

PŘEHLED IMUNOANALYTICKÝCH METOD KE STANOVENÍ TRIPLETU BIOMARKERŮ ALZHEIMEROVY NEMOCI V MOZKOMÍŠNÍM MOKU A V KRVI

LENKA FIALOVÁ^{a,b}, TOMÁŠ ZIMA^a a ALEŠ BARTOŠ^{c,d}

^a Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2, ^b Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva, Fakulta biomedicínského inženýrství, České vysoké učení technické v Praze, nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno, ^c Neurologická klinika, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Ruská 87, 100 00 Praha 10, ^d Národní ústav duševního zdraví, Topolová 748, 250 67 Klecany
lfial@lf1.cuni.cz

Došlo 27.9.19, přepracováno 2.4.20, přijato 20.4.20.

Klíčová slova: Alzheimerova nemoc, celkový tau protein, fosforylovaný tau protein, β -amyloid 42, chemiluminiscence, ELISA, multiplexová imunoanalýza, SIMOA

Obsah

1. Úvod
2. Triplet biomarkerů Alzheimerovy nemoci v biologických tekutinách
3. Metody pro stanovení tripletu biomarkerů Alzheimerovy nemoci
4. Vybrané imunoanalytické metody pro stanovení tripletu biomarkerů Alzheimerovy nemoci
 - 4.1. Imunoanalytické metody pro stanovení jednoho biomarkeru Alzheimerovy nemoci
 - 4.2. Multiplexové metody pro stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci
 - 4.3. Vysoce citlivé metody pro stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci
 - 4.4. Plně automatizované imunoanalytické metody pro stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci
5. Standardizace stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci
6. Závěr

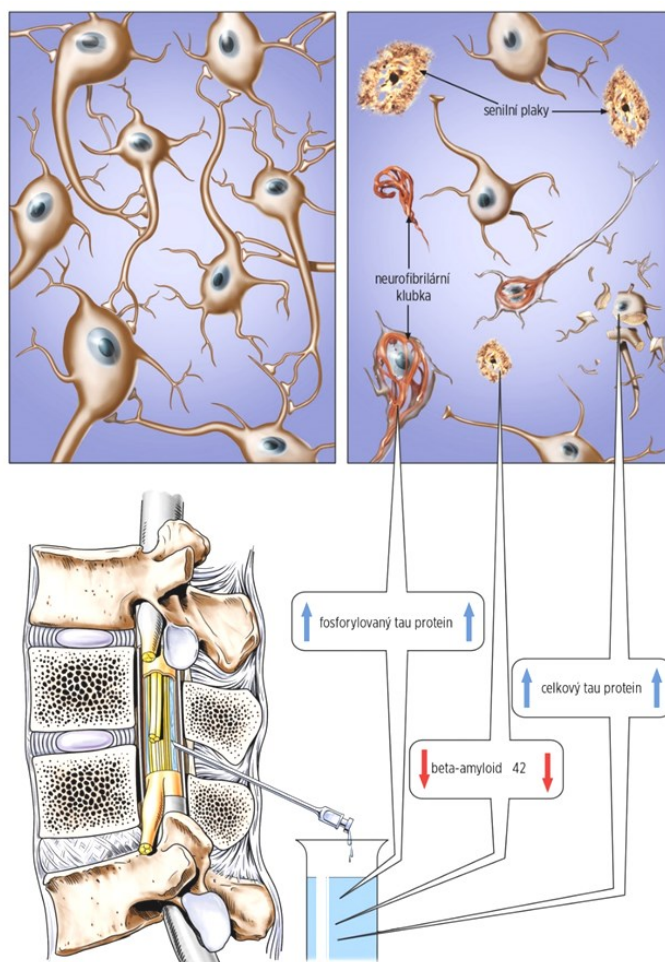
1. Úvod

Alzheimerova nemoc (AN) (další užívané názvy Alzheimerova choroba, pro pokročilé stadium Alzheimerova demence) je neurodegenerativní onemocnění mozku, u něhož dominuje narušení kognitivních funkcí, ale přítomny mohou být i poruchy chování a nálady¹.

Komplexní diagnostika AN je složitá a vyžaduje použití mnoha klinických a pomocných vyšetření. Nejdříve je důležité zhodnotit paměť a další kognitivní funkce pomocí krátkých či komplexních neuropsychologických testů^{2,3}. K bližší diferenciální diagnostice demenci je vhodné dále využívat různé zobrazovací metody mozku a biochemická vyšetření v mozkomíšním moku (MMM) a v krvi. Mezi nimi významné postavení zaujímají biomarkery AN, především celkový tau (t-tau) a fosforylovaný tau (p-tau) protein a β -amyloid 42 (A β 42) (cit.⁴⁻⁷). V české literatuře byl zaveden pro všechny tři zmíněné biochemické ukazatele pojem likvorový triplet⁴.

Hladiny biomarkerů AN v MMM mají úzký vztah k základním neuropatologickým projevům prokazovaným v mozku u nemocných s AN. Typickými odchylkami v mozku nemocných s AN je tvorba tzv. senilních plaků a neurofibrilárních klubek (obr. 1) společně s neurodegenerativními změnami, jejichž vývoj řadu let předchází klinickým projevům onemocnění. Jako senilní plaky jsou označovány nerozpustná extracelulárně uložená depozita β -amyloidu, který je zastoupen především A β 42, tvořeným 42 aminokyselinovými zbytky. Hlavní součástí intraneuronálně uložených neurofibrilárních klubek v mozku je hyperfosforylovaný tau protein^{5,6,8,9}. Triplet biomarkerů AN v MMM významně diferencuje kognitivně zdravé osoby od pacientů nejen s rozvinutou AN, ale i s mírnou kognitivní poruchou a poskytuje i prognostickou informaci^{10,11}. O významu uvedených proteinů svědčí skutečnost, že jejich stanovení v MMM bylo zahrnuto mezi výzkumná kritéria pro diagnózu AN včetně období presymptomatického a prodromálního (časná symptomatická fáze) formulovaná Mezinárodní pracovní skupinou a NIA-AA (National Institute on Aging and Alzheimer Association)^{7,12-15}. Diagnostika AN se podle nových kritérií již neřídí klinickými projevy nemoci (subjektivními či objektivními příznaky), ale klíčovou roli v diagnostice postavené na biologické definici hraje právě vyšetření likvorového tripletu¹⁵.

Vzhledem ke stále sílící snaze definovat neurodegenerativní onemocnění pomocí neurobiologických ukazatelů namísto nespecifických klinických příznaků se logicky výrazně zvyšuje zájem o zjišťování těchto ukazatelů, a tudíž i o metody k jejich detekci. Díky technologickému vývoji v oblasti imunochemických metod se otevírají nové možnosti stanovení uvedeného tripletu biomarkerů AN. Mezi moderní trendy patří používání vysoce citlivých metod, multiplexové analýzy a automatizace vyšetření. V české odborné literatuře zatím chybí souhrnná informace o těchto metodách. Cílem tohoto článku je seznámit čtenáře s analytickými aspekty i vybranými novými přístupy při vyšetřování tau proteinů a A β 42 u AN v MMM a krvi pomocí metod na bázi imunoanalýzy.



Obr. 1. Hlavní neuropatologické změny v mozku u Alzheimerovy nemoci a jejich souvislost se změnami v mozkomíšním moku. Mezi hlavní neuropatologické změny v mozku nemocných s Alzheimerovou nemocí patří zánik neuronů, neurofibrilární klubka a senilní plaky. Rozpad neuronů je spojen s uvolňováním cytoskeletálního tau proteinu, což se odrazí ve zvýšení koncentrace celkového tau proteinu v mozkomíšním moku. Neurofibrilární klubka jsou uložena uvnitř neuronů, skládají se především z hyperfosforylovaného tau proteinu, jehož koncentrace se v mozkomíšním moku zvyšuje jako součást p-tau proteinu. Do senilních plaků uložených extracelulárně se ukládá β -amyloid 42, což vede ke snižování jeho koncentrace v mozkomíšním moku. Vlevo je histopatologický obraz neuronů a jejich spojů ve zdravém mozku, vpravo jsou zachyceny tři hlavní degenerativní změny u Alzheimerovy nemoci a pod obrázkem souvislosti se změnami v likvorovém tripletu.

Obrázek je reprodukován se souhlasem nakladatelství Mladá fronta (cit.⁹)

2. Triplet biomarkerů Alzheimerovy nemoci v biologických tekutinách

U AN, ale i u některých jiných neuropatologických stavů, se do extracelulárního prostoru uvolňují tau proteiny a zároveň dochází i ke změně obsahu volného $A\beta_{42}$. Změny koncentrace tripletu proteinů v extracelulární tekutině se projeví i v různých biologických tekutinách, v nichž se běžně provádějí laboratorní vyšetření. Obvykle jsou biomarkery AN stanovovány v MMM a perspektivní se zdá být vyšetřování krve^{16–18}. Popsáno bylo i stanovení ve slinách a v moči^{19,20}.

Pro AN je charakteristický pokles hladiny $A\beta_{42}$ v MMM zhruba na poloviční hodnoty věkově odpovídajících kontrolních osob^{8,10}. Na rozdíl od $A\beta_{42}$ dosahují t-tau i p-tau proteiny u AN v průměru 2 a 2,5násobných hladin^{8,10}. Nárůst hladin t-tau proteinu odráží obecně poškození axonů nebo neurodegeneraci, tedy procesy, které nejsou pro AN specifické. Naproti tomu vzestup p-tau proteinu představuje nález typický především pro AN, který souvisí s hyperfosforylací tau proteinu a tvorbou neurofibrilárních klubek²¹. Proteiny mozkového původu mohou proniknout i do krve, i když mechanismus jejich přestupu do cirkulace není plně objasněn. Koncentrace

tripletu biomarkerů v krvi je řádově nižší ve srovnání s MMM, a proto jejich vyšetření je po analytické stránce mnohem náročnější⁸.

3. Metody pro stanovení tripletu biomarkerů Alzheimerovy nemoci

Pro vyšetřování uvedeného tripletu biomarkerů AN v biologických tekutinách byly popsány různé imunoanalytické metody, které se liší principem i použitými imuno-reagenciemi^{22–26}. Společně s imunochemickými metodami se rozvíjí i stanovení biomarkerů AN pomocí hmotnostní spektrometrie, která analyzuje proteiny z jiného pohledu bez potřeby specifických protilátek^{22,27}. V rámci standardizace stanovení tripletu biomarkerů AN byla hmotnostní spektrometrie vybrána jako referenční metoda pro analýzu A β 42 (cit.²⁸).

4. Vybrané imunoanalytické metody pro stanovení tripletu biomarkerů Alzheimerovy nemoci

V následujícím textu se zaměříme především na ty imunoanalytické metody, pro které jsou dostupné komerční soupravy pro stanovení biomarkerů AN. Některé z nich našly uplatnění v klinické praxi i v našich podmínkách (cit.^{4,29–31}).

- V analýze MMM se osvědčily metody vycházející z principů ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), ve kterých se imunochemická reakce odehrává na pevné fázi. Komerční soupravy pro vyšetřování biomarkerů AN jako pevnou fázi využívají plastový a uhlíkový povrch jamek mikrotitračních destiček nebo povrch mikrokuliček. Při kvantitativním hodnocení lze měřit absorbanci, fluorescenci, chemiluminiscenci, popř. elektrochemiluminiscenci²⁵.
- Informace o hladinách biomarkerů AN v krvi postupně získáváme pomocí citlivějších metod. Jako perspektivní vysoce citlivé imunoanalytické metody se jeví technologie SIMOA (Single Molecule Array) nebo IMR (immunomagnetic reduction)^{32,33}.

Komerčně jsou dostupné soupravy pro stanovení jednoho analytu nebo metody multiplexové pro současnou analýzu dvou nebo více proteinů. Některé z metod jsou plně automatizované^{34–37}.

4.1. Imunoanalytické metody pro stanovení jednoho biomarkeru Alzheimerovy nemoci

Metody ELISA

První vyšetření t-tau proteinu i jeho hyperfosforylované formy metodami ELISA bylo popsáno zhruba před 25 lety^{38,39}. Nejznámější jsou soupravy ELISA INNOTEST firmy Fujirebio Europe (Gent, Belgium). Existuje řada dalších komerčně dostupných souprav ELISA, ale ne

všechny byly validovány pro *in vitro* diagnostiku a mají označení CE-IVD (CE – značka shody, IVD – *in vitro* diagnostic medical device – zdravotnické prostředky určené pro diagnostiku *in vitro*). Souhrnné informace o použitých protilátkách ve vybraných soupravách ELISA pro stanovení tripletu biomarkerů AN jsou uvedeny v publikaci Andreassona a spol.²⁵.

Osobně máme zkušenosti se soupravami INNOTEST a EUROIMMUN AG (Lübeck, Germany). Pro obě soupravy ELISA jsme stanovili lokální normy^{4,29}.

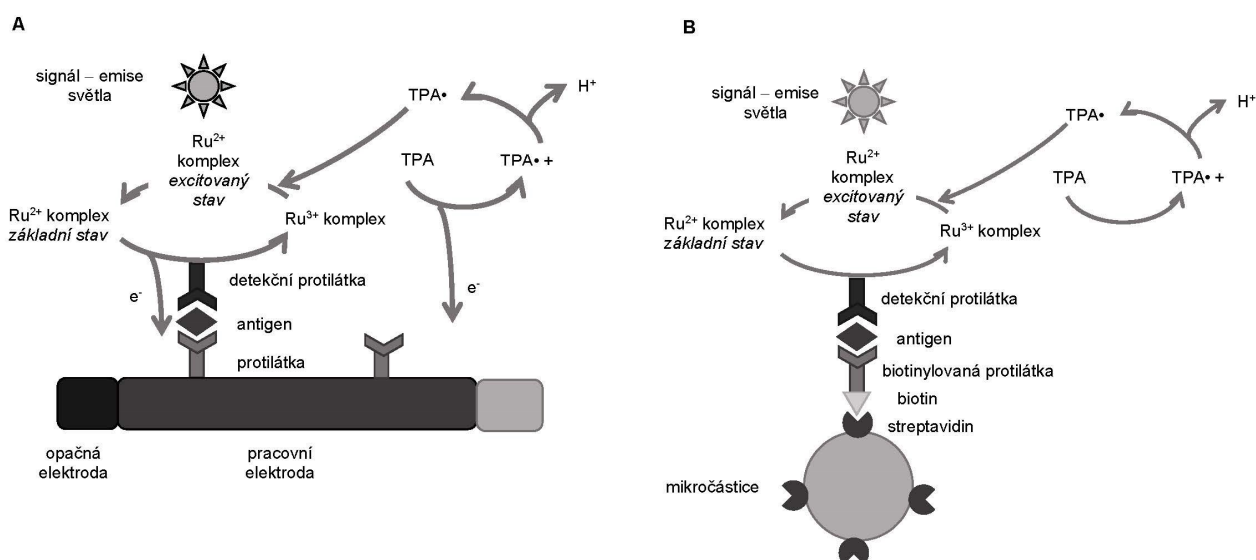
Elektrochemiluminiscenční a chemiluminiscenční metody

Dále pro stanovení tripletu biomarkerů AN existují komerční soupravy na bázi chemiluminiscence, popř. elektrochemiluminiscence. Za výhodu elektrochemiluminiscence je pokládána absence optické excitace, proto nedochází ke vzniku pozadí rozptylem světla⁴⁰.

Elektrochemiluminiscenční metody existují v různých modifikacích.

- Jedna z modifikací, sendvičová elektrochemiluminiscenční analýza, využívá uchycení protilátek na uhlíkové elektrodě. Pomocí těchto protilátek je vyváznán příslušný antigen ze vzorku. Se vzniklým imunokomplexem reaguje protilátka značená rutheniovým komplexem, který podmiňuje elektrochemiluminiscenční signál^{24,40} (obr. 2A).
- Na uvedeném principu pracují soupravy MESO Scale Discovery™ (MSD, Rockville, Maryland, USA), v nichž je uhlíková elektroda součástí jamek speciálních 96jamkových destiček^{41,42}. Vazebná kapacita jamek uvedených destiček pro protilátky je vyšší ve srovnání s klasickými mikrotitračními polystyrenovými ELISA destičkami a tím přispívá ke zvýšení citlivosti metody. Detekční protilátka v soupravě MSD jsou opatřeny elektrochemiluminiscenční značkou SULFO-TAG™ [ruthenium(II) tris-bipyridin-(4-methylsulfonát) *N*-hydroxysukcinimid ester], zprostředkující emisi světla, které je detegováno CCD (charge-coupled device) kamerou s vysokým rozlišením. Uvedená technologie umožňuje i paralelní měření několika analytů²⁴.
- Jako pevná fáze mohou sloužit také magnetické mikročástice, se kterými se setkáváme u souprav Elecsys (Roche Diagnostics GmbH, Německo) (obr. 2B). Elektrochemiluminiscenční reakce se u této modifikace odehrává v měřicí buňce, která obsahuje elektrodu. Mikročástice s navázaným sendvičovým imunokomplexem jsou magneticky přitaženy k elektrodě a po vložení napětí je indukována emise fotonů z rutheniového komplexu. Intenzita signálu je měřena fotonásobičem³⁵.

U chemiluminiscenčních enzymových imunoanalýz, na jejichž principu pracují soupravy Lumipulse Fujirebio Europe (Gent, Belgium), vzniká luminiscenční signál za pomoci alkalické fosfatasy, kterou je označena jedna z protilátek reagujících s antigenem. Enzym následně štěpí vhodný substrát na nestabilní produkt emitující světlo⁴³.



Obr. 2. Principy elektrochemiluminiscenčních sendvičových imunoanalytických metod využívaných ke stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci.

A. Soupravy MESO Scale Discovery (Meso Scale Diagnostics) (upraveno podle⁴⁰). Protílátka imobilizovaná na uhlíkové elektrodě specificky reaguje s příslušným antigenem ve vzorku. Na imunokomplex se váže další protílátka, která je značená rutheniovým komplexem. V přítomnosti tripropylaminu (TPA) jako koreaktantu dochází k redukci Ru^{3+} na Ru^{2+} , který při přechodu z excitovaného do základního stavu vyzáří foton. Ru^{2+} se zpětně oxiduje na Ru^{3+} na uhlíkové elektrodě.

B. Soupravy Elecsys (Roche Diagnostics). Na magnetické mikročástice se prostřednictvím streptavidinu váže sendvičový imunokomplex, obsahující biotinylovanou protílátku a protílátku značenou rutheniovým komplexem. Průběh elektrochemiluminiscenční reakce je popsán výše

4.2. Multiplexové metody pro stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci

Opakovaně bylo prokázáno, že vyhodnocení tripletu biomarkerů přináší přesnější diagnostickou informaci než hodnocení pouze jednoho parametru²¹. Z tohoto důvodu byly vyvinuty metody, které dovolují simultánní stanovení hlavních biomarkerů AN v jednom vzorku. Na rozdíl od metod pro stanovení pouze jednoho analytu multiplexové technologie snižují spotřebu vzorku potřebného k vyšetření několika parametrů, zkracují celkový čas potřebný k analýze a mohou být i ekonomicky výhodnější⁴⁴.

Na bázi xMAP® (x je počet biomarkerů testovaných simultánně, MAP – Multi-Analyte Profiling) technologie Olsson a spol.³⁷ navrhli pod označením INNO-BIA AlzBio3 multiparametrickou metodu pro stanovení t- i p-tau proteinů a Aβ42. xMAP® kombinuje imunoanalýzu s použitím mikrokuliček, průtokovou cytometrii, rychlé digitální zpracování signálu a multiplexové stanovení²². Jako pevná fáze slouží v technologii xMAP® mikrokuličky. Různé populace mikrokuliček obsahují v přesném poměru červené a infračervené fluorochromy, které jim udělají jedinečnou spektrální identitu. Další charakteristikou mikrokuliček jsou kovalentně navázané monoklonální protílátky specificky reagující s příslušným antigenem ve vzorku. Prostřednictvím těchto protílátek

a protílátek značených fluorescenčním barvivem fykocerytrinem se na povrchu mikrokuliček vytvoří sendvičový komplex^{37,44} (obr. 3). Poté je fluorescence mikrokuliček vyhodnocována analyzátozem pracujícím na principu průtokové cytometrie (např. LUMINEX®).

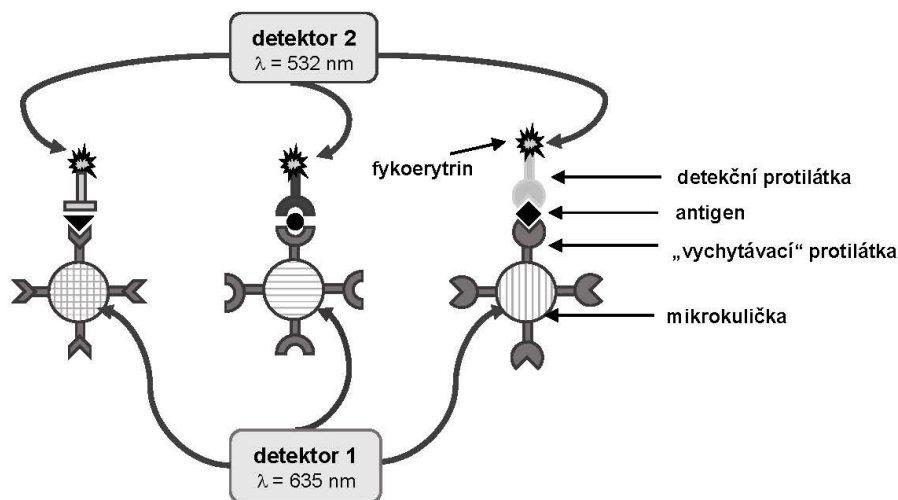
Opakovaně byla prokázána korelace výsledků získaných ELISA a xMAP® soupravami. Vzhledem k technologickým rozdílům mezi oběma metodami a nedořešené standardizaci nelze přímo srovnávat výsledky získané ELISA soupravami s výsledky z xMAP® souprav. Existuje však možnost jejich vzájemného přepočtu. Ve srovnání s metodou ELISA umožňuje xMAP® stanovit koncentrace v širším rozmezí. Diagnostická specifita a citlivost metod ELISA a xMAP® jsou podobné^{37,45,46}.

4.3. Vysoce citlivé metody pro stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci

Již dříve zmíněné technologie SIMOA a IMR, vhodné pro stanovení koncentrací biomarkerů v plazmě či séru, využívají odlišný analytický přístup. Podrobněji přiblížíme princip metody na platformě SIMOA.

SIMOA

SIMOA, označovaná také jako digitální ELISA, vychází z principů klasické metody ELISA, ale obvykle do-



Obr. 3. Princip multiplexového stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci pomocí technologie xMAP®. Každý soubor mikrokuliček určený pro stanovení určitého analytu je charakterizován jedinečným fluorescenčním kódem. Metoda pro multiplexové stanovení tripletu biomarkerů Alzheimerovy nemoci využívá tři sestavy mikrokuliček, charakterizovaných navázanými monoklonálními protilátkami specificky reagujícími s t-tau proteínem, p-tau proteínem nebo β -amyloidem 42. Antigeny přítomné ve vzorku jsou navázány příslušnými protilátkami na mikrokuličkách a detegovány biotinylovanými monoklonálními protilátkami za vzniku sendvičového imunokomplexu. Signálem pro průkaz imunokomplexu je fluorescenční barvivo fykoerytrin, kterým je označen streptavidin (není znázorněn) a reaguje s biotinem na detekčních protilátkách (biotin není znázorněn). Fluorescenční signály, které jednak charakterizují kuličku (detektor 1, excitace při vlnové délce $\lambda = 635$ nm) a tím stanovovaný analyt a jednak kvantifikují jeho množství (detektor 2, excitace při vlnové délce $\lambda = 532$ nm), jsou měřeny po ozáření dvojicí laserů^{26,37,44}

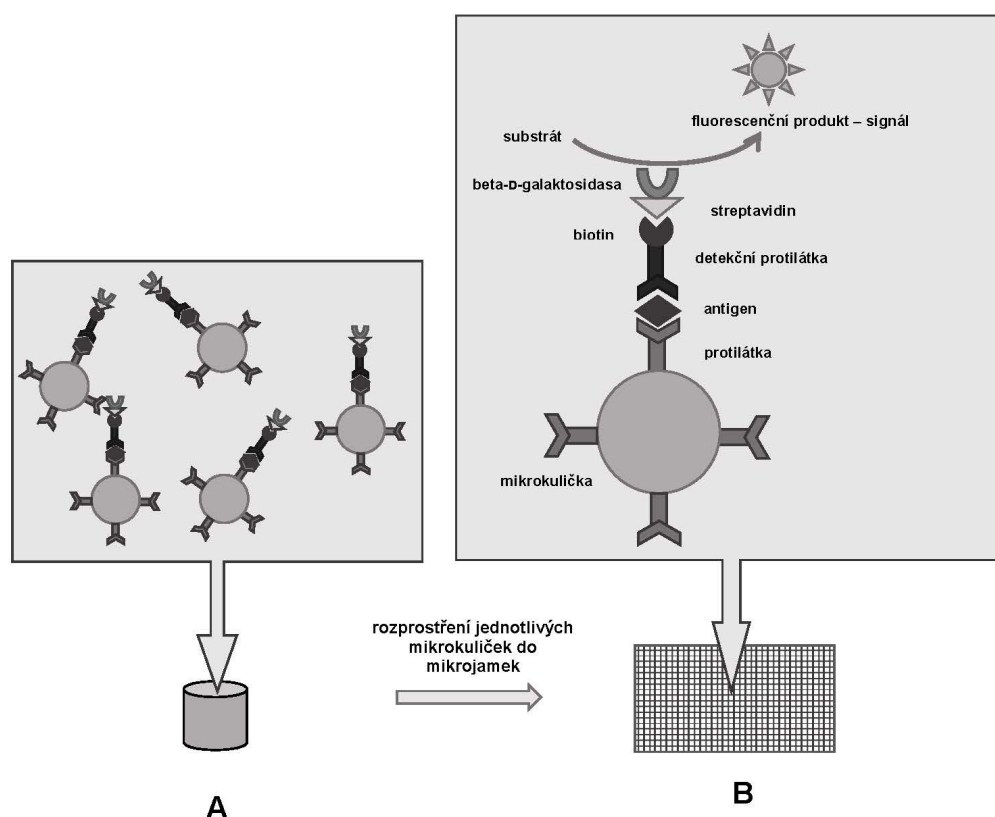
sahuje 1000krát vyšší citlivosti než konvenční metody ELISA. Využívá počítání jednotlivých imunokomplexů obsahujících stanovený antigen a zachycených na paramagnetických částicích. Jako detekční signál slouží fluorescence produktu vzniklého po rozštěpení substrátu enzymem navázaným na detekční protilátku⁴⁷ (obr. 4AB). Byla vyvinuta společností Quanterix (Lexington, Massachusetts, USA) a již jsou k dispozici komerční soupravy jak pro stanovení individuálních proteinů, tak pro vybrané multiplexy²³. Soupravy lze zpracovávat na automatických analyzátoch HD-1/HD-X nebo poloautomatických SR-X.

4.4. Plně automatizované imunoanalytické metody pro stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci

Ve snaze harmonizovat výsledky stanovení biomarkerů AN přicházejí někteří výrobci se soupravami pro plně automatizované analyzátoch. Zavádění automatizace zlepšuje přesnost prováděných analýz. Automatizace jednotlivých kroků pracovního postupu výrazně přispívá ke snížení rozkolísání výsledků a poklesu hodnot variačních koeficientů metod. Uvedený pokles byl již zaznamenán v hodnocení externí kontroly kvality^{8,34,35}. Tím se vytváří předpoklady pro zavádění vyšetření biomarkerů AN do širší klinické praxe.

Pro automatické analyzátoch Roche cobas e byly nedávno navrženy elektrochemiluminiscenční imunoanalytické soupravy Elecsys (Roche Diagnostic GmbH, Německo) určené pro stanovení tří základních biomarkerů AN (cit.^{35,36}). Všechny metody jsou charakterizovány nízkými hodnotami variačních koeficientů. Až na jednu výjimku vykazovaly soupravy Elecsys pro tau proteiny vysokou korelaci s jinými komerčními imunoanalytickými soupravami, i když koncentrace stanovené různými metodami se lišily. Souprava Elecsys pro A β 42 byla jako první standardizována pomocí referenční metody schválené JCTLM (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine)³⁵. Zcela nová studie poukazuje na možnost využití uvedených souprav pro A β 42 a t-tau protein nejen pro analýzu MMM, ale i krve¹⁸.

Plně automatizovaný postup pro vyšetření t-tau proteinu a A β 42 v MMM poskytuje i výrobce konvenčních ELISA souprav INNOTEST Fujirebio Europe (Gent, Belgium) pod označením Lumipulse® G β -amyloid-1-42 a Lumipulse® G Total Tau. Zpracování souprav probíhá na automatických imunoanalyzátoch Lumipulse® stejného výrobce na platformě chemiluminiscence. I pro tyto soupravy byla zjištěna dobrá korelace s manuálními metodami ELISA (cit.⁴⁸).



Obr. 4. Princip vysoce citlivé imunoanalytické metody SIMOA (single molecule arrays)

A. První krok metody SIMOA spočívá ve specifické reakci mezi antigenem ve vzorku a protilátkami navázanými na mikrokuličkách, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Po přidání detekční protilátky značené biotinem se na povrchu mikrokuliček vytvoří sendvičové imunokomplexy, na které se dále prostřednictvím streptavidinu naváže jeho konjugát s beta-D-galaktosidasou.

B. V dalším kroku následuje rozprostření jednotlivých mikrokuliček do mikrojamek tak, že v každé mikrojamce je pouze jedna mikrokulička. Přítomnost imunokomplexu na povrchu mikrokuliček je prokazována reakcí beta-D-galaktosidasou s fluorogenním substrátem. Koncentrace antigenu ve vzorku se hodnotí jako poměr jamek obsahujících imunokomplexy k celkovému počtu jamek s mikrokuličkami^{23,47}

5. Standardizace stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci

První výsledky studií externí kontroly kvality, která funguje již 10 let, poukazovaly na poměrně vysoké hodnoty variačních koeficientů pro jednotlivé biomarkery AN v MMM při srovnávání mezi jednotlivými pracovišti (metody ELISA 13–38 %), ale i v rámci jedné laboratoře^{49–51}. Rovněž existují rozdíly v hodnotách koncentrací biomarkerů AN analyzovaných různými metodami, i když korelace mezi nimi jsou většinou vysoké⁵².

Z výše uvedeného vyplývá nutnost standardizovat stanovení biomarkerů AN tak, aby hodnoty jejich koncentrací ve stejném vzorku vydávané různými laboratořemi v různém čase byly srovnatelné. Do procesu standardizace je zapojena Pracovní skupina pro proteiny mozkomíšního moku Mezinárodní federace klinické biochemie a laboratorní medicíny (IFCC) a Globální konsorcium pro standardizaci biomarkerů v mozkomíšním moku Alzheimerovy

společnosti společně s akademickými institucemi a výrobními podniky^{8,34,53,54}.

Proces standardizace stanovení tripletu biomarkerů AN byl zahájen vymezením preanalytických podmínek pro vzorky MMM. Jedná se zejména o podmínky odběru, centrifugace, transportu a uchovávání MMM a o typ zkuševky, do kterého se odběr MMM provádí^{55,56}. Definování některých preanalytických podmínek zbývá dorešit a pozornost je věnována i krvi, jako další biologické tekutině, v níž se stanovení biomarkerů stává aktuální^{57,58}.

V řešení je příprava mezinárodně uznávaných referenčních materiálů a vypracování referenčních metod pro stanovení jednotlivých biomarkerů. Výsledkem úsilí o standardizaci je příprava certifikovaného referenčního materiálu pro stanovení A β 42 v MMM a vypracování referenčních metod pro tento analyt založených na tandemové hmotnostní spektrometrii (LC-MS/MS)²⁸. Dále byla publikována kandidátní referenční metoda pro stanovení t-tau proteinu v MMM (cit.⁵⁹). Vyřešení problémů se stan-

dardizací metod pro základní biomarkery AN je předpokladem pro nastavení hraničních hodnot nezbytných pro jejich široké klinické využití.

6. Závěr

AN představuje závažné onemocnění, k jehož diagnostice jako doplňkové vyšetření slouží stanovení tripletu biomarkerů v MMM (A β 42, t-tau protein, p-tau protein). Zároveň je zkoumán přínos tohoto vyšetření v krvi. Pro jejich analýzu je v současnosti k dispozici poměrně bohaté spektrum imunoanalytických metod, umožňujících stanovení i velmi nízkých koncentrací v plazmě/séru. Velký pokrok byl učiněn při zavádění plně automatizovaných metod. V popředí zájmu vědců je dokončení procesu standardizace pro jednotlivé biomarkery.

Práce byla podpořena projekty PROGRES Q25, Q35 a MZ ČR – RVO VFN64165, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, grantem Ministerstva zdravotnictví NV18-07-00272 a grantem MPO, program Trio – FV40032.

Seznam zkratk

A β 42	β -amyloid 42
AN	Alzheimerova nemoc
CCD	zařízení vázající náboj (charge-coupled device)
CE	značka shody
ELISA	enzymová imunoabsorbční analýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
IFCC	Mezinárodní federace klinické biochemie a laboratorní medicíny (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory)
IMR	imunomagnetická redukce (immunomagnetic reduction)
IVD	<i>in vitro</i> diagnostický zdravotnický prostředek (<i>in vitro</i> diagnostic medical device)
JCTLM	Mezinárodní společná komise pro návaznost v laboratorní medicíně (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
MAP	multianalytové profilování (multi-analyte profiling)
MMM	mozkomíšni mok
NIA-AA	Národní institut pro stárnutí a Alzheimerova asociace (National Institute on Aging and Alzheimer Association)
p-tau	fosforylovaný tau protein
SIMOA	single molecule array
t-tau	celkový tau protein

LITERATURA

- Ressner P., Hort J., Rektorová I., Bartoš A., Rusina R., Líněk V., Sheardová K.: *Ceska Slov. Neurol. Neurochir.* 71, 494 (2008).
- Bartoš A.: *Ceska Slov. Neurol. Neurochir.* 82, 420 (2019).
- Věchetová G., Bolceková E., Jarošová Z., Orlíková H., Preiss M.: *Ceska Slov. Neurol. Neurochir.* 81, 29 (2018).
- Bartoš A., Čechová L., Švarcová J., Řičný J., Řípová D.: *Ceska Slov. Neurol. Neurochir.* 75, 587 (2012).
- Bartoš A., Řípová D.: *Psychiat. pro Praxi.* 1, 17 (2007).
- Lashley T. a 11 spoluautorů: *Dis. Model Mech.* 11, dmm.031781 (2018). doi:10.1242/dmm.031781.
- Dubois B. a 32 spoluautorů: *Lancet Neurol.* 13, 614 (2014).
- Blennow K., Zetterberg H.: *J. Intern. Med.* 284, 643 (2018).
- Bartoš A., v knize: *Neurodegenerativní onemocnění* (Rusina R., Matěj R., ed.), 2. vyd., kap. Likvorová diagnostika demencí, str. 92. Mladá fronta, Praha 2019.
- Olsson B. a 14 spoluautorů: *Lancet Neurol.* 15, 673 (2016).
- Masters C. L., Bateman R., Blennow K., Rowe C. C., Sperling R. A., Cummings J. L.: *Nat. Rev. Dis. Primers* 1, 15056 (2015).
- Albert M. S. a 13 spoluautorů: *Alzheimer's Dementia* 7, 270 (2011).
- Sperling R. A. a 20 spoluautorů: *Alzheimer's Dementia* 7, 280 (2011).
- Dubois B. a 18 spoluautorů: *Lancet Neurol.* 6, 734 (2007).
- Jack C. R., Jr. a 19 spoluautorů: *Alzheimer's Dementia* 14, 535 (2018).
- Blennow K.: *Neurol. Ther.* 6, 15 (2017).
- Park J. C. a 11 spoluautorů: *Brain* 142, 771 (2019).
- Palmqvist S. a 10 spoluautorů: *JAMA Neurol.* 76, 1060 (2019).
- Shi M. a 12 spoluautorů: *J. Alzheimers Dis.* 27, 299 (2011).
- Chan H. N., Xu D., Ho S. L., Wong M. S., Li H. W.: *Chem. Sci.* 8, 4012 (2017).
- Blennow K., Zetterberg H., Fagan A. M.: *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006221 (2012).
- Lista S., Zetterberg H., Dubois B., Blennow K., Hampel H.: *J. Neurol.* 261, 1234 (2014).
- Lue L.-F., Guerra A., Walker D. G.: *Neurol. Ther.* 6, 25 (2017).
- Andreasson U., Portelius E., Pannee J., Zetterberg H., Blennow K.: *Methods* 56, 464 (2012).
- Andreasson U., Vanmechelen E., Shaw L. M., Zetterberg H., Vanderstichele H.: *Biomark. Med.* 6, 377 (2012).
- Scarano S., Lisi S., Ravelet C., Peyrin E., Minunni M.: *Anal. Chim. Acta* 940, 21 (2016).
- Barthelemy N. R. a 10 spoluautorů: *J. Alzheimers Dis.* 51, 1033 (2016).
- Kuhlmann J. a 16 spoluautorů: *Clin. Chim. Acta.* 467, 27 (2017).
- Bartoš A., Smětáková M., Řičný J., Nosková L.,

- Fialová L.: *Cesk. Slov. Neurol. N.* 82, 533 (2019).
30. Fialová L., Bartoš A., Švarcová J., Doležil D., Malbohan I.: *Klin. Biochem. Metab.* 19, 113 (2011).
 31. Fialova L., Bartos A., Svarcova J.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 161, 286 (2017).
 32. Yang S.-Y., Chiu M.-J., Chen T.-F., Horng H.-E.: *Neurol. Ther.* 6, 37 (2017).
 33. Mattsson N. a 16 spoluautorů: *Neurology* 87, 1827 (2016).
 34. Lewczuk P. a 56 spoluautorů: *World J. Biol. Psychiatry* 19, 244 (2018).
 35. Bittner T. a 16 spoluautorů: *Alzheimer's Dementia* 12, 517 (2016).
 36. Lifke V. a 16 spoluautorů: *Clin. Biochem.* 72, 30 (2019).
 37. Olsson A., Vanderstichele H., Andreasen N., De Meyer G., Wallin A., Holmberg B., Rosengren L., Vanmechelen E., Blennow K.: *Clin. Chem.* 51, 336 (2005).
 38. Vandermeeren M., Mercken M., Vanmechelen E., Six J., van de Voorde A., Martin J. J., Cras P.: *J. Neurochem.* 61, 1828 (1993).
 39. Blennow K., Wallin A., Agren H., Spenger C., Siegfried J., Vanmechelen E.: *Mol. Chem. Neuropathol.* 26, 231 (1995).
 40. Štern P.: *Klin. Biochem. Metab.* 24, 120 (2016).
 41. Kruse N., Schulz-Schaeffer W. J., Schlossmacher M. G., Mollenhauer B.: *Methods* 56, 514 (2012).
 42. Pan C. a 10 spoluautorů: *J. Alzheimers Dis.* 45, 709 (2015).
 43. Marlet J., Bernard M.: *J. Clin. Lab. Anal.* 30, 5 (2016).
 44. Kang J. H., Vanderstichele H., Trojanowski J. Q., Shaw L. M.: *Methods* 56, 484 (2012).
 45. Monge-Argiles J. A., Munoz-Ruiz C., Sanchez-Paya J., Gasparini Berenguer R., Blanco Canto M. E., Leiva-Santana C.: *Biomed. Res. Int.* 2014, 765130 (2014).
 46. Wang L. S., Leung Y. Y., Chang S. K., Leight S., Knapik-Czajka M., Baek Y., Shaw L. M., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Clark C. M.: *J. Alzheimers Dis.* 31, 439 (2012).
 47. Cohen L., Walt D. R.: *Annu. Rev. Anal. Chem.* 10, 345 (2017).
 48. Paciotti S., Sepe F. N., Eusebi P., Farotti L., Cataldi S., Gatticchi L., Parnetti L.: *Clin. Chim. Acta* 494, 74 (2019).
 49. Lewczuk P. a 24 spoluautorů: *Neurosci. Lett.* 409, 1 (2006).
 50. Verwey N. A. a 22 spoluautorů: *Ann. Clin. Biochem.* 46, 235 (2009).
 51. Mattsson N. a 31 spoluautorů: *Alzheimer's Dementia* 9, 251 (2013).
 52. Kang J. H. a 18 spoluautorů: *Alzheimer's Dementia* 11, 772 (2015).
 53. Fenouil T., Fourier A., Quadrio I., Streichenberger N., Bernardini S., Zima T., Perret-Liaudet A., Meyronet D.: *Clin. Biochem.* 72, 15 (2019).
 54. Carrillo M. C. a 13 spoluautorů: *Alzheimer's Dementia* 9, 137 (2013).
 55. Vanderstichele H. a 11 spoluautorů: *Alzheimer's Dementia* 8, 65 (2012).
 56. Teunissen C. E. a 25 spoluautorů: *Neurology* 73, 1914 (2009).
 57. Hansson O. a 16 spoluautorů: *Alzheimer's Dementia* 14, 1313 (2018).
 58. Rozga M., Bittner T., Batrla R., Karl J.: *Alzheimers Dement. (Amst)* 11, 291 (2019).
 59. McAvoy T., Lassman M. E., Spellman D. S., Ke Z., Howell B. J., Wong O., Zhu L., Tanen M., Struyk A., Laterza O. F.: *Clin. Chem.* 60, 683 (2014).
- L. Fialová^{a, b}, T. Zima^a, and A. Bartoš^{c, d}** (^a *Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague*, ^b *Department of Health Care and Population Protection, Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague*, ^c *Department of Neurology, Third Faculty of Medicine, Charles University*, and ^d *National Institute of Mental Health*): **Overview of Immunoanalytical Methods for Determination of Alzheimer's Disease Biomarkers' Triplet in Cerebrospinal Fluid and Blood**
- A triplet of Alzheimer's disease biomarkers includes total (t-tau) protein, phosphorylated tau (p-tau) protein, and β -amyloid 42 (A β 42). The levels of Alzheimer's disease biomarkers in cerebrospinal fluid are closely related to the underlying neuropathological manifestations demonstrated in the brain in Alzheimer's disease patients. The triplet of the biomarkers significantly differentiates cognitively healthy persons from patients with not only developed Alzheimer's disease but also with mild cognitive impairment and provides prognostic information. The increasing interest in defining different types of dementia using neurobiological indicators stimulates the development of various methods for their detection. The article provides an overview of immunochemical methods that can be used to determine the triplet of Alzheimer's disease biomarkers, namely ELISA, fluorescence and electrochemiluminescence immunoassays, and resembles the ultrasensitive single molecule arrays for the analysis of biomarkers in blood. The possibility to determine the biomarkers simultaneously in a multiplex arrangement and the importance of fully automated methods are mentioned. It draws attention to the need to standardize methods intended for clinical purposes.
- Keywords:** Alzheimer's disease, total tau protein, phosphorylated tau protein, β -amyloid 42, chemiluminescence, ELISA, multiplex immunoassay, SIMOA
- Acknowledgements*
This work was supported by projects PROGRES Q25, Q35 and RVO VFN64165 - General University Hospital in Prague from the Ministry of Health of the Czech Republic and by grant NV18-07-00272 of Ministry of Health, program Trio – FV40032.