

Blodmarkörer i blod påvisar astrocytpåverkan vid **covid-19**



nervcells- och

Under de senaste åren har stora framsteg gjorts avseende högkänsliga mätmetoder för biomarkörkvantifiering i kroppsvätskor. Två nyckelmärkare för nervcellsskada och en för astrocytaktivering kan nu mätas i vanliga blodprover. **Henrik Zetterberg**, professor i neurokemi, Göteborgs universitet och University College London, samt klinisk kemist vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset, berättar här om nya resultat som indikerar att covid-19 kan leda till hjärnpåverkan och att detta kan detekteras och kvantifieras med hjälp av dessa blodmarkörer.

Neurofilament och tau är strukturella proteiner i nervcellsutskott, medan gliafibrillärt surt protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) är höguttryckt i hjärnans stödjeceller, astrocyterna. Det finns tre olika former av neurofilament som brukar kallas light (NfL), medium (NfM) och heavy (NfH), beroende på hur de vandrar i polyakrylamidgeler. Tau kodas av en gen men alternativ mRNA-splitsning ger 6 olika isoformer och det finns även en hel del fragment och på andra sätt modifierade former av proteinet. Med hjälp av vanlig enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) har vi sedan många år kunnat mäta NfL, total tau (alla tau-isoformer) och GFAP i ryggvätska. Höga koncentrationer av NfL och tau talar för att nervcellsutskott faller sönder. Höga koncentrationer av GFAP talar för astrocytaktivering och kan även ses vid akut astrocytskada eller i efterförloppet till hjärnskador vid så kallad astroglios.

SÅ FUNGERAR SINGLE MOLECULE ARRAY

De senaste 10 åren har vi arbetat intensivt med en teknik som kallas Single molecule array (Simoa) på vårt lab. Grundprincipen liknar ELISA; man har en capture-antikropp som fångar in analyten av intresse och en detektionsantikropp som binder till en annan del av analyten och är märkt med något som går att mäta. I Simoa används beta-galaktosidas som omvandlar ett substrat till en fluorescerande produkt som kan mätas.

tas. Tricket med Simoa är att capture-antikroppen är konjugerad till små magnetiska kulor. Efter inkubering av capture-antikroppskonjugerade kulor, prov och detektionsantikropp med enzym drar en magnet ner kulorna i mikrobrunnar (rastret av mikrobrunnar ser ut lite som ett kinesiskt schackbräde i miniatyr). En mikrobrunn har en volym på 50 femtoliter vilket är endast lite större än volymen av en kula. Efter tillsats av substratet för enzymet sluts mikrobrunnarna med en oljefilm, varefter man filmar hur individuella brunnar börjar lysa om antigen med detektions-antikropp och enzym finns närvarande. Analyten kan mätas både digitalt (man räknar brunnar med lysande kulor dividerat med det totala antalet brunnar med kulor, både lysande och icke-lysande) men även analogt (hur mycket brunnarna lyser). På så vis kan man få en signal som kan översättas till en "average number of enzymes per bead"-siffra, vilket motsvarar antigenets koncentration i provet. Upplägget med den i mikrobrunnar "kompartimentaliserade" detektionsreaktionen gör alltså att man kan räkna individuella molekyler, vilket gör metoden mycket känslig.

BIOMARKÖRER FÖR HJÄRNSKADA I BLODPROVER

Vi har under de senaste åren fört över våra vanliga metoder för NFL och tau (ELISA) till Simoa och på så vis lyckats få metoderna 100–1000 gånger känsligare.¹ Plasma NFL kan nu beställas som en klinisk analys vid Laboratoriet för klinisk neurokemi, Sahlgrenska Universitetssjukhuset/Mölndal. Parallellt med detta arbete har andra forskargrupper utvecklat ett högkänsligt Simoa-test för GFAP.² Detta har möjliggjort att vi nu kan mäta NFL, tau och GFAP i vanliga blodprover. Vi har kunnat visa att hypoxisk hjärnskada efter hjärtstopp leder till en massiv ökning av tau, NFL och GFAP i blodbanan under dygnet omedelbart efter hjärtstoppet; graden av ökning korrelerar med kliniskt utfall.^{3–6} Vid svår traumatisk hjärnskada får man en NFL-stegring i blodet, som når sitt maximum efter några veckor och normaliseras inom några månader.⁷ Även här finns en korrelation till utfall. Vid lättare hjärnskada, såsom hjärnskakning, ser man också övergående ökning-

ar av tau och NFL i blodbanan.⁸ Liknande resultat ses för GFAP.⁹ I samtliga studier verkar tau och GFAP vara de snabba markörerna som stiger inom timmar och snabbt tas bort från blodbanan (halveringstiden är cirka 10 timmar), medan NFL verkar vara långsammare (dess koncentration stiger under veckor och normaliseras inom månader). Vid Alzheimers sjukdom är tau-koncentrationen lätt förhöjd i plasma, men med ett ganska stort överlapp gentemot kontroller.^{10,11} Ett betydligt bättre Alzheimer-test i blod är fosforylerat tau (P-tau), som detekterar Alzheimerförändringar i hjärnan med en diagnostisk riktighet som överstiger 90 procent.^{12,13} För neurodegenerativa sjukdomar i allmänhet verkar NFL i blod vara en lovande markör; vid den svåra ärftliga formen ökar NFL-koncentrationen i blod flerfaldigt under en 10-årsperiod innan förväntat kliniskt insjuknande och liknande förändringar (om än inte lika tydliga) ses vid den vanliga, sporadiska formen av sjukdomen.¹⁴ Vid övriga neurodegenerativa sjukdomar, såsom pannlobsdemens och atypiska parkinsonliknande sjukdomar är NFL- och GFAP-koncentrationen i blod förhöjd och korrelerar med neurodegenerativa förändringar vid magnetkameraundersökning.^{15–17} Vid multipel skleros är NFL-koncentrationen i blod ofta förhöjd vid skov och normaliseras efter insättandet av effektiv behandling.^{18,19}

NEUROLOGISKA KOMPLIKATIONER VID COVID-19

Att vi nu har tillförlitliga blodtester för hjärnskada har öppnat upp för många spännande studier som förut inte har varit möjliga. När SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) började sprida sig över världen och de kliniska bilderna av sjukdomen covid-19 blev allt mer bekanta kom snart rapporter om att en del patienter, trots avancerad intensivvård, drabbades av allvarliga neurologiska komplikationer.²⁰ Det har nyligen visats att SARS-CoV-2 kan infektera hjärnan, även om det är ovanligt, och det är känt att viruset kan utlösa en svårkontrollerad inflammations- och koagulationskaskad med utbredd blodproppsbildning i vitala organ, inkluderande hjärnan och det perifera nervsystemet. Om det därutöver finns

direkt nervskadande inflammatoriska sjukdomskomponenter, som kan utgöra ytterligare mål för behandling, är fortfarande oklart.

I samarbete med Professor Magnus Gisslén's forskarlag på infektionskliniken vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset har vi undersökt 47 patienter med mild (n=20), måttlig (n=9) och svår (n=18) covid-19.²¹ Mild covid-19 definierades som SARS-CoV-2-infektion utan behov av slutenvård. Patienter med måttlig covid-19 behövde sjukhusvård men inte respirator. Patienter med svår covid-19 behövde respiratorvård. Vi samlade blodprover vid upprepade tillfällen och mätte NFL, tau och GFAP med Simoa-teknik. Resultaten jämfördes med 33 åldersmatchade kontroller utan SARS-CoV-2-infektion. Vid svår covid-19 var både NFL- och GFAP-koncentrationerna förhöjda och NFL-koncentrationen ökade över tid, medan inga tydliga öknings sågs för tau. Vid måttlig covid-19 var GFAP-koncentrationen förhöjd tidigt i sjukdomsförloppet, vilket talar för tidig astrocytpåverkan redan vid denna grad av infektion. Mild covid-19, den form som det stora flertalet av alla infekterade får, var inte associerad med några biomarkörtecken på CNS-påverkan, vilket förstås är ett uppmuntrande och lugnande resultat. Vår studie har flera brister. Exempelvis vore det viktigt att ha en kontrollgrupp av intensivvårdade patienter utan SARS-CoV-2 för att utesluta en primär effekt av svår sjukdom och intensivvård på hjärnskademarkörerna. Vi hade inte heller data på perifer nervcellspåverkan, vilket kan påverka NFL-koncentrationen i blod. Det kommer även att vara viktigt med långtidsuppföljning. Korrelerar biomarkörförändringar talande för CNS-påverkan med hur svår konvalescensen blir? Förutsäger biomarkörförändringarna neurologiska komplikationer till covid-19? Blir patienter med kraftiga öknings av NFL och GFAP under vårdförloppet mer hjärntrötta än andra? Kan förbättrade behandlingsmetoder förebygga biomarkörökningarna?

Mer forskning behövs och det är fantastiskt att vi i Sverige så snabbt etablerade covid-19-biobanker och kliniska studier där prover samlas in och noggrann patientkaraktärisering och upp-

följning sker. Tack vare detta kommer vi att lära oss mycket mer om SARS-CoV-2-infektionens påverkan på nervsystemet under de kommande månaderna.



HENRIK ZETTERBERG

Professor i neurokemi, Sahlgrenska akademien vid Göteborgs universitet och University College London, och överläkare i klinisk kemi vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset
henrik.zetterberg@clinchem.gu.se

REFERENSER

1. Andreasson U, Blennow K, Zetterberg H: Update on ultrasensitive technologies to facilitate research on blood biomarkers for central nervous system disorders. *Alzheimers Dement (Amst)* 2016, 3:98-102.
2. Bogoslovsky T, Wilson D, Chen Y, Hanlon D, Gill J, Jeromin A, Song L, Moore C, Gong Y, Kenney K et al: Increases of Plasma Levels of Glial Fibrillary Acidic Protein, Tau, and Amyloid beta up to 90 Days after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 2017, 34(1):66-73.
3. Randall J, Mortberg E, Provuncher GK, Fournier DR, Duffy DC, Rubertsson S, Blennow K, Zetterberg H, Wilson DH: Tau proteins in serum predict neurological outcome after hypoxic brain injury from cardiac arrest: results of a pilot study. *Resuscitation* 2013, 84(3):351-356.
4. Mattsson N, Zetterberg H, Nielsen N, Blennow K, Dankiewicz J, Friberg H, Lilja G, Insel PS, Rylander C, Stammet P et al: Serum tau and neurological outcome in cardiac arrest. *Ann Neurol* 2017, 82(5):665-675.
5. Moseby-Knappe M, Mattsson N, Nielsen N, Zetterberg H, Blennow K, Dankiewicz J, Dragancea I, Friberg H, Lilja G, Insel PS et al: Serum Neurofilament Light Chain for Prognosis of Outcome After Cardiac Arrest. *JAMA Neurol* 2019, 76(1):64-71.
6. Larsson IM, Wallin E, Kristofferzon ML, Niessner M, Zetterberg H, Rubertsson S: Post-cardiac arrest serum levels of glial fibrillary acidic protein for predicting neurological outcome. *Resuscitation* 2014, 85(12):1654-1661.
7. Shahim P, Gren M, Liman V, Andreasson U, Norgren T, Tegner Y, Mattsson N, Andreassen N, Ost M, Zetterberg H et al: Serum neurofilament light protein predicts clinical outcome in traumatic brain injury. *Sci Rep* 2016, 6:36791.
8. Shahim P, Tegner Y, Wilson DH, Randall J, Skillback T, Pazooki D, Kallberg B, Blennow K, Zetterberg H: Blood Biomarkers for Brain Injury in Concussed Professional Ice Hockey Players. *JAMA Neurol* 2014.
9. Shahim P, Politis A, van der Merwe A, Moore B, Ekanayake V, Lippa SM, Chou YY, Pham DL, Butman JA, Diaz-Arrastia R et al: Time course and diagnostic utility of NfL, tau, GFAP, and UCH-L1 in subacute and chronic TBI. *Neurology* 2020, 95(6):e623-e636.
10. Zetterberg H, Wilson D, Andreasson U, Minthon L, Blennow K, Randall J, Hansson O: Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2013, 5(2):9.
11. Mattsson N, Zetterberg H, Janelidze S, Insel PS, Andreasson U, Stomrud E, Palmqvist S, Baker D, Tan Hehir CA, Jeromin A et al: Plasma tau in Alzheimer disease. *Neurology* 2016, 87(17):1827-1835.
12. Karikari TK, Pascoal TA, Ashton NJ, Janelidze S, Benedet AL, Rodriguez JL, Chalmoun M, Savard M, Kang MS, Theriault J et al: Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *Lancet Neurol* 2020, 19(5):422-433.
13. Lantero Rodriguez J, Karikari TK, Suarez-Calvet M, Troakes C, King A, Emersic A, Aarsland D, Hye A, Zetterberg H, Blennow K et al: Plasma p-tau181 accurately predicts Alzheimer's disease pathology at least 8 years prior to post-mortem and improves the clinical characterisation of cognitive decline. *Acta Neuropathol* 2020, 140(3):267-278.
14. Gafson AR, Barthelemy NR, Bomont P, Carare RO, Durham HD, Julien JP, Kuhle J, Leppert D, Nixon RA, Weller RO et al: Neurofilaments: neurobiological foundations for biomarker applications. *Brain* 2020.
15. Rohrer JD, Woollacott IO, Dick KM, Brotherhood E, Gordon E, Fellows A, Toombs J, Drueyeh R, Cardoso MJ, Ourselin S et al: Serum neurofilament light chain protein is a measure of disease intensity in frontotemporal dementia. *Neurology* 2016, 87(13):1329-1336.
16. Rojas JC, Karydas A, Bang J, Tsai RM, Blennow K, Liman V, Kramer JH, Rosen H, Miller BL, Zetterberg H et al: Plasma neurofilament light chain predicts progression in progressive supranuclear palsy. *Ann Clin Transl Neurol* 2016, 3(3):216-225.
17. Heller C, Foiani MS, Moore K, Convery R, Bocchetta M, Neason M, Cash DM, Thomas D, Greaves CV, Woollacott IO et al: Plasma glial fibrillary acidic protein is raised in progranulin-associated frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2020, 91(3):263-270.
18. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schadelin S, Giardiello A, Zecca C, Blennow K, Zetterberg H, Leppert D et al: Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2017, 81(6):857-870.
19. Novakova L, Zetterberg H, Sundstrom P, Axelsson M, Khademi M, Gunnarsson M, Malmstrom C, Svenningsson A, Olsson T, Piehl F et al: Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology* 2017, 89(22):2230-2237.
20. Paterson RW, Brown RL, Benjamin L, Nortley R, Wiethoff S, Bharucha T, Jayaseelan DL, Kumar G, Raftopoulos RE, Zambrenu L et al: The emerging spectrum of COVID-19 neurology: clinical, radiological and laboratory findings. *Brain* 2020.
21. Kanberg N, Ashton NJ, Andersson LM, Yilmaz A, Lindh M, Nilsson S, Price RW, Blennow K, Zetterberg H, Gisslen M: Neurochemical evidence of astrocytic and neuronal injury commonly found in COVID-19. *Neurology* 2020, in press.