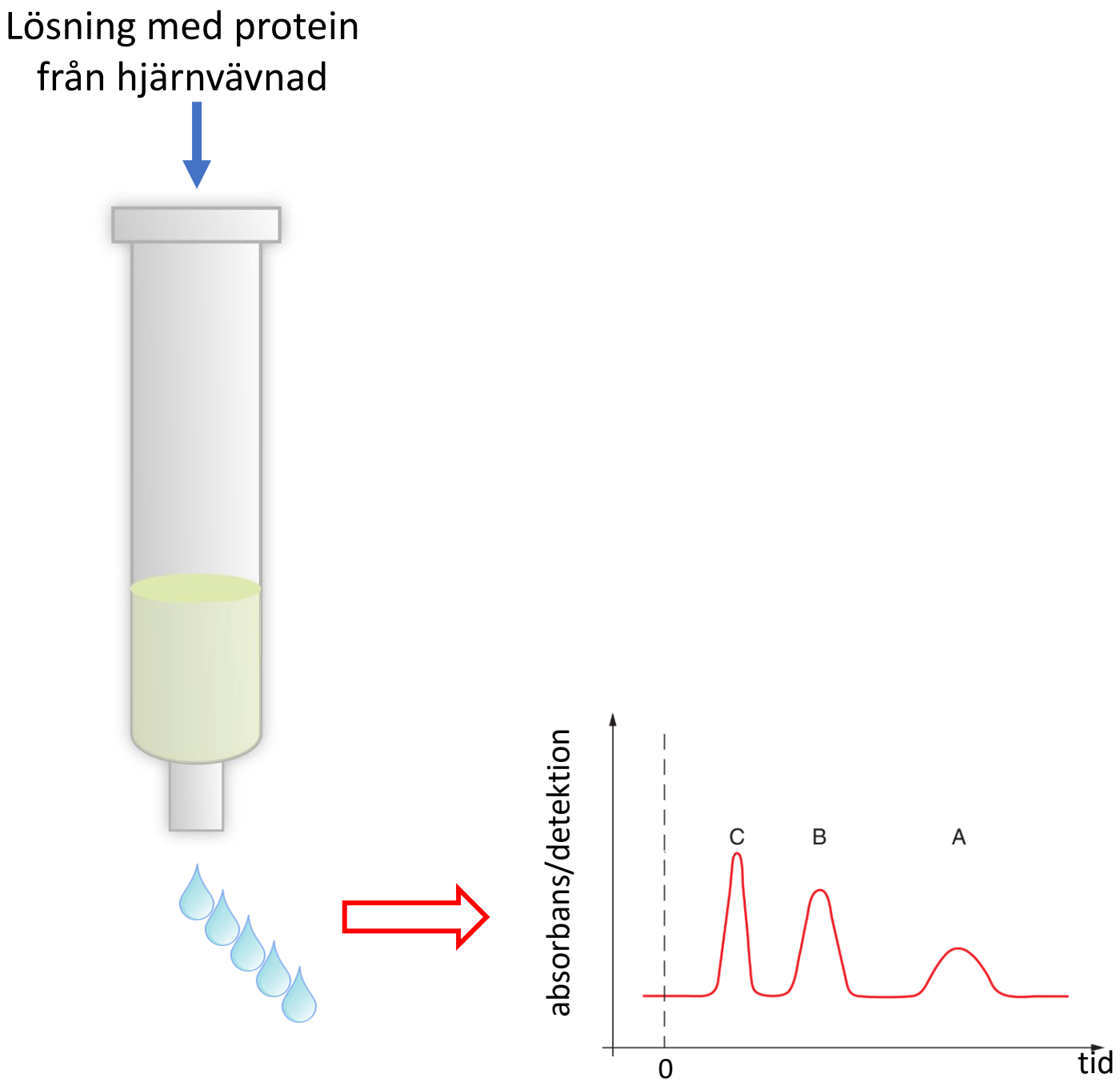
Framtagande av resp protein

NFL: Karlsson J-E et al -87

GFAp: Rosengren et al -85

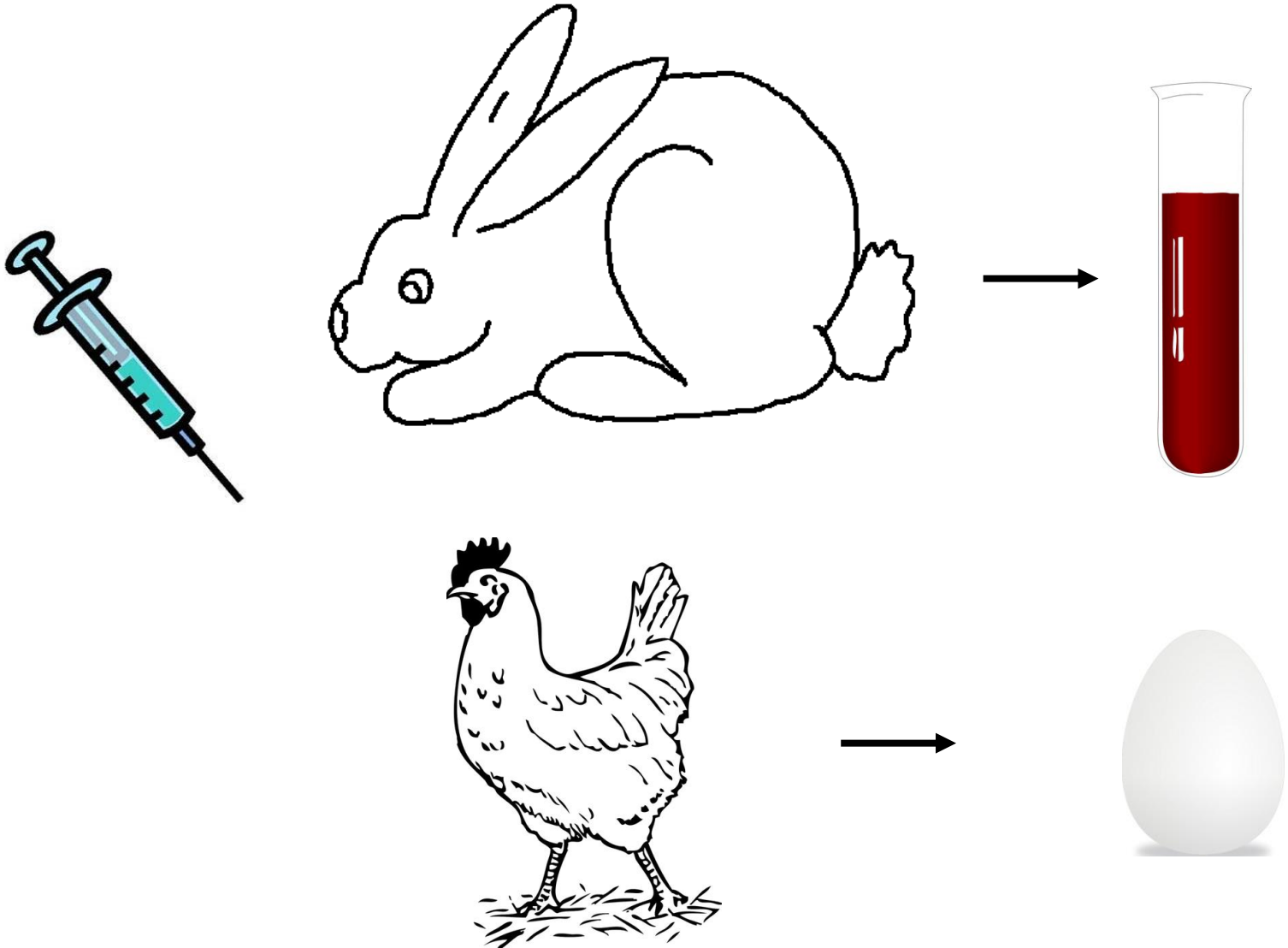
Ur hjärnvävnad olika species

Olika protein separerades kromatografiskt



Framtagande av polyklonala antikroppar

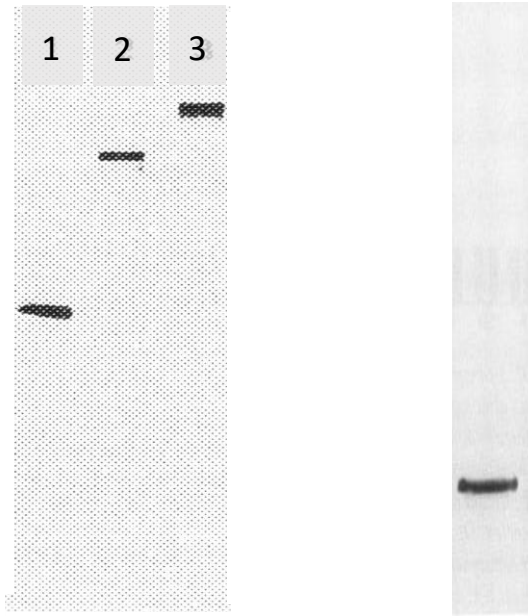
Immunising med NFL, NFM, NFH och GFAp



Immunoblot med respektive antikropp efter SDS-polyakrylamid-elektrofores av hjärn-homogenat

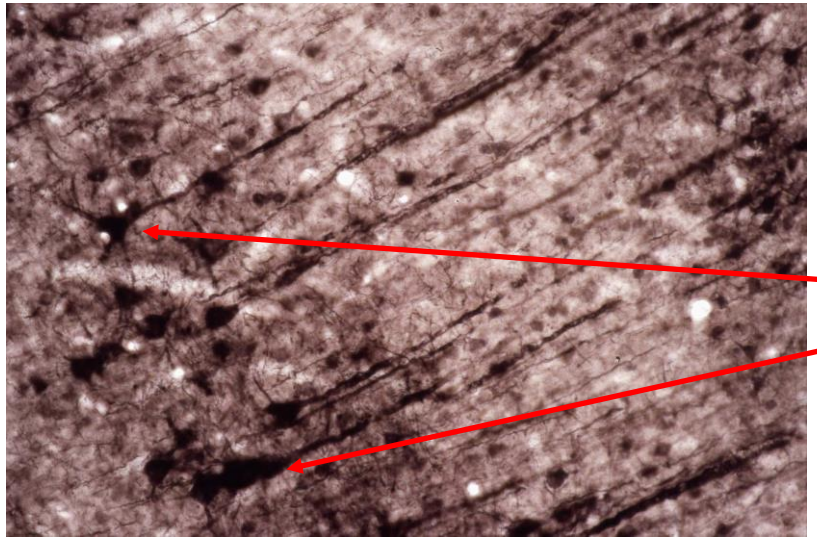
1 aNFL
2 aNFM
3 aNFH

aGFAp

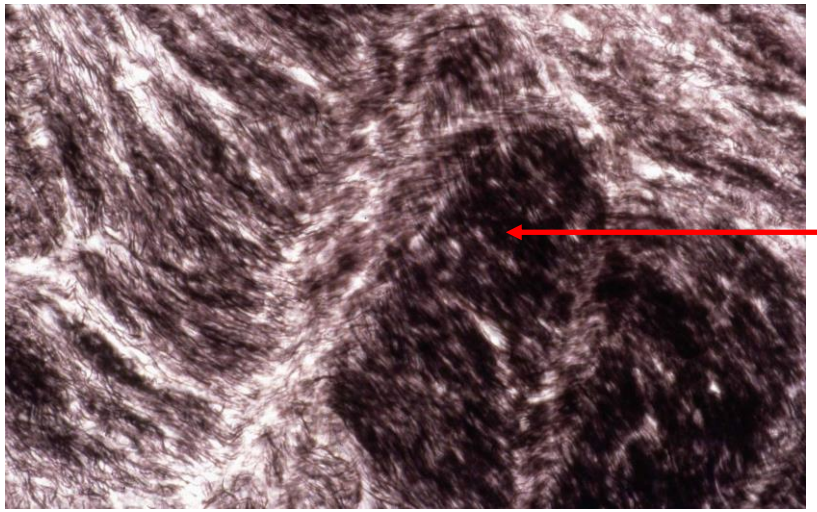


Immunhistokemisk karakterisering

aNFL

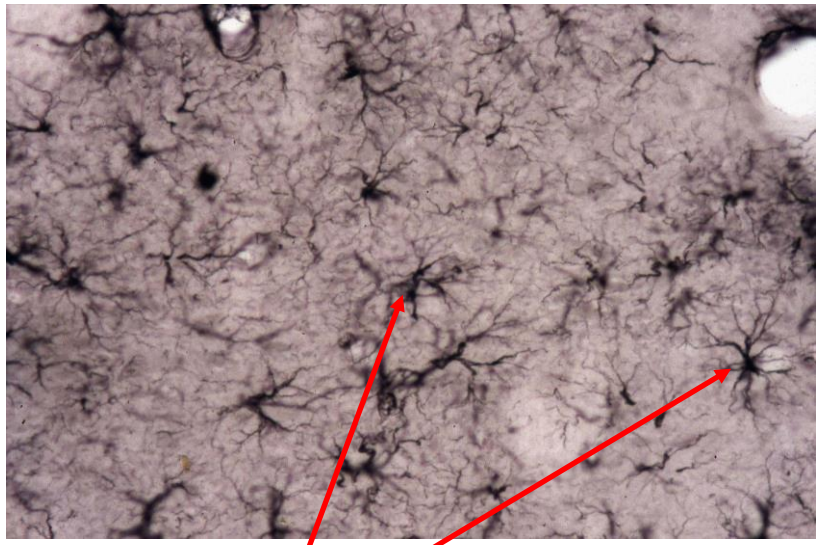


neuron i grå substans



axon i vit substans

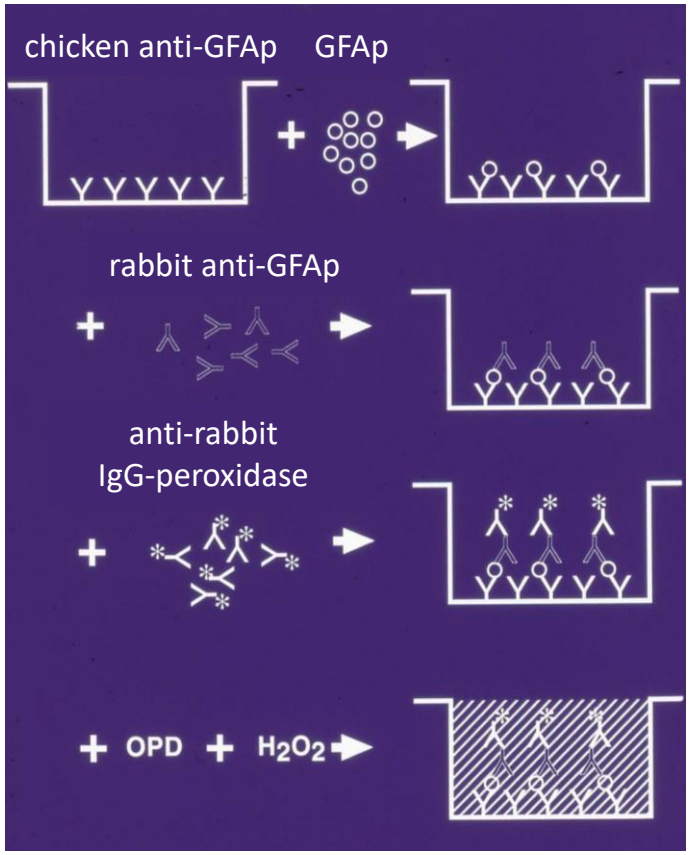
aGFAp

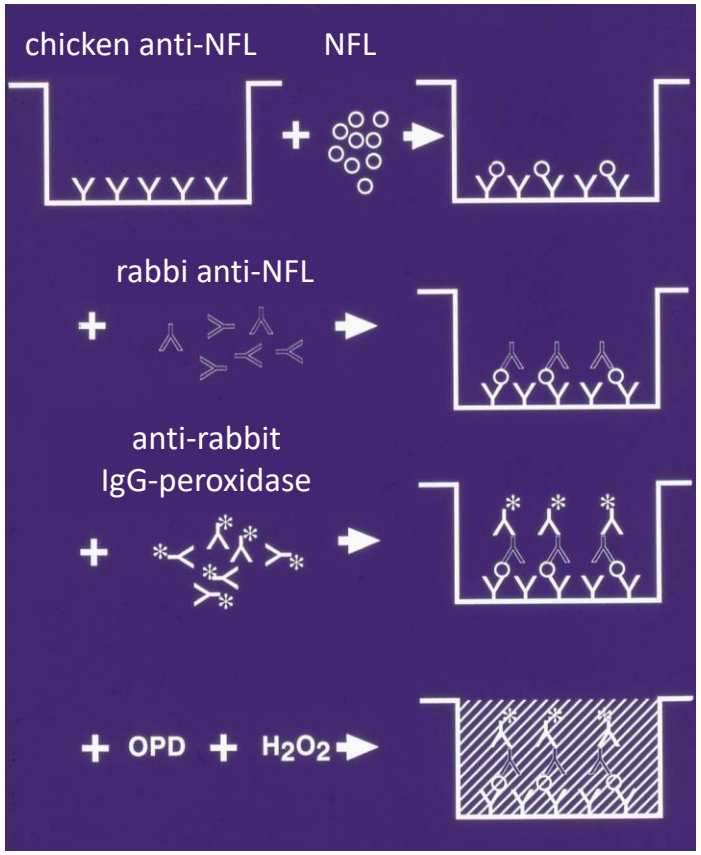


astrocyter i vit substans

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Utvecklades för att kvantifiera GFAp och NFL





Numera monoklonala antikroppar och känsligare metoder.

En ständig utveckling pågår.

Analyser av parenkymskademarkörer i cerebro-spinalvätska som idag kan beställas via Neurokemi SU Mölndal

Csv-NFL ELISA
Csv-GFAp ELISA
Csv-Tau

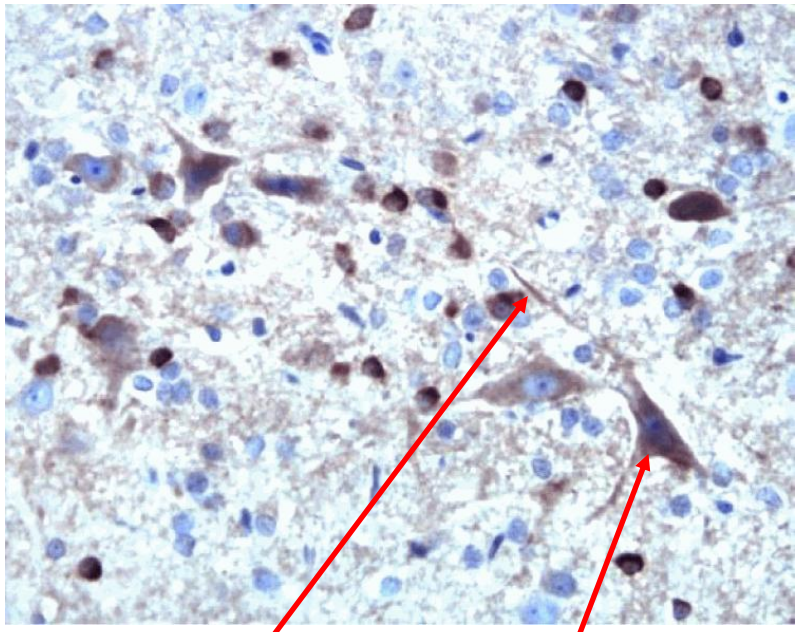
Om Csv-S100 önskas går det att beställa separat

Tau protein

Strukturprotein (mikrotubuliassocierat)

Dendriter
Finns i nervceller

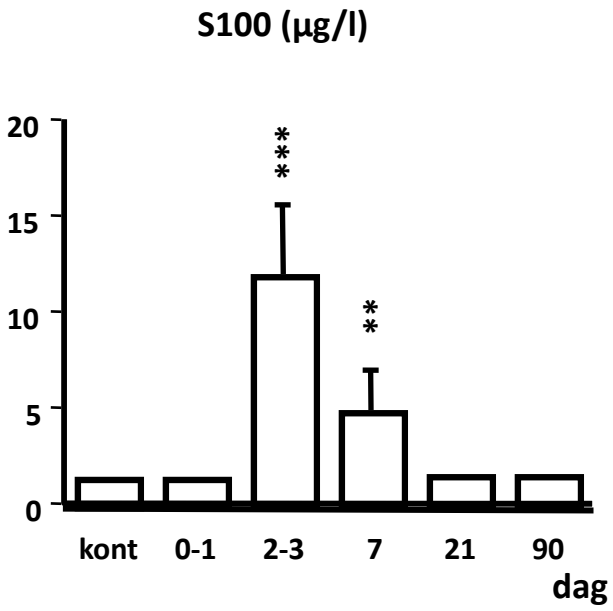
Axonalt (fr a omyeliniserade axon)

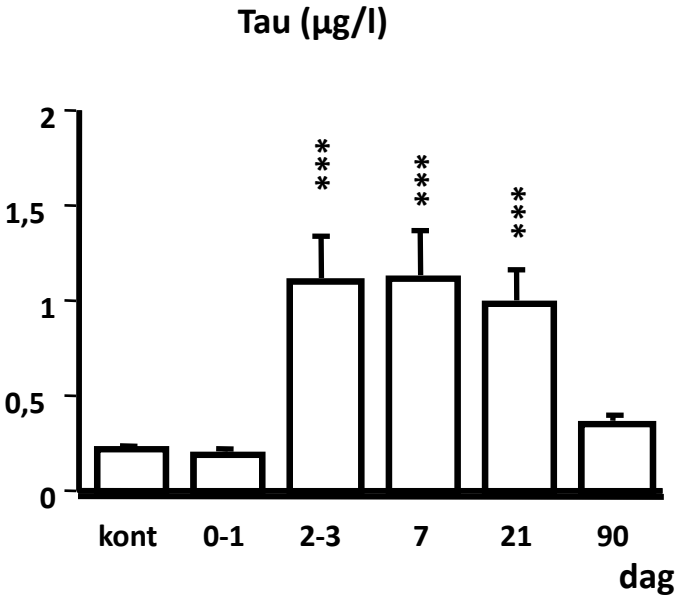


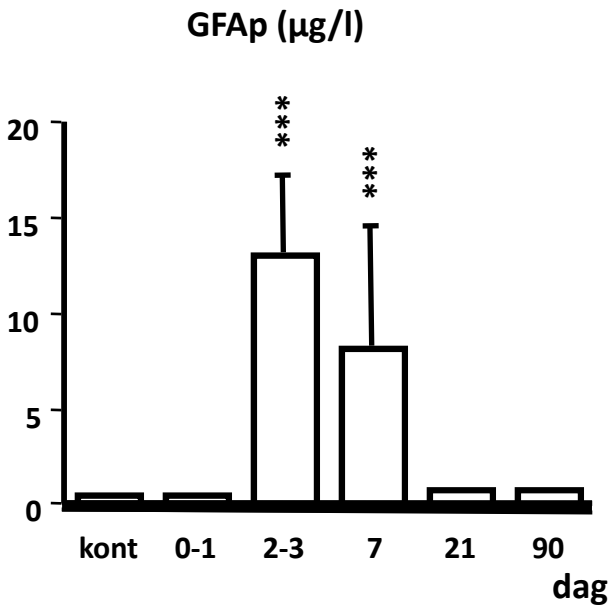
dendrit nervcell

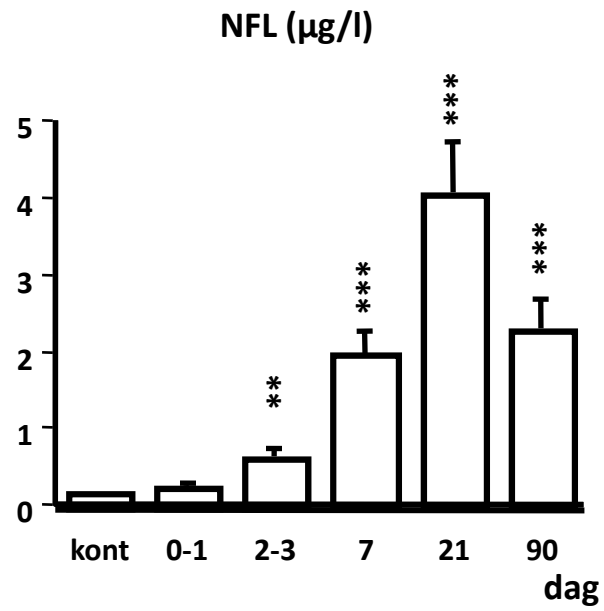
Kaj Blennow, Henrik Zetterberg

Parenkymskademarkörer i CSF efter cerebrala infarkter









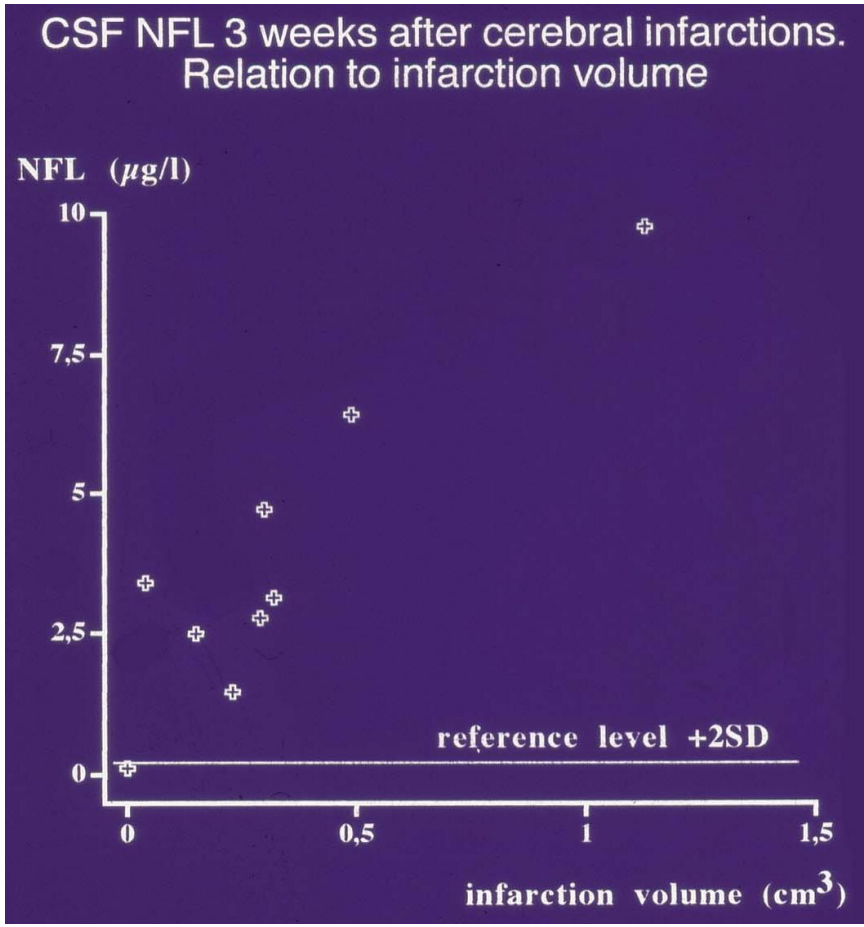
CSF-infarktstudien

Infarktvolym MR 2-3 månader poststroke

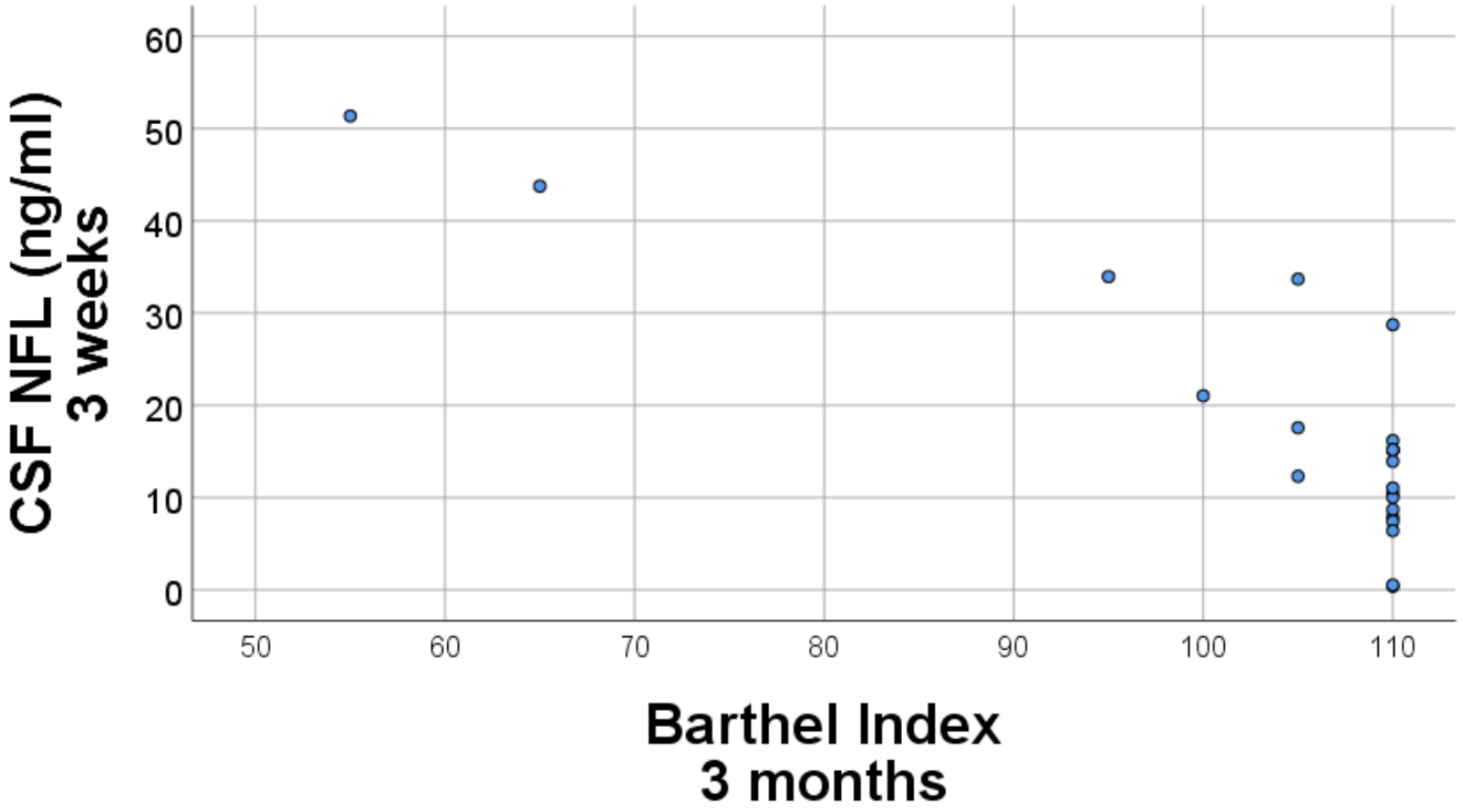
Alla biomarkörerna korrelerar till infarktvolym:

	day 0-1		day 2-3		day 7		day 21		day 90	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
GFAp	0,12	ns	0,7	p < ,001	0,65	p < ,01	0	ns	-0,26	ns
S100	0,1	ns	0,76	p < ,001	0,75	p < ,001	0,25	ns	-0,09	ns
NFL	-0,54	ns	0,01	ns	0,39	ns	0,67	p < ,01	0,67	p < ,01

CSF-Tau concentrations at the time of maximal release correlated with the relative size of the infarctions (r = 0.95, p < 0.01)
Hesse et al 2020



Biomarkörerna korrelerar också till outcome efter stroke



Hesse et al 2000

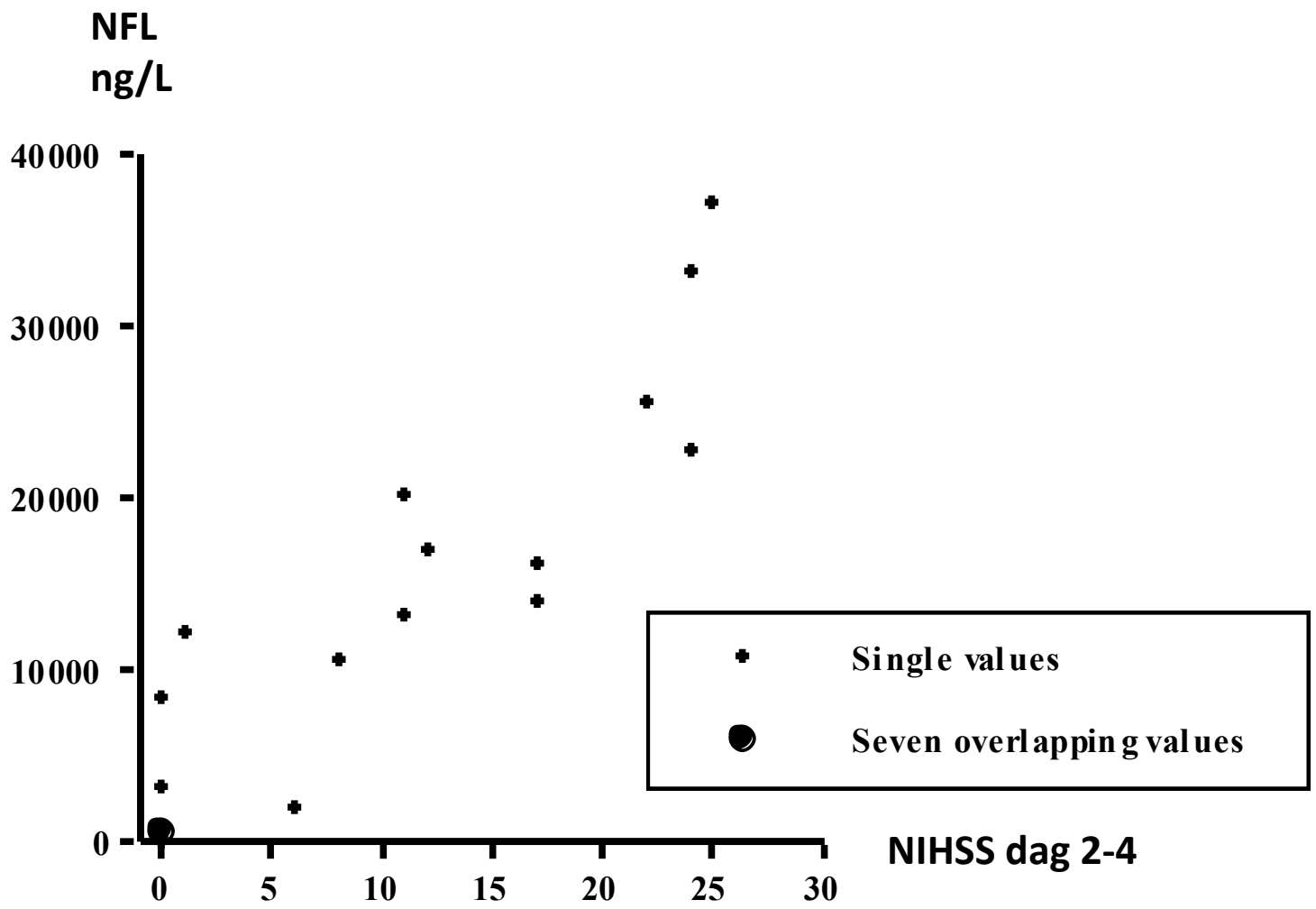
CSF-infarktstudien

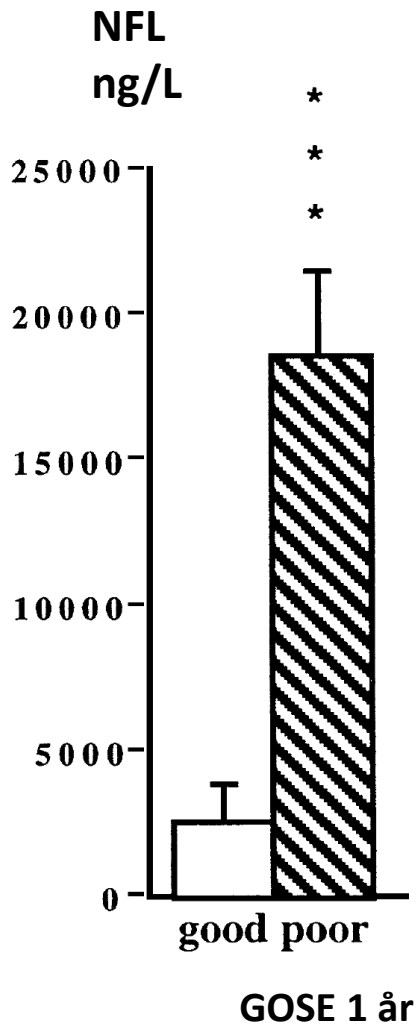
Exempel på andra tillstånd med akut sönderfall av hjärnvävnad

Anoxisk encephalopathy (t ex hjärtstopp)
Subaraknoidalblödning
Multiple sclerosis
Trauma

Hjärtstopp NFL i CSF 2 veckor efter

CSF-NFL två veckor efter hjärtstopp i relation till klinik

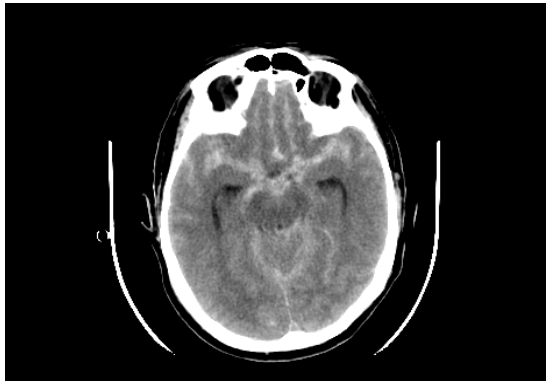


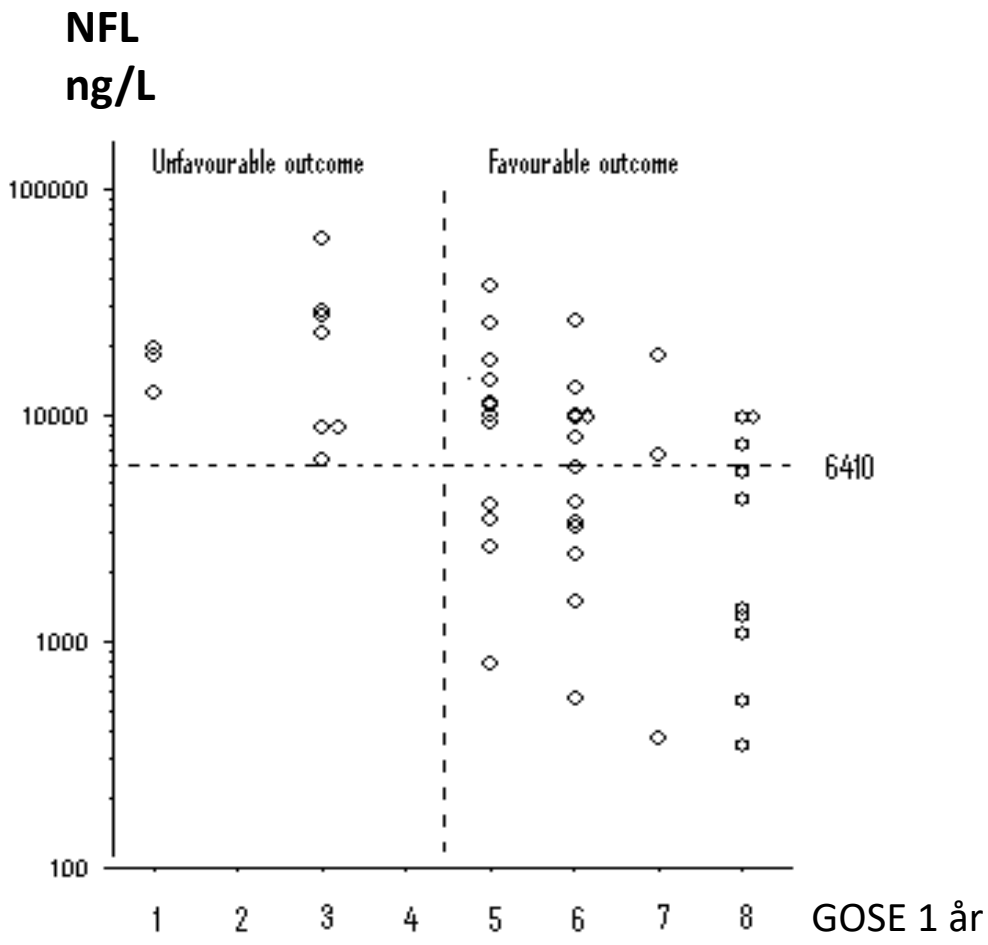


Rosén et al et al 2004

Subaraknoidablödning

CSF-NFL två veckor efter SAB i relation till klinik



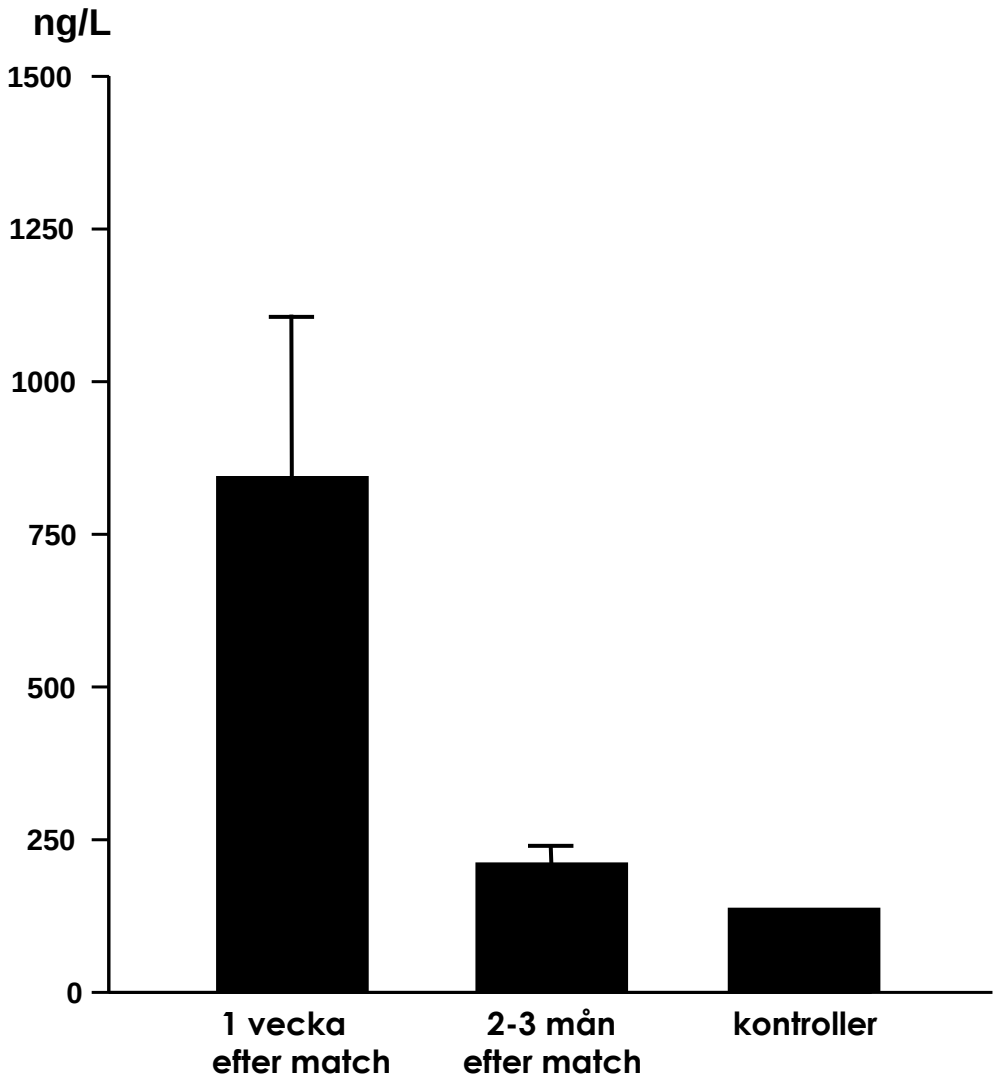


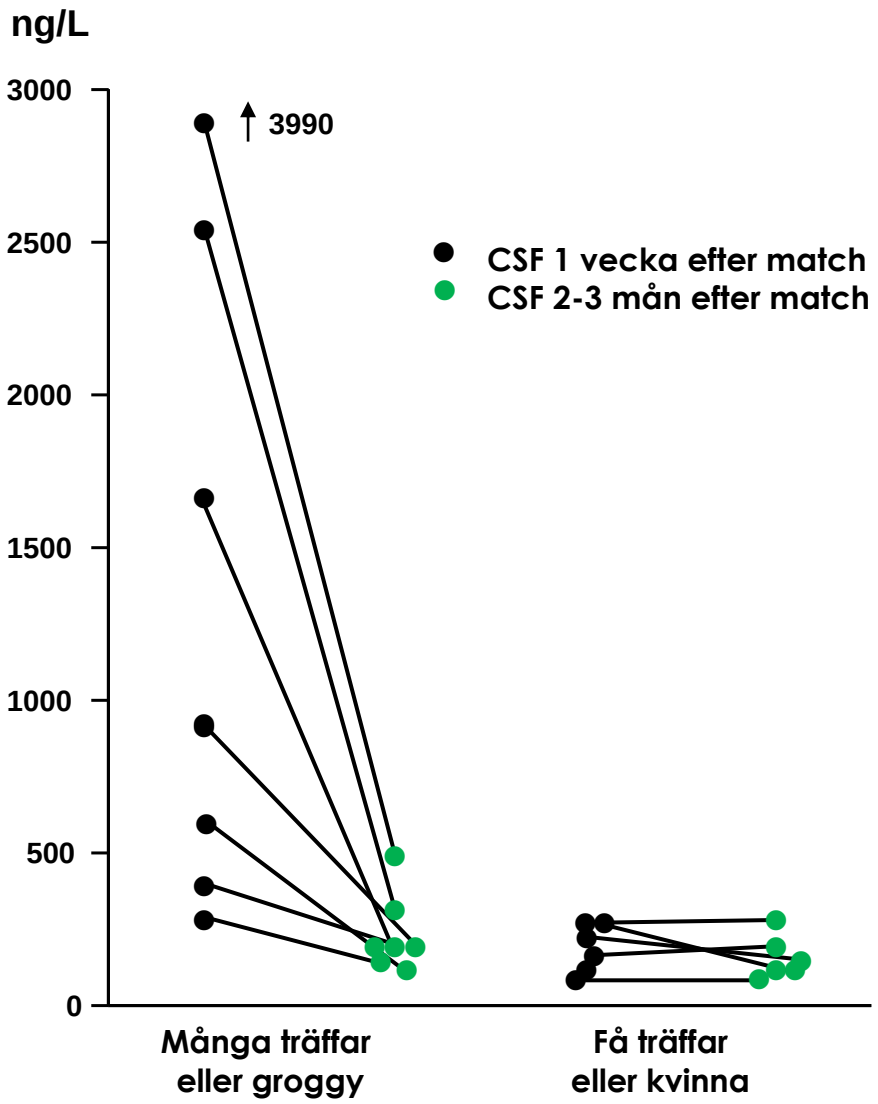
CSF–NFL korrelerade också till NIHSS vid 2 veckor

Nylén et al 2006

CSF-NFL efter cerbralt trauma/lättare hjärnskakning

Amatörboxare, n= 14 Kontroller, n= 10

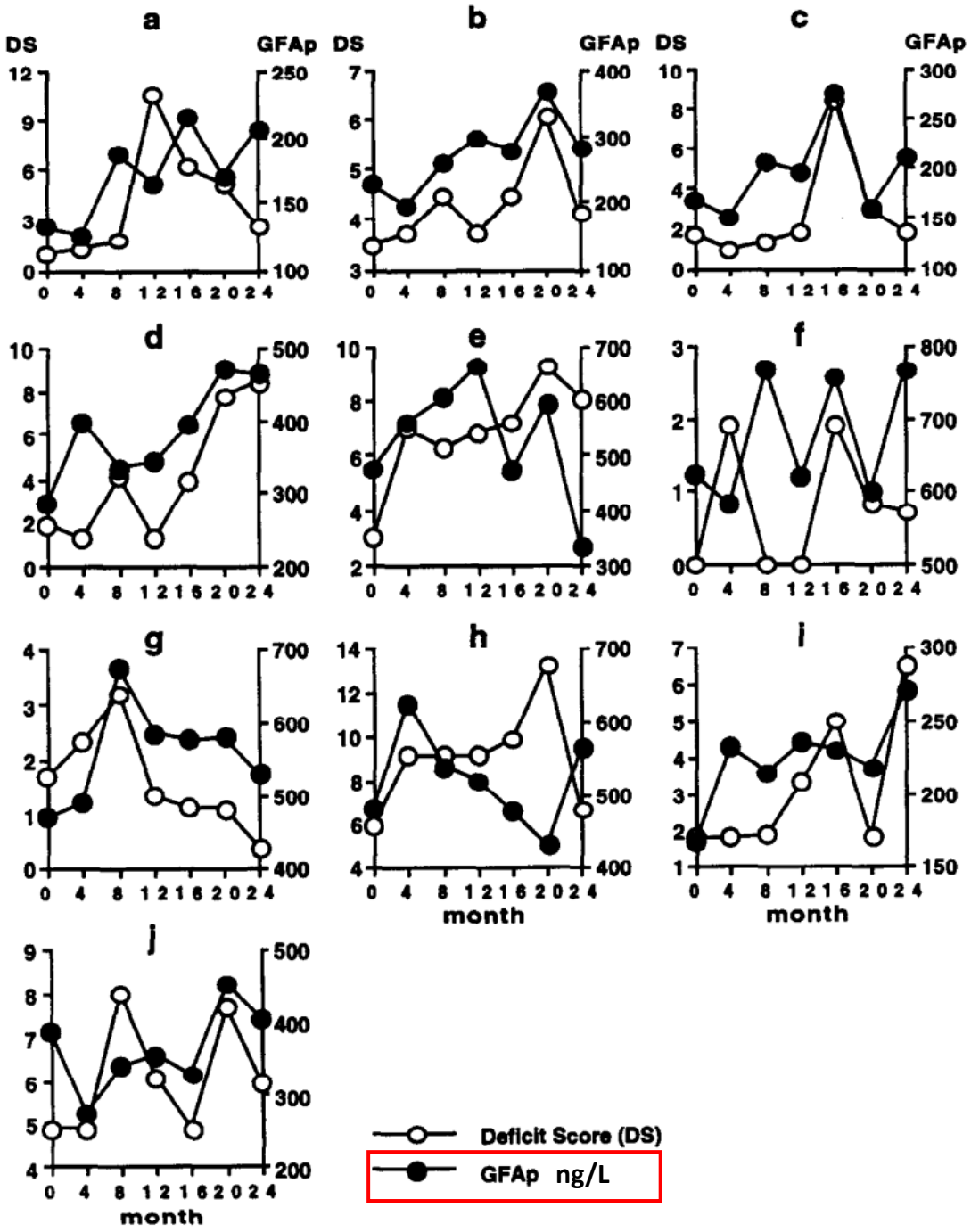




GFAp 1 vecka är också förhöjt jmf 2-3 mån och kontroller
Tau 1 vecka är förhöjt jmf 2-3

Zetterberg et al 2006

CSF-GFAp från MS pat (relapsing-remitting) uppföljda med LP 2 år

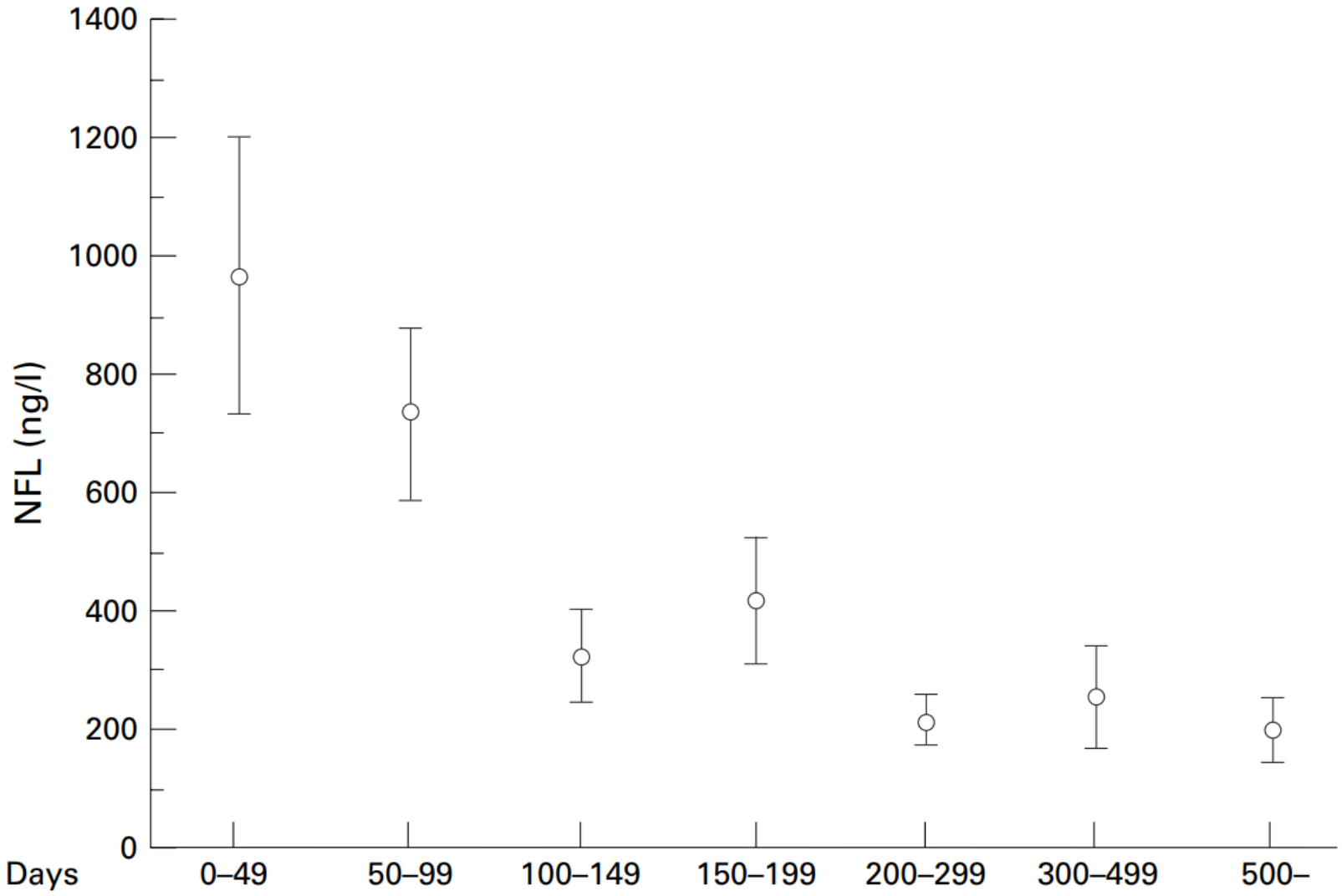


10 MS patienter (a-j) med en komplett serie (n = 7) lumbalpunktioner och klinisk undersökning under en 24-månaders period

Varierande GFAp nivåer liksom Deficit-Score men ingen signifikant korrelation (p>0,05)

CSF-NFL från MS pat (relapsing-remitting) efter ett skov

NFL i relation till tid (dagar) från starten av föregående skov hos 60 patienter



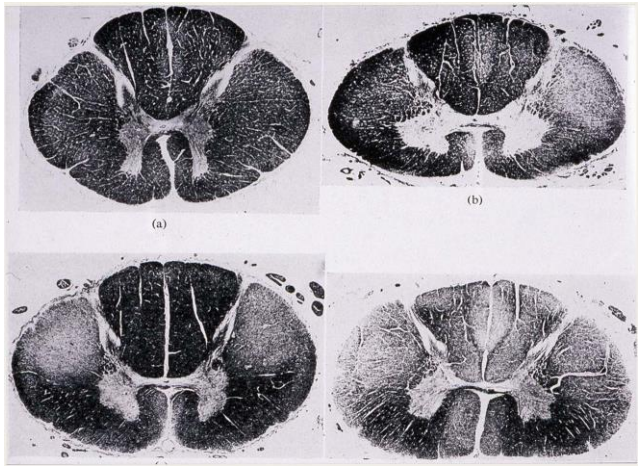
Signifikanta korrelationer förelåg mellan NFL och kliniska index för handikapp och aggravering

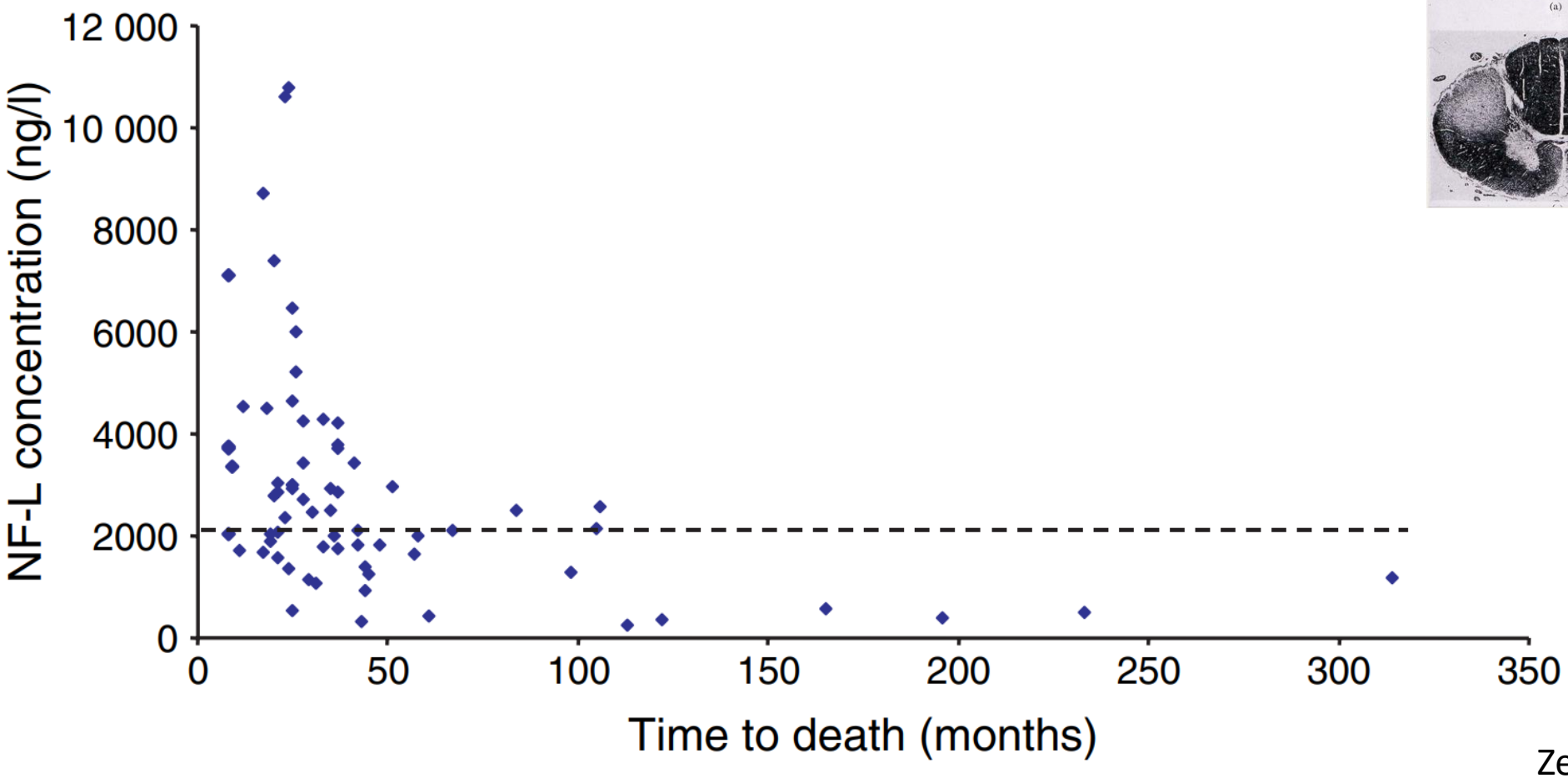
Exempel på Neurodegenerativa sjukdomar

ALS
Demens

CSF-NFL vid ALS (amyotrofisk lateralskleros)

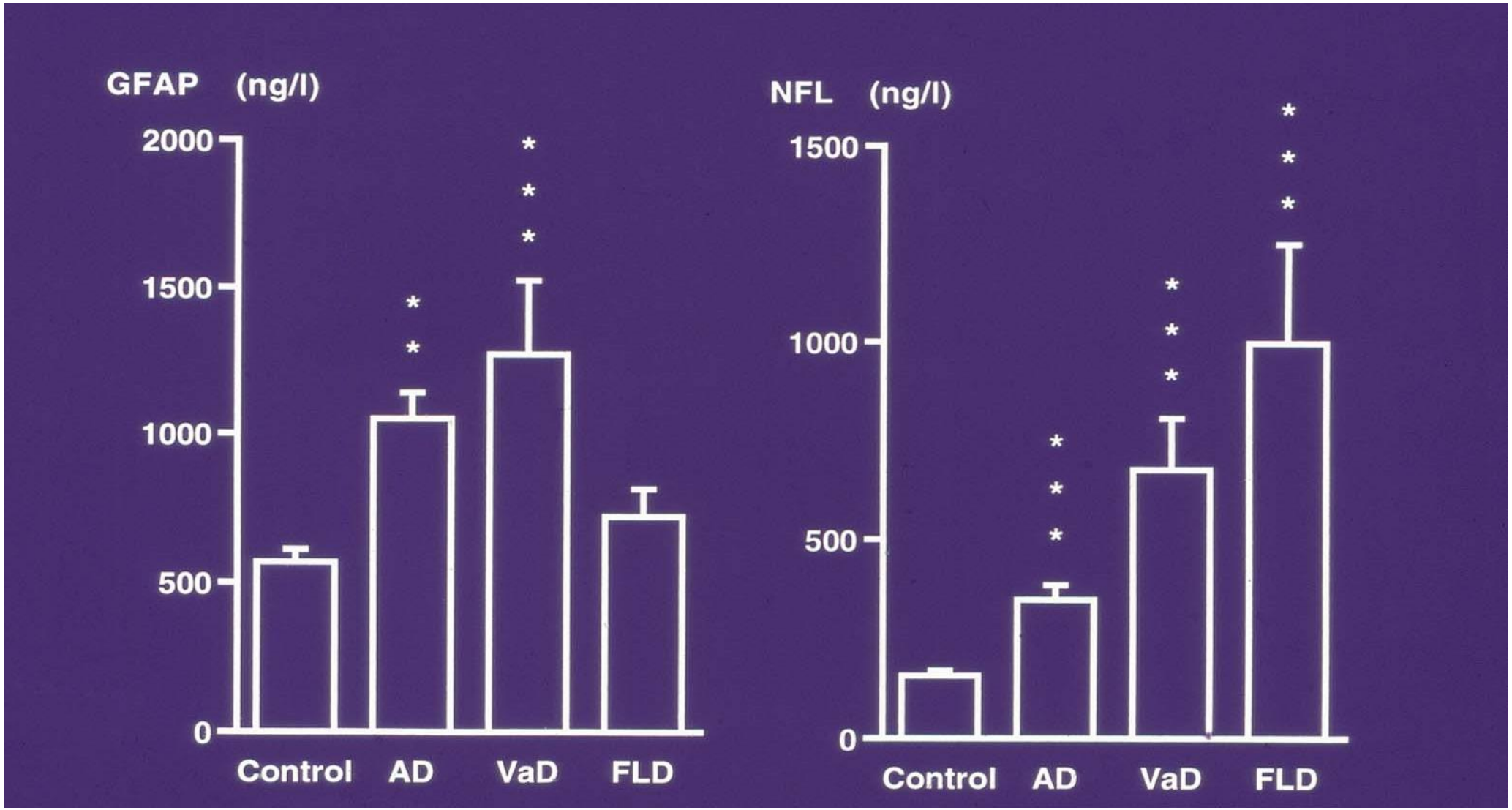
Hög nivå kopplat till kortare överlevnad





Zetterberg et al 2007

Demenssjukdomar

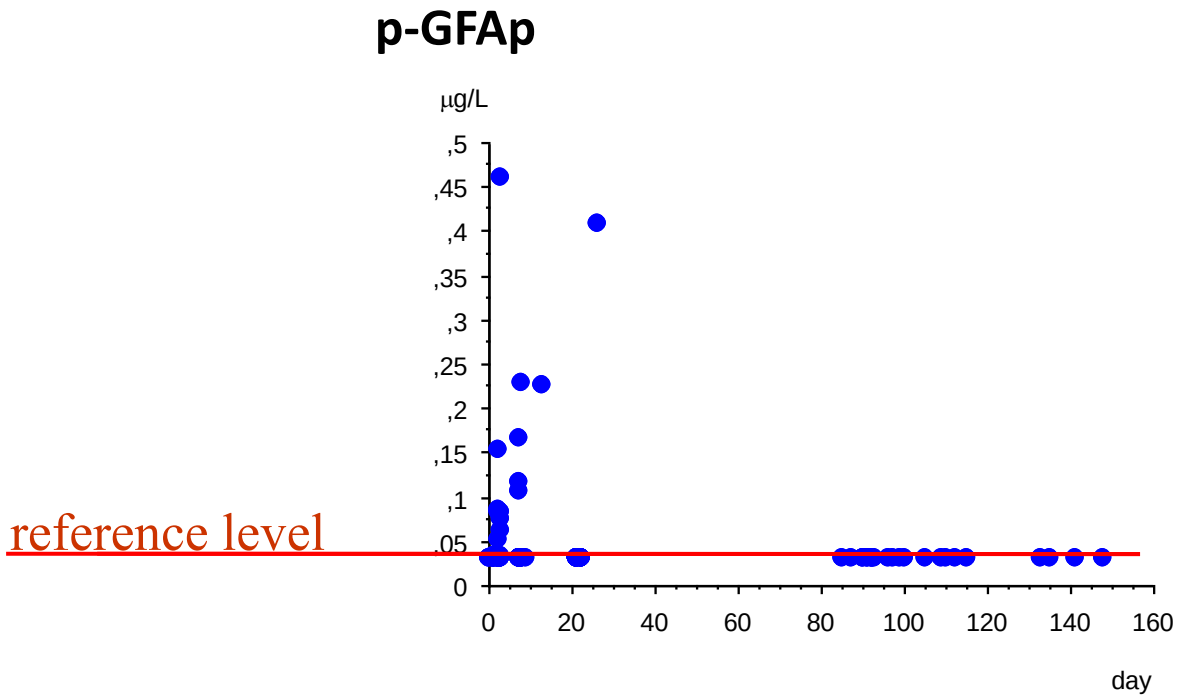


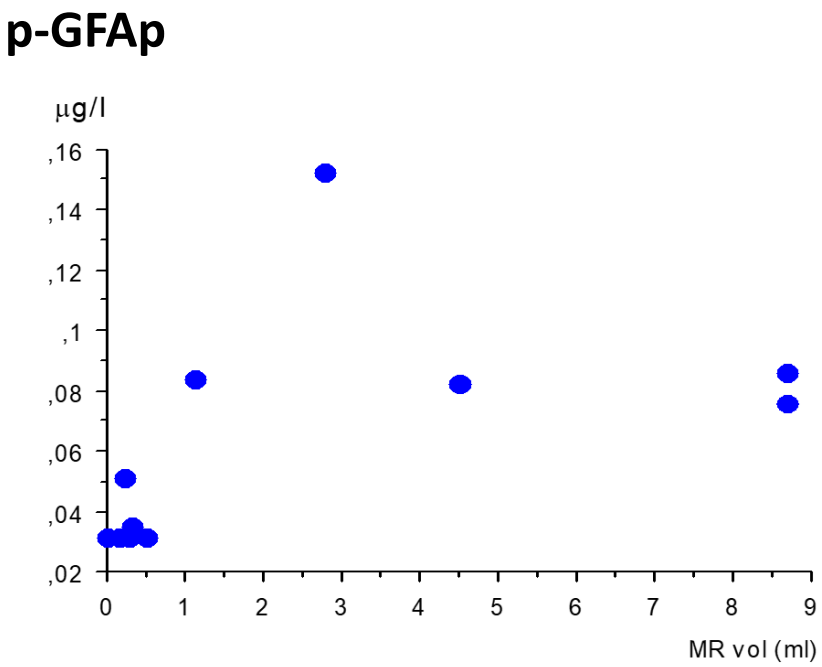
Alzheimers sjukdom, Vaskulär demens, Frontallobsdemens

Hjärnspecifika biomarkörer för sönderfall av hjärnvävnad som kan mätas i plasma

GFAp
NFL
Tau

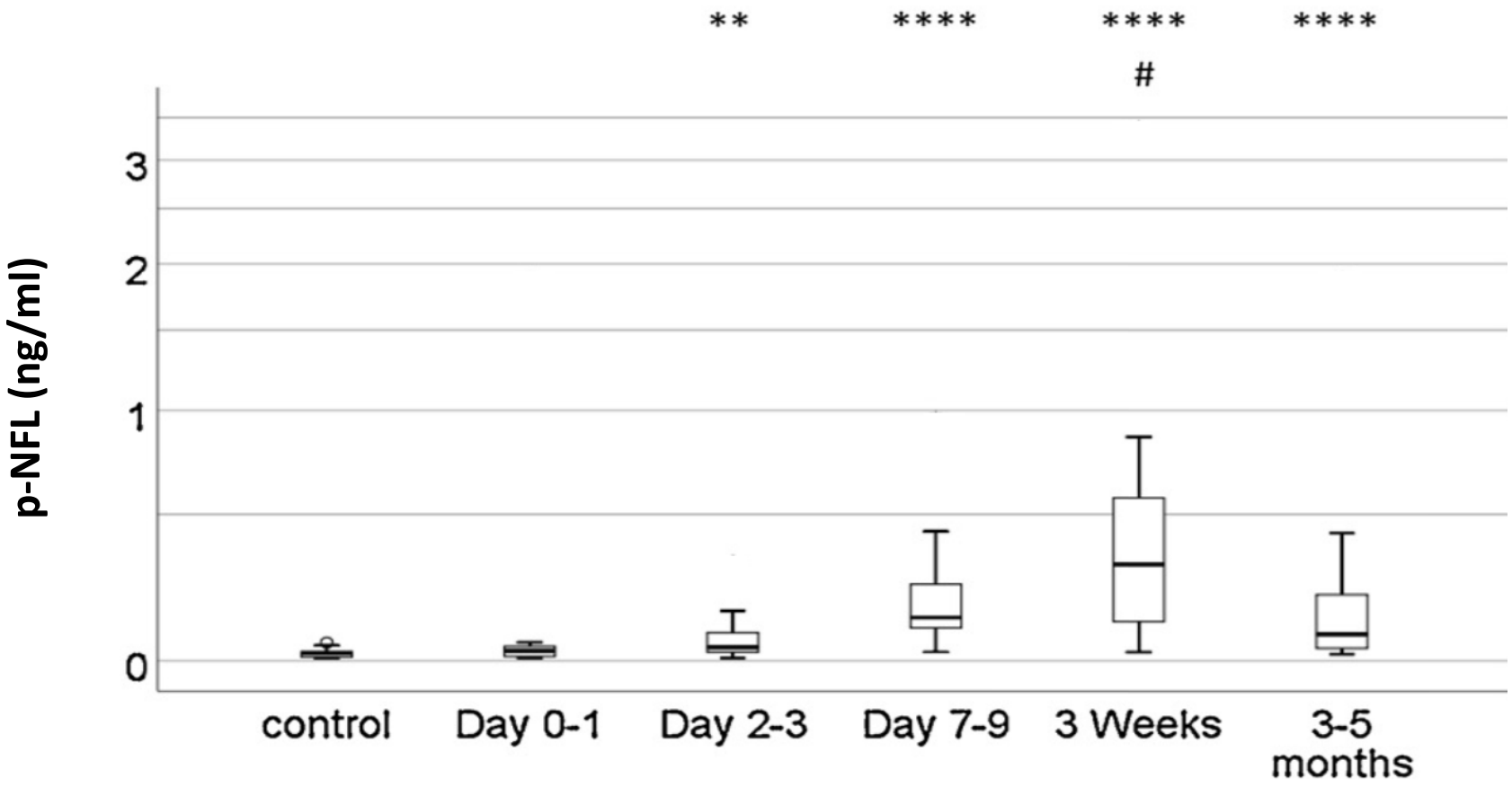
p-GFAp efter ischemic stroke





CSF-infarktstudien

p-NFL efter ischemic stroke

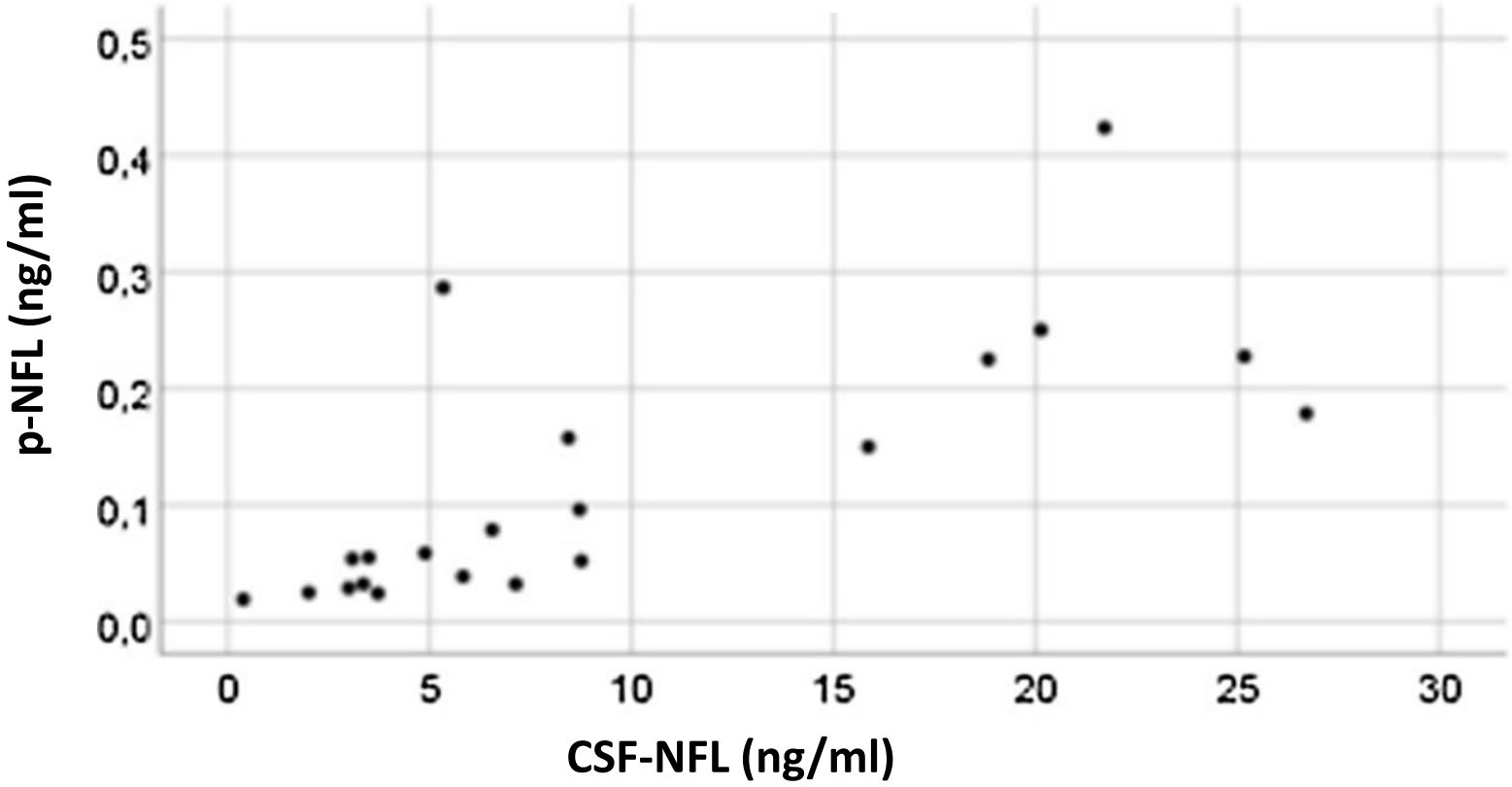


CSF-NFL (ng/ml)

Statistical significance comparing to group control *=p ≤ 0.05; **=p ≤ 0.01; ***=p ≤ 0.001; ****=p ≤ 0.0001.
Statistical significance comparing to Day 0–1 #=p ≤ 0.05

CSF-infarktstudien

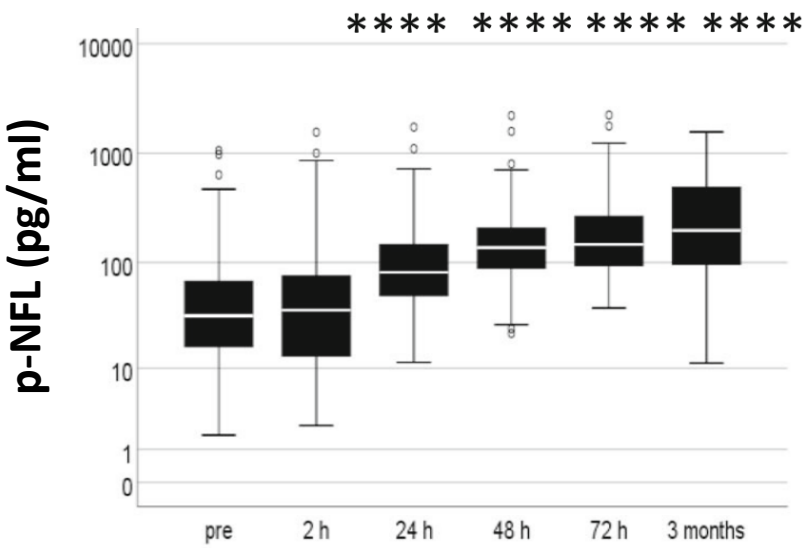
p-NFL och CSF-NFL 3-5 mån efter ischemic stroke korrelerar

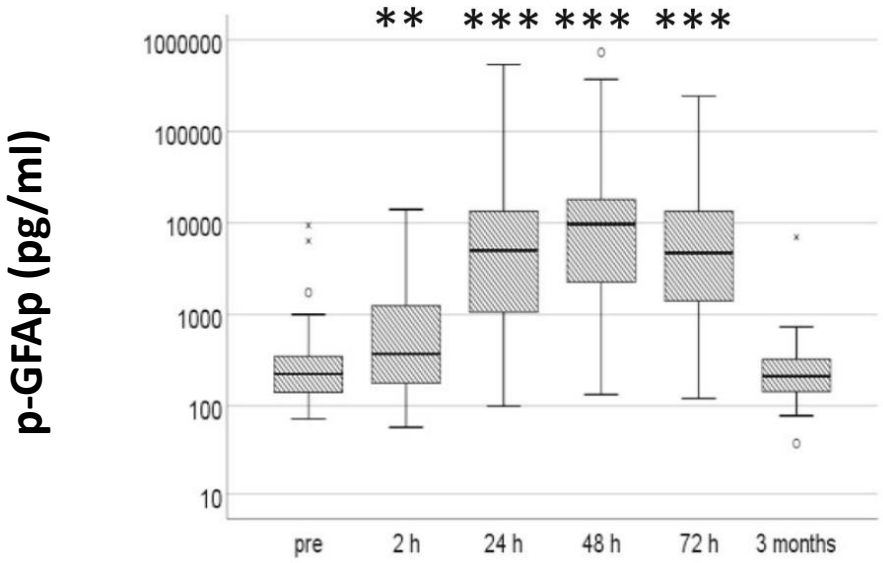


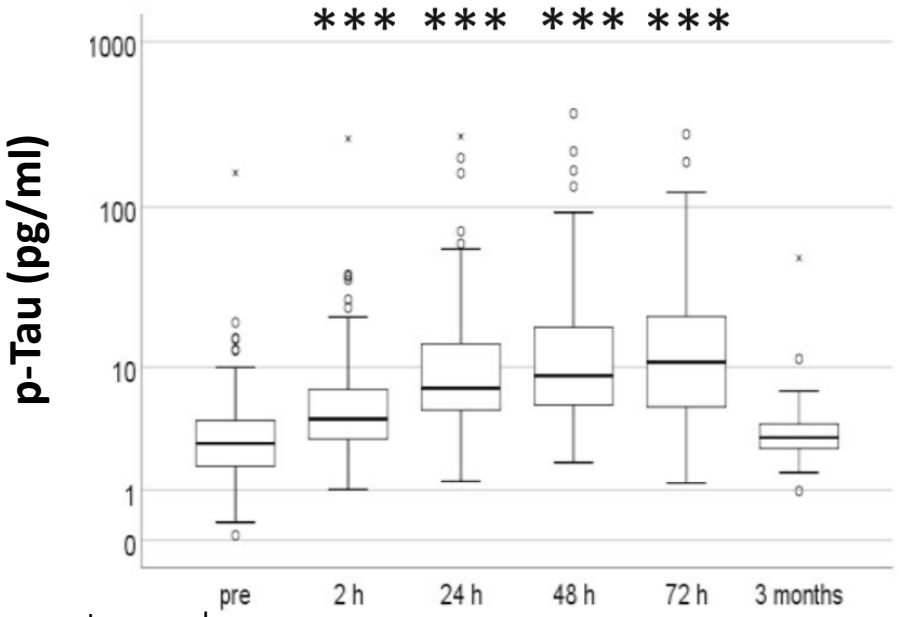
$p \leq 0.0001$; $r = 0.782$; $n = 21$

CSF-infarktstudien

p-Tau, p-NFL och p-GFAp efter <u>stor</u> infarkt pga ocklusion av stor artär i hjärnans främre cirkulation som behandlats med mekanisk propputdragning (trombektomi)







∗=p≤0.05; ∗∗=p≤0.01; ∗∗∗=p≤0.001; ∗∗∗∗=p≤0.0001 °=outlier, x=extreme value

p-GFAp, p-NFL and p-Tau correlated well to outcome, as well as to infarct volume and NIHSS at 24 h

Analyser som idag görs på Neurokemi SU Mölndal

Parenkymskademarkörer plasma

p-NFL SiMoA-teknik

p-Tau går fn inte att beställa; kommer snart

p-GFAp går fn inte att beställa. Analysen ska sättas upp i ett modernare system typ SiMoA våren -24

Markörproteiner *(Beställ grupp eller enskild analys)*

Alzheimermarkörer

- ☐ Amyloid-kvot (Aβ42/ Aβ40), T-Tau, Fosfo-Tau
  (Endast relevant vid kognitiv utredning hos patienter >50 år)

Synapsmarkörer

- ☐ Neurogranin (Ng)

Parenkymskademarkörer

- ☐ NFL, GFAp och T-Tau
- ☐ T-Tau-protein
- ☐ Neurofilament light protein (NFL) **CSV**
- ☐ Neurofilament light protein (NFL) **Plasma**
- ☐ Gliafibrillärt protein (GFAp)

Övriga markörer

- ☐ CXCL13 **CSV**
- ☐ Progranulin **Plasma**

Remiss 7 Klinisk Kemi — **Neurokemiska analyser**

Remitterande instans — Pat

Tel nummer:

Svarsmottagare (om annan än rem. instans) — Tappad volym CSV mL — Provt.datum (år / mån / dag) — Provtagningstid (klockan)

Ankomsttid till lab (klockan) — Laboratoriets Lid-nr:

Centrifugeringstid (klockan)

Tel nummer:

Debitering — Rem. läkare

☐ Beställaren = rem. instans ☐ Svarsmottagaren

Biobankslagen

Inskickandet av denna remiss bekräftar att patienten (alt. vårdnadshavare/ närstående) har fått information om – och samtycker – att provet och tillhörande personuppgifter sparas för vård och behandling och därmed förenlig verksamhet.

☐ **Nej,** patienten samtycker **inte** till att provet sparas för vård och behandling och därmed förenlig verksamhet. Nej-talong bifogas

☐ Patienten är vid provtillfället oförmögen att lämna samtycke.

Anamnes, kliniska fynd, frågeställning:

Utförs akut

- Cellräkning (Ery., Lymfoc., Monoc., Neutro.) ☐
- Spektrofotometri, Abs 415 ☐
  Prov för spektrofotometri måste centrifugeras inom 30 min. Abs-kurva utförs endast vid misstanke om intrakraniell blödning efter kontakt med jourhavande läkare vid klinisk kemi
- Laktat..... ☐
- Glukos, **CSV + Plasma** ..... ☐
- Albumin..... ☐
- Albuminkvot, **CSV + Plasma**..... ☐

OBS! Cellräkningsresultat från lokala laboratoriet

Erytrocyter.....x10⁶/L

Leukocyter, poly.....x10⁶/L

Leukocyter, mono.....x10⁶/L

Sign.....

För Cytologi använd Remiss 7b

Proteinanalyser *OBS! Även ett serumprov krävs*

- ☐ Albuminkvot, IgG-, IgM-analys, IgG- och IgM-band
- ☐ Albuminkvot, IgG-analys, IgG-band
- ☐ + Fria lätta kappakedjor **CSV + Serum**
  (kan endast beställas med någon av ovanstående)
- ☐ Kompletterande IgM-analys och IgM-band
- ☐ β_2-mikroglobulin **CSV + Serum**

Likvorläckage *OBS! Även ett serumprov krävs*

- ☐ β trace protein (Dropp från näsa, öron eller tårkanal)

Neuropeptider

- ☐ Orexin-A

DNA-analyser (Helblod/EDTA-rör)

- ☐ ApoE genotypning
- ☐ Tau-haplotyp (DNA-Tau)

Markörproteiner *(Beställ grupp eller enskild analys)*

Alzheimermarkörer

- ☐ Amyloid-kvot (Aβ42/ Aβ40), T-Tau, Fosfo-Tau
  (Endast relevant vid kognitiv utredning hos patienter >50 år)

Synapsmarkörer

- ☐ Neurogranin (Ng)

Parenkymskademarkörer

- ☐ NFL, GFAp och T-Tau
- ☐ T-Tau-protein
- ☐ Neurofilament light protein (NFL) **CSV**
- ☐ Neurofilament light protein (NFL) **Plasma**
- ☐ Gliafibrillärt protein (GFAp)

Övriga markörer

- ☐ CXCL13 **CSV**
- ☐ Progranulin **Plasma**

Neurokemi, Hus V3. Laboratoriemedicin/Klinisk kemi.
Sahlgrenska Universitetssjukhuset/Mölndal Göteborgsvägen 31
431 80 Mölndal Tel.031-3430025 E-post: neurokemi.su@vgregion.se

Sammanfattningsvis

Nu finns parenkymskademarkörer som kan mätas i plasma

Lumbalpunktion behöver inte göras och därmed har också primärvården tillgång till analyserna

p-NFL, p-GFAp och p-Tau är vältäckande mått på sönderfall av nervvävnad

Det sker en konstant utveckling

- Nya markörer
- Multipla analyser
- Automatiserade procedurer
- Samband till olika tillstånd, klinik, prognos mm utforskas.

Tack!

Frågor?