

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

DARJA PEZDIREC (HORVAT)

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DARJA PEZDIREC (HORVAT)

**BIOOZNAČEVALCI MOŽGANSKE OKVARE KOT POSLEDICE
KAROTIDNE ENDARTERIEKTOMIJE**

**BIOMARKERS OF BRAIN INJURY AS A CONSEQUENCE OF
CAROTID ENDARTERECTOMY**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravila v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev, Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Milana Skitka in somentorja doc. dr. Aleša Jerina.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Milanu Skitku in somentorju doc. dr. Alešu Jerinu za usmerjanje in koristne nasvete pri izdelavi naloge. Hvala tudi vsem delavkam v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev, za pomoč in nasvete pri praktičnem delu.

Posebno zahvalo posvečam svojim staršem in možu Dejanu, ki so me spodbujali skozi celoten študij. Zahvaljujem se tudi sodelavkam in sodelavcem diagnostičnega laboratorija v Zdravstvenem domu Ljubljana (enota Center).

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Milana Skitka in somentorstvom doc. dr. Aleša Jerina.

Darja Pezdirec

KAZALO

1. UVOD	1
1.1. ANATOMIJA MOŽGANSKEGA KRVNEGA PRETOKA	1
1.1.1. Karotidno deblo	2
1.2. KAROTIDNA BOLEZEN	2
1.2.1. Ateroskleroza	3
1.2.2. Dejavniki tveganja	5
1.2.3. Simptomi in znaki	5
1.2.4. Diagnostika	5
1.2.5. Preprečevanje in zdravljenje	6
1.3. MOŽGANSKE OKVARE KOT POSLEDICA KAROTIDNE ENDARTERIEKTOMIJE	7
1.4. BIOOZNAČEVALCI MOŽGANSKE OKVARE	8
1.4.1. Nevron specifična enolaza	9
1.4.1.1. Struktura in nahajanje	9
1.4.1.2. Lastnosti in funkcije	10
1.4.1.3. Metode določanja	11
1.4.2. Protein S-100	11
1.4.2.1. Struktura in nahajanje	11
1.4.2.2. Lastnosti in funkcije	12
1.4.2.3. Metode določanja	13
2. NAMEN DELA	14
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1. MATERIALI	15
3.1.1. Vzorci	15
3.1.2. Aparatura	15
3.1.3. Reagenti, raztopine, tekočine in dodatni material	16
3.1.4. Kontrolni material	18
3.1.5. Kalibracijski material	19
3.2. DELOVNI POSTOPEK	19

3.3.	METODE	20
3.3.1.	Elektrokemiluminiscenčna imunska metoda	20
3.3.1.1.	Interference	21
3.3.1.2.	Ponovljivost rezultatov	22
3.3.1.3.	Podajanje rezultatov in referenčne vrednosti	22
3.3.2.	Statistične metode	22
4.	REZULTATI	24
4.1.	REZULTATI MERITEV NEVRON SPECIFIČNE ENOLAZE	24
4.2.	REZULTATI MERITEV PROTEINA S-100	30
5.	RAZPRAVA	37
6.	SKLEP	43
7.	LITERATURA	44

POVZETEK

Ateroskleroza karotidnih arterij je v skoraj polovici primerov vzrok za možganski infarkt. Karotidna endarteriektomija (CEA) je kirurški poseg, pri katerem odstranimo ateromatozne spremembe v arteriji. Med posegom arterijo začasno zapremo, kar lahko privede do popolne prekinitve toka krvi do možganov, ki ima lahko za posledico možgansko kap. Slednja je lahko tudi posledica nenadne zamašitve možganske arterije, zaradi odtrganja delcev iz aterosklerotične lehe in pa tudi občutnega povečanja pretoka krvi skozi možgane, zaradi odstranitve pomembne zožitve karotidne arterije. Bolnike zato med samim posegom in po njem spremljamo, da bi zaznali morebitne poškodbe možganskih celic. Z določanjem koncentracij serumskih biooznačevalcev možganske okvare lahko pravočasno odkrijemo morebitno poškodbo možganov. Nevron specifična enolaza (NSE) in protein S-100 sta dva izmed najbolj poznanih in razširjenih označevalcev poškodbe nevronov. V raziskavi smo spremljali koncentracije teh dveh označevalcev pri 62 bolnikih po CEA. Kri smo operirancem odvzeli pred CEA, takoj po operaciji ter 12, 24 in 48 ur po CEA.

Ugotovili smo, da se glede na povprečno koncentracijo NSE pred CEA povprečne koncentracije NSE po CEA znižajo in sicer: takoj po CEA za 33,8 %, 12 ur po CEA za 43,2 %, 24 ur po CEA za 27,2 % in 48 ur po CEA za 11,1 %. Obstajajo statistično pomembne razlike med koncentracijami NSE izmerjenimi pred CEA in koncentracijami NSE izmerjenimi takoj po operaciji ter 12 in 24 ur po CEA (pri vseh je $P < 0,01$). Obstajajo tudi statistično pomembne razlike med koncentracijami NSE izmerjenimi 12 ur in 48 ur po CEA ($p < 0,01$). Glede na povprečno koncentracijo proteina S-100 pred CEA se povprečne koncentracije proteina S-100 po operaciji znižajo in sicer: takoj po CEA za 2,5 %, 12 ur po operaciji za 27,5 % in 24 ur po CEA za 17,5 %. 48 ur po CEA se povprečna koncentracija proteina S-100 ne razlikuje od povprečne koncentracije proteina S-100 pred CEA. Obstajajo statistično pomembne razlike med koncentracijami proteina S-100 izmerjenimi pred CEA in koncentracijami proteina S-100 izmerjenimi 12 ur po operaciji ($p < 0,01$). Obstajajo tudi statistično pomembne razlike med koncentracijami proteina S-100 izmerjenimi takoj po CEA in koncentracijami izmerjenimi 12 ur po CEA ($p < 0,01$). Prav tako smo ugotovili statistično pomembne razlike med koncentracijami proteina S-100 izmerjenimi 12 ur in 48 ur po CEA ($p = 0,01$). Iz rezultatov sklepamo, da pri bolnikih po CEA ni prišlo do poškodbe možganov, saj niso imeli zvišanih serumskih koncentracij NSE in proteina S-100.

ABSTRACT

Almost half cases of cerebral infarction are caused by the atherosclerosis in the carotid arteries. Carotid endarterectomy (CEA) is a surgical procedure in which atheromatous changes in the artery are removed. There are various factors which can cause a stroke during the surgery. Patient's consciousness is observed during and after the surgical procedure due to potential damage of neural cells. By determining the concentration of serum biomarkers, like neuron specific enolase (NSE) and protein S-100, brain damage can be detected. NSE and S-100 are two of the best known and most widely used markers of neuronal damage. In this study we monitored the concentration of these markers from 62 patients after CEA. Blood samples were taken prior CEA, immediately after CEA, 12, 24 and 48 hours after CEA. Serum samples were analyzed with electrochemiluminescence immune method by fully automated system.

We found out that the average concentration of NSE after CEA is lower. Immediately after CEA the average value of NSE was reduced by 33.8 %, after 12 hours by 43.2 %, after 24 hours by 27.2 % and 48 hours by 11.1 %. There is a significant difference between the average concentration measured before CEA and average concentration measured after CEA, 12 hours after CEA and 24 hours after CEA (all $P < 0.01$). There are also significant differences between the average concentrations of NSE measured 12 hours and 48 hours after the CEA ($p < 0.01$). The average concentration of the protein S-100 after CEA is lower. Immediately after CEA concentration was reduced by 2.5 %, after 12 hours by 27.5 % and after 24 hours by 17.5 %. 48 hours after CEA, the average concentration of the protein S-100 did not differ from the average concentration of protein S-100 prior CEA. There are significant differences between the concentrations of protein S-100 measured before CEA and the concentrations of protein S-100 measured 12 hours after surgery ($p < 0.01$). There are also significant differences between the concentrations of protein S-100 measured immediately after CEA and the concentration measured 12 hours after CEA ($p < 0.01$). We also found a significant difference between the concentrations of protein S-100 measured 12 hours and 48 hours after CEA ($p = 0.01$). After the operation none of the patients had increased concentrations of NSE, while two had marginally elevated concentration of the protein S-100. We concluded that in most patients, there was no damage to the brain due to CEA.

SEZNAM OKRAJŠAV

CEA	karotidna endarteriektomija
CRP	C-reaktivni protein
CTA	računalniško tomografska angiografija
DSA	digitalna subtrakcijska angiografija
hs-CRP	visoko specifični C-reaktivni protein
ICAM-1	medcelične adhezijske molekule-1
IL-6	interlevkin-6
LDL	lipoproteini majhne gostote
M-CSF	makrofagno kolonijo stimulirajoči dejavnik
MRA	magnetno resonančna angiografija
NSE	nevron specifična enolaza
VCAM-1	žilno – celične adhezijske molekule-1

1. UVOD

Bolezni srca in ožilja so najpogostejši vzrok obolevnosti in smrtnosti v razvitem svetu. Ateroskleroza karotidnih arterij je bolezen sodobnega časa. Kirurška odstranitev aterosklerotične lehe je tvegan poseg, ki lahko privede do poškodbe možganskih celic. Z biooznačevalci možganske okvare, kot sta protein S-100 in nevron specifična enolaza (NSE), lahko prepoznamo morebitne možganske okvare (1, 2, 3).

1.1. ANATOMIJA MOŽGANSKEGA KRVNEGA PRETOKA

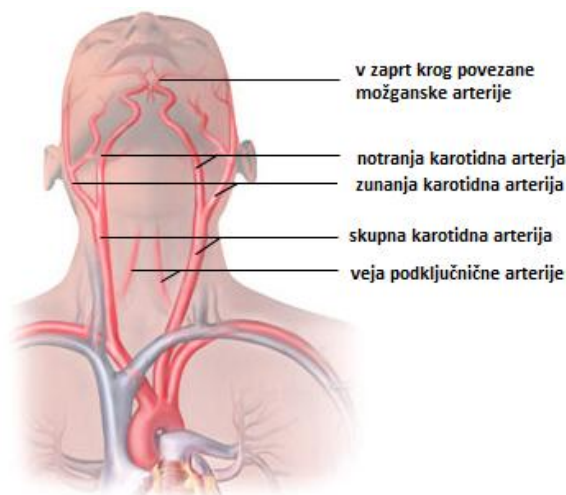
Možganski krvni pretok sestoji iz zunaj- in znotraj- lobanjskih arterij ter iz venskega sistema.

Arterije, ki oskrbujejo možgane, izstopajo iz aortnega loka. Na desni strani izstopa brahiocefalni trunkus, ki se razdeli v desno podključnično arterijo in desno skupno karotidno arterijo. Na levi strani direktno iz aortnega loka izstopata leva podključnična arterija in leva skupna karotidna arterija. Vse te žile spadajo med zunajlobanjske možganske arterije. Skupna karotidna arterija (karotida) se deli na zunanjo in notranjo karotidno arterijo. Zunanja prehranjuje večino glave in vratu, razen možganov in zrkla. Notranja vstopa v lobanjsko votlino in prehranjuje večji del možganov, zrklo, očesno votlino ter notranje uho. Iz nje izhajajo tudi veje za nosno votlino in čelo. Med znotrajlobanjske možganske arterije spadajo sprednje, zadajšnje in bazalne možganske arterije. Prehranjujejo možgane, male možgane, možgansko deblo, hrbtenjačo in notranje uho. Bazalne možganske arterije povezujejo prednje in zadajšnje možganske arterije prek zadajšnjih komunikantnih arterij. V zaprt krog pa povezujejo tudi oba karotidna sistema.

Venski možganski sistem sestavljajo vratne, kortikalne in možganske vene. Vloga največje globoke vratne vene je odvajanje krvi in cerebrospinalne tekočine. Kortikalne vene so površinske vene, ki jih je od 20 do 30 v vsaki možganski polobli. Globoke možganske vene odvajajo kri iz centralnih struktur, iz belega tkiva ob možganskih ventriklih in iz bazalnih ganglijev (4, 5).

1.1.1. Karotidno deblo

Leva skupna karotida izstopa direktno iz aortnega loka, desna pa iz brahiocefaličnega trunkusa. Leva je nekoliko daljša in variira pogosteje kot desna. Vratni del skupne karotide sega od prsno – ključničnega sklepa do ščitničnega hrustanca in se na tej višini deli v zunanjo in notranjo karotidno arterijo (Slika 1). **Zunanja karotidna arterija** poteka od ščitničnega hrustanca do spodnje čeljustnice in se deli v več vej. Veja arterija temporalis superficialis je pomembna zaradi očesne zveze dveh žil. Pri zoženju ali zapori notranje karotidne arterije se vzpostavi manjša stranska veja očesne arterije. Smer cirkulacije v očesni arteriji preide iz fiziološke v nasprotno smer. **Notranja karotidna arterija** ima v začetnem delu rahlo razširjen lumen, kjer prihaja do spremembe krvnega pretoka. Vzpenja se lateralno od zunanje karotidne arterije in medialno od žrela. Vse do lobanje se notranja karotidna arterija ne deli, tam pa se razdeli v več manjših vej (4).



Slika 1: Delitev karotidnih arterij, prirejeno po (6)

1.2. KAROTIDNA BOLEZEN

"Karotidna bolezen je pravzaprav sinonim za aterosklerozo razcepišča karotidnih arterij z zožitvijo ali zaporo zunajlobanjskega dela notranje karotidne arterije" (7). Aterosklerozna je v več kot 90 % primerov vzrok zožitev karotidnih arterij. Med druge bolezni zunajlobanjskih možganskih arterij prištevamo anevrizmo, disekcijo, fibromuskularno displazijo in arteriitis (8).

1.2.1. Ateroskleroza

Lobstein je leta 1883 prvi označil pojem arterioskleroza kot proces staranja arterije. Pri tem pride do izgube elastičnosti žile, povečane vsebnosti kalcija, zadebelitve notranje plasti arterijske stene in povečanega premera žilne svetline. Marchand je leta 1904 definiral ateroskleroza kot zbiranje maščobnih in proteinskih vsebin v notranji plasti arterijske stene, zato ta postane trda in neprožna (4). Svetovna zdravstvena organizacija pa je leta 1958 ateroskleroza definirala kot spremembe v notranji plasti arterije, zaradi kopičenja lipidov, ogljikovih hidratov, krvi in krvnega materiala, fibroznega tkiva in kalcijevih snovi (9).

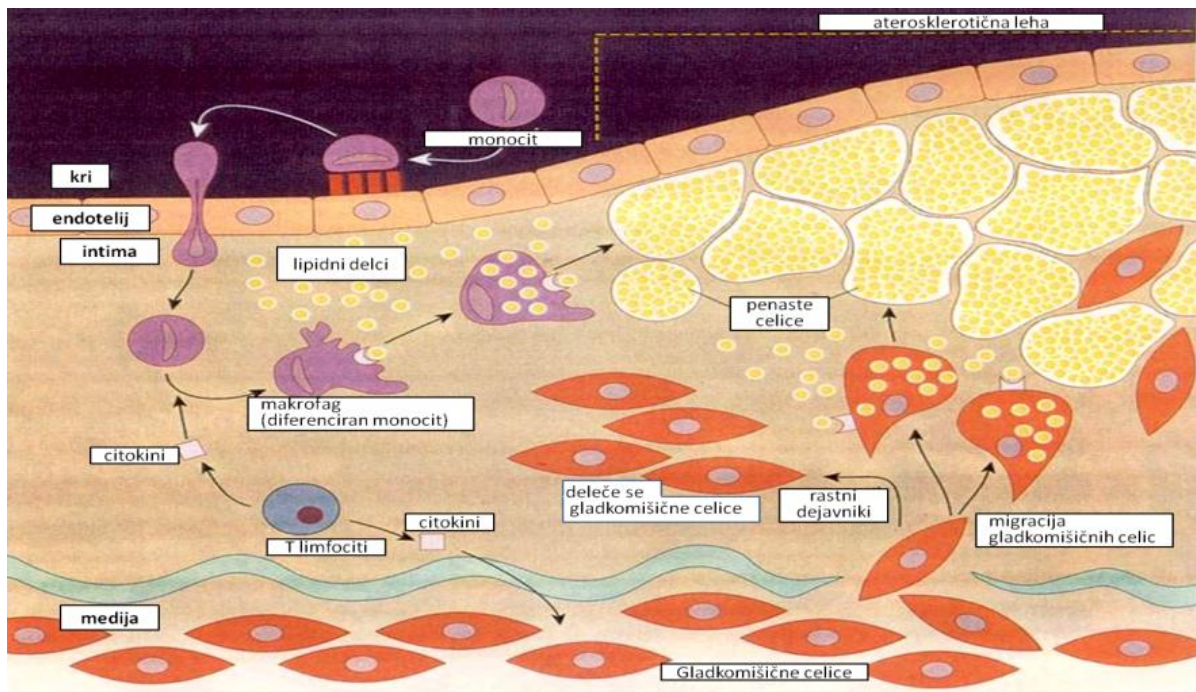
"Ateroskleroza je kronična napredujoča bolezen arterij, ki najprej prizadene notranjo plast arterijske stene – intimo" (1).

Dejavniki, ki lahko poškodujejo notranjo plast žile (žilni endotelij):

- fizikalni: turbulentni tok krvi in povišan krvni tlak
- kemični: nikotin in ogljikov monoksid
- presnovni: holesterol in homocistein
- biološki: virusi, bakterije, aktivirani levkociti/trombociti in kompleksi antigen-protitelo (1).

Endotelij na notranji strani zdravih arterij je neprepusten za krvne celice. Poškodovan endotelij pa je prepusten, kar povzroči kopičenje krvnih celic (monocitov, limfocitov T), lipoproteinov in holesterola v notranjosti arterije. Monociti in limfociti se pritrdijo na endotelijske celice s pomočjo medceličnih adhezijskih molekul-1 (ICAM-1), žilno-celičnih adhezijskih molekul-1 (VCAM-1), E-selektina in P-selektina. VCAM-1 in ICAM-1 se izražajo na površini aktiviranih endotelijskih celic pod vplivom turbulentnega toka krvi in oksidativnega stresa. Po pritrditvi monociti preko medendotelijskih celičnih stikov prehajajo v intimo (Slika 2). Tukaj se pod vplivom makrofagno kolonijo stimulirajočega dejavnika (M-CSF) diferencirajo v makrofage. M-CSF je citokin, ki nastaja v vnetno spremenjeni intimi in poveča izražanje tollu-podobnih receptorjev in odstranjevalnih receptorjev na površini makrofaga. Preko teh receptorjev makrofagi prepoznajo in prevzamejo oksidirane delce LDL (lipoproteini majhne gostote). Pri razgradnji oksidiranih delcev nastane holesterol, ki se znotraj makrofaga kopiči v obliki kapljic in celico

postopoma spremeni v t.i. penasto celico. Aktivirani makrofag pospešeno izloča vnetne citokine, proteaze ter toksične kisikove in dušikove radikale. Citokini vplivajo na limfocite T, kar privede do celičnega imunskega odziva. Posledično se izloča interferon gama, ki aktivira makrofage in stimulira sintezo vnetnih citokinov. Sproži se kaskada, ki privede do lokalnega in sistemskega vnetja ter povečane proizvodnje interleukina-6 (IL-6), C-reaktivnega proteina (CRP) in fibrinogena. V intimi arterijske stene se s samim vstopanjem levkocitov prične kronično vnetje. V kasnejšem poteku aterogeneze začnejo penaste celice odmirati in se kopičiti v intimi ter tvoriti maščobno leho. Gladkomišične celice se odzovejo na citokine in rastne dejavnike na tak način, da začnejo prehajati iz srednje v zunanjo plast arterijske stene. Tam izločajo zunajcelična proteina elastin in kolagen.



Slika 2: Nastajanje aterosklerotične lehe, prirejeno po (10) iz vira (11)

Proces vodi k pomembnemu zmanjšanju lumna arterije, ima pa tudi zaščitno funkcijo, saj ščiti pred trombozo in pretrganjem plaka. Maščobna leha se sčasoma preoblikuje v aterosklerotično leho (plak, aterom), ki raste in se preoblikuje v fibrozni plak, v katerega se odlagajo kalcijeve soli. Arterijska stena postane trda in neelastična, takšno stanje pa je ireverzibilno. Najnevarnejše so nestabilne lehe, katerih ogrodje se razgradi ob prisotnosti proteolitičnih encimov (izločajo jih aktivirani limfociti). Takšne lehe so neodporne na hemodinamski stres (12, 13, 14).

1.2.2. Dejavniki tveganja

Dejavnike tveganja lahko razdelimo v tri skupine:

1. Dejavniki, na katere imamo vpliv: hrana z veliko holesterola in nasičenih maščob, kajenje, fizična neaktivnost;
2. Dejavniki izhajajoči iz bolezenskih stanj, na katere imamo delni vpliv: visok krvni pritisk, zvišan serumski holesterol in trigliceridi, sladkorna bolezen in okužbe;
3. Dejavniki, na katere nimamo vpliva: starost, spol, dedna nagnjenost k zgodnji aterosklerozi in telesni ustroj (1).

1.2.3. Simptomi in znaki

Če je zožitev asimptomatska, jo težko prepoznamo. Nanjo pomislimo ob prisotnosti arterijskega šuma nad razcepiščem skupne karotidne arterije.

Simptomatska zožitev povzroča predvsem nevrološke znake in simptome, kot so omtvelost ene strani telesa, zmedenost, prehodna slepota ter težave pri govoru. V skrajnem primeru lahko nastopita prehodni ishemični napad in možganska kap (8, 15).

1.2.4. Diagnostika

Arteriografija (angiografija) je ključna pri odkrivanju bolezenskih sprememb na arterijah. Gre za rentgensko metodo z vbrizgavanjem kontrastnega sredstva, ki dobro prikaže žilje. Poznamo digitalno subtrakcijsko (DSA), računalniško-tomografsko (CTA) in magnetnoresonančno angiografijo (MRA). S temi preiskavami opredelimo patomorfološke značilnosti žilja in prehodnost karotidnih arterij (8).

Ultrazvočni pregled vratnih arterij je neinvazivna in poceni preiskava, s katero ugotavljamo morfološke spremembe žil. Barvna dvojna ultrasonografija (barvna Dopplerjeva sonografija) je manj zanesljiva od tridimenzionalne ultrasonografije. S slednjo lahko natančneje ocenimo morfologijo aterosklerotičnih leh (4, 8, 16).

Študije kažejo, da je sedimentacija eritrocitov (hitrost usedanja eritrocitov) pomembna **laboratorijska preiskava**, ki nam da podatek o jakosti vnetnega odziva (17). C-reaktivni protein (CRP) je reaktant akutne faze vnetja (18), ki je kljub slabi specifičnosti pokazatelj razširjenosti ateroskleroze in tveganja za srčno-žilne dogodke (19, 20). Visoko občutljivi C-reaktivni protein (hs-CRP) se je izkazal kot uporaben bioznačevalec vnetja žil v povezavi z aterosklerozo, saj pokaže tudi zelo nizko raven kroničnega vnetja (21).

1.2.5. Preprečevanje in zdravljenje

S poznavanjem in preprečevanjem dejavnikov tveganja lahko preprečimo razvoj ateroskleroze in delno upočasnimo njeno napredovanje. Učinkovitega zdravila za zdravljenje ateroskleroze do danes še niso odkrili. Zdravila (antikoagulacijska in antiagregacijska) se uporabljajo le za odpravljanje posledic napredovalega procesa ateroskleroze. Primarna preventiva je uspešnejša kot operativni poseg ob nastopu bolezni. Vključuje splošne ukrepe za zmanjševanje ogroženosti in usmerjene ukrepe, s katerimi iščemo najbolj ogrožene posameznike (1).

Karotidna endarteriektomija je operacijska odstranitev aterosklerotične spremembe v žili, pri kateri se odstrani tudi zadebeljeno intimo arterije. Za operacijo so primerne tiste osebe, ki imajo znake možgansko-žilne bolezni in karotidno arterijo zoženo za 70 % ali več. V takšnem primeru je bolnik v veliki nevarnosti, da utrpi ishemično možgansko kap. Primerni so tudi tisti bolniki, ki imajo zoženo vratno arterijo za več kot 50 % in so že utrpeli nevrološki dogodek. Operacija navadno poteka v lokalni anesteziji, ob kateri se ves čas nadzoruje možgansko funkcijo. Na vratu najprej vzdolžno prerežejo kožo, da se pokaže karotidna arterija. Žilo začasno zaprejo, kar lahko privede do prekinitve toka krvi do možganov in v najslabšem primeru lahko pride do možganskega infarkta (22). V večini primerov se zato poslužujejo znotraj žilnega obvoda, ki omogoča prekrvavitev možganov med operacijo. Tudi vstavljanje obvoda je tvegano, saj lahko med tem pride do odkrušenja aterosklerotične lehe, kar lahko prav tako privede do možganske kapi (23, 24). Žilo očistijo in jo zaprejo s pomočjo posebne krpe. Po operaciji je ponovno vzpostavljen normalen pretok krvi do možganov (22).

Pri odločanju za operativni poseg na karotidni arteriji je pomemben izbor ustreznih bolnikov. Kontraindikacije za operacijo so srčno popuščanje, angina pectoris, miokardni infarkt v zadnjih šestih mesecih, nestabilni krvni tlak, kronična obstruktivna pljučna bolezen, možganska kap v zadnjih šestih tednih in popolna zapora karotidne arterije. Bolnikom brez simptomov, ki imajo zoženo žilo za več kot 75 %, je operativni poseg priporočljiv le v nujno potrebnih primerih (25).

Karotidna angioplastika s stenom je novejša manj invazivna metoda, kjer v zožen del žile vstavimo žilno opornico in z balončkom razširimo žilo. Opornica preprečuje ponovno zožitev in embolizacijo na tem mestu žile. Med samim postopkom je treba biti zelo pozoren in uloviti odkrušene delce, ki nastanejo med širjenjem balončka, da ti ne bi zašli v znotrajlobanjske arterije (8).

1.3. MOŽGANSKE OKVARE KOT POSLEDICE KAROTIDNE ENDARTERIEKTOMIJE

Med samim operativnim posegom in po njem lahko pride do resnih zapletov. Mednje spadata možganska kap in miokardni infarkt, ki lahko privedeta do smrti bolnika. Možganska kap je v večini primerov posledica nenadne zamašitve možganske arterije zaradi odtrganja delcev iz aterosklerotične lehe. Kap je lahko tudi posledica občutnega povečanja pretoka krvi skozi možgane, ki je posledica odstranitve pomembne zožitve karotidne arterije. Operativen poseg je nevaren tudi zaradi nastanka tromboze na mestu posega. Zmanjšanje možganskega krvnega pretoka privede do ishemije (4). Pri ishemični poškodbi možganov gre za kompleksen patofiziološki proces, ki vključuje številne procese, kot je izpad energije, neravnovesje v homeostazi ionov, znotrajcelična preobremenitev s kalcijem, oksidativni stres, nevronska ekscitotoksičnost, vnetje in aktivacija glialnih celic. Vsi ti procesi skupaj privedejo do apoptoze celic in disfunkcije krvno-možganske pregrade (26, 27).

1.4. BIOOZNAČEVALCI MOŽGANSKE OKVARE

Ocena poškodbe možganov temelji predvsem na kliničnem pregledu in slikovnih tehnikah. Te metode pa ne zadostujejo za oceno resnosti in razsežnosti poškodb možganov (28). Računalniška tomografija možganov navadno ne zazna ishemične možganske kapi v roku šestih ur po njenem nastopu in lezij ni videti tudi do 24 ur (26). Zato so nam v pomoč številni serumski označevalci, ki kažejo na poškodbe možganskih celic (28). V Preglednici 1 so naštetih nekateri biooznačevalci ishemične poškodbe možganov.

Preglednica 1: Biooznačevalci ishemične poškodbe možganov

Biooznačevalci različnih patofizioloških procesov pri ishemični poškodbi možganov	
Vaskularne poškodbe	D-dimer, Von Willebrandov faktor (vWF), asimetrični dimetilarginin (ADMA), endotelin 1 (ET-1), tkivni plazminogeni aktivator (tPA), inhibitor plazminogenega aktivatorja tipa 1 (PAI-1), proenkefalin A (PENK-A), protacikinin A (PTA), celični fibronektin (c-Fn), matriksne metaloproteinaze 9 (MMP-9)
Presnovne spremembe (metabolni označevalci)	Holesterol, albumin, kortizol, homocistein
Oksidativne poškodbe	Superoksid dismutaza (SOD), dušikov monoksid (NO), bilirubin
Vnetje	C-reaktivni protein (CRP), različni interleukini (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17), medcelične adhezijske molekule-1 (ICAM-1), žilno celične adhezijske molekule-1 (VCAM-1), E-selektin, P-selektin, tumorje nekrotizirajoči dejavnik α (TNF- α), transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β), z lipoproteini povezane fosfolipaze A2 (Lp-PLA2), pentraksin 3 (PTX3),
Poškodbe centralnega živčnega sistema	Nevron specifična enolaza (NSE), protein S-100, mielin bazični protein (MBP), glialni fibrilarni kisli protein (GFAP), kreatin kinaza (CK-BB)
Drugi	Mikro RNA (miRNA), kopeptin, N-metil-D-aspartat (NMDA) receptor

1.4.1. Nevron specifična enolaza

Enolaze so glikolitični encimi znotraj celice, kateri v procesu glikolize katalizirajo pretvorbo 2-fosfo-D-glicerata v fosfoenolpiruvat. Kot dejavnik je pri reakciji potreben še magnezijev ion. Enolaze nimajo le encimskega delovanja, temveč so več-funkcijski proteini prisotni v različnih tkivih, kjer sodelujejo v specifičnih regulatornih funkcijah (29, 30).

1.4.1.1. Struktura in nahajanje

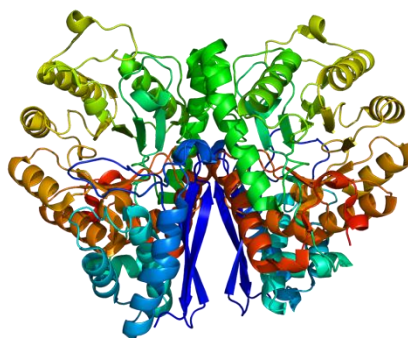
Funkcionalno aktivna enolaza je v obliki dimera. Ta je sestavljen iz nekovalentno povezanih podenot α , β in γ . Kombinacije teh treh podenot tvorijo pet homo- in heterodimernih izoencimov (Preglednica 2) (29).

Preglednica 2: Vrste enolaz in njihovo nahajanje

Dimerni izoencim	V človeškem organizmu	Nahajanje
$\alpha\alpha$	Da	Večina tkiv, nevroni in celice glie v zgodnji stopnji razvoja možganov, makrofagi
$\beta\beta$	Da	Mišične celice
$\gamma\gamma$	Da	Diferencirani in zreli nevroni, celice difuznega neuroendokrinega sistema, možganski tumorji, v nizkih koncentracijah tudi v ne-nevronskih celicah (eritrociti, trombociti, tkivo dojke, prostate in maternice)
$\alpha\beta$	Ne	Mišične celice
$\alpha\gamma$	Ne	Nevronske celice, celice difuznega neuroendokrinega sistema, v nizkih koncentracijah tudi v ne-nevronskih celicah (eritrociti, trombociti, tkivo dojke, prostate in maternice)

Gama enolaza ali nevron specifična enolaza (NSE) se nahaja pretežno v citosolu celic, prisotna pa je tudi v jedru, pod plazemsko membrano, na površini celic in v zunajceličnem

prostoru. V svoji strukturi (Slika 5) vsebuje motiv, ki ga prepoznajo posebni proteini, vključeni v znotrajcelično prerazporejanje molekul (29, 31, 32).



Slika 5: Struktura nevron specifične enolaze (33)

1.4.1.2. Lastnosti in funkcije

Aktivacijo signalnih poti gama enolaze navadno povzroči aktivacija receptorja Trk (32). To je družina treh tirozin kinaznih receptorjev, od katerih se vsak lahko aktivira z nevrotrofinom. Med nevrotrofine spadajo živčni rastni dejavnik, derivati možganskega nevrotrofičnega dejavnika in nevrotrofina 3 in 4 (34). Ko se na Trk receptor veže nevrotrofin, pride do sprostitve treh glavnih signalnih poti. Ena od poti spodbudi diferenciacijo nevronov, druga posreduje signale potrebne za rast in preživetje nevronov in drugih celic, tretja pa spodbuja sinaptično plastičnost (spreminjanje števila ali funkcionalne učinkovitosti sinaps). Vsaka od teh treh poti uravnava tudi prepisovanje genov (35). Te procese uravnava encim cisteinska proteaza katepsin X, ki lahko cepi določene aminokisliline v α - in γ -enolazi in posledično regulira nevrogenozo in preživetje nevronskih celic. Nevron specifična enolaza olajšuje preživetje nevromom srednjih možganov in možganske skorje ter nevromom hrbtenjače. Prav tako zasledimo njen neuroprotektivni učinek, ko izpostavimo nevrone atmosferi z nizko vsebnostjo kisika. V primeru nevrološke motnje koncentracija nevromom specifične enolaze poraste. S tem se poveča možnost preživetja poškodovanim nevromom (36). V kri in cerebrospinalno tekočino se nevromom specifična enolaza sprošča ob razpadu nevronskih celic in celic krvno-možganske bariere in po poškodbi možganov. Zvišane vrednosti tega tumorskega označevalca so značilne predvsem za drobnocelični pljučni rak in nevroblastom, torej tumorje, ki izvirajo iz nevroendokrinega in nevrogenega sistema (31, 32). Biološki razpolovni čas nevromom specifične enolaze je več kot 20 ur (37).

1.4.1.3. Metode določanja

Za določanje nevron specifične enolaze se najpogosteje uporabljajo imunološke metode, pri katerih je analizirani vzorec serum. Princip je pri vseh metodah podoben. Antigen iz vzorca inkubiramo z dvema vrstama specifičnih protiteles, ena izmed njih so posebno označena. Prvo protitelo in drugo protitelo se vežeta na isti antigen iz vzorca in skupaj tvorijo sendvič kompleks. Komplekse odkrivamo s pomočjo oznak na protitelesih:

- IFMA – imunofluorometrična metoda, eno protitelo označeno s fluorescenčno sondo (europij, fluorescein, rodamin,..) (38)
- ICMA – imunokemiluminometrična metoda, eno protitelo označeno z luminolom (39).
- IEMA – immunoencimometrična metoda, pri kateri imunske komplekse detektiramo kolorimetrično, saj je eno protitelo označeno s hrenovo peroksidazo (40).
- IRMA – imunoradiometrična metoda, kjer komplekse antigen - protitelo detektiramo radioizotopsko. Eno protitelo je označeno z radioizotopskim jodom (^{125}I) (41).
- ECLIA – elektrokemiluminiscenčna imunska metoda je podrobneje opisana v poglavju 3.3.1.

1.4.2. Protein S-100

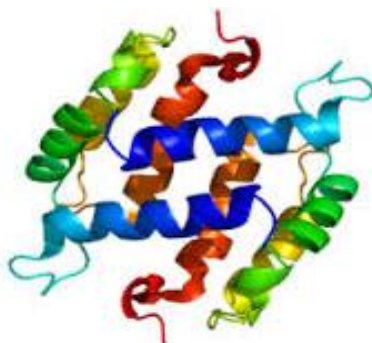
Protein S-100 je citoplazemski protein in eden najbolj raziskanih in klinično uporabnih označevalcev možganske okvare. Ime je dobil zaradi popolne (100 %) topnosti v amonijevem sulfatu pri nevtralnem pH (3).

1.4.2.1. Struktura in nahajanje

Protein S-100 pripada multigenski družini proteinov, ki vežejo kalcijeve ione (42). V njej se nahaja vsaj 25 različnih tipov S-100 proteinov, od tega jih je 22 na 1q21 kromosomu (43). Celotna družina S-100 proteinov ima dve specifični vezavni mesti za kalcij, imenovani EF-dlan (40). Vsi proteini družine S-100 tvorijo dimere. V možganskih celicah človeka se protein S-100 nahaja predvsem v obliki homodimera $\beta\beta$ (S-100B).

Najdemo ga v citoplazmi glialnih celic (Schwanove celice in astrociti) centralnega in perifernega živčevja ter v hondrocitih, adipocitih in melanocitih (3). α -podenota proteina S-100 je prisotna v celicah miokarda, mišičnih vlaknih, ledvičnih tubulih ter v hondrocitih, folikularnih celicah ščitnice, eksokrinih žlezah in celicah trebušne slinavke (44).

Protein S-100B je sestavljen iz 92 aminokislin. Specifično vezavno mesto za kalcij ima sekundarno strukturo vijačnica-zanka-vijačnica. Ob vezavi kalcija na znotrajcelični S-100B se protein spremeni iz zaprte (Slika 6) v odprto obliko. Sprememba terciarne strukture se izraža v različnih bioloških učinkih, motiv EF-dlan pa ostane enak (45).



Slika 6: Struktura proteina S-100 (46)

1.4.2.2. Lastnosti in funkcije

Proteini S-100 sodelujejo pri uravnavanju homeostaze kalcija, proliferaciji celic, apoptozi, invaziji in gibljivosti celic, proteinski fosforilaciji, regulaciji transkripcijskih dejavnikov, avtoimunosti, kemotaksi, vnetju, pluripotentnosti itd. Spremenjeno izražanje proteinov S-100 je povezano z nastankom tumorja, njegovim napredovanjem in prognozo. Ker je večina genov iz te družine nagnetenih na človeški kromosom 1q21, je regija nagnjena h genomskim preureditvam (47, 48). Protein S100 je pomemben pri procesu regeneracije in degeneracije možganskega tkiva. V nizkih koncentracijah je njegovo delovanje zaščitno, saj izboljša preživetje nevronov po kapi. V visokih koncentracijah pa povzroči apoptozo nevronov (49). Poškodbe možganov privedejo do neuravnavanja ionov in celične presnove ter zmanjšane krvnega pretoka v možganih. Pri tem začne protein S-100B prehajati iz glialnih celic v možganski prostor in preko krvno-možganske pregrade v kri. Domneva se,

da se po poškodbi centralno-živčnega sistema S-100B sprošča pasivno iz astrocitov, po poškodbi nevronov pa naj bi se S-100B izločal aktivno iz aktiviranih astrocitov. V kri prehaja preko okvarjene krvno-možganske bariere ali pa se absorbira iz cerebrospinalne tekočine. Razpolovni čas proteina S-100 je do 2 uri. Ob primarni poškodbi njegova koncentracija v krvi hitro naraste in se normalizira v roku 24 do 48 ur po poškodbi. Zvišane koncentracije proteina S100, ki trajajo dlje časa, nakazujejo na sekundarno poškodbo možganov. Kot označevalec poškodbe nevronov je protein S100 nespecifičen (50). Najvišje vrednosti tega proteina v serumu so zasledili pri poškodovancih z zlomom kosti in/ali s poškodbo prsnega koša. Koncentracije S-100B so višje po opeklinah, poškodbi mehkih tkiv, nezgodni poškodbi možganov, možganski kapi, infekciji možganov, zunajmožganskih poškodbah, itd. Je pa tudi občutljiv označevalec možganske poškodbe, dobro kolereira s poškodbo in ima visoko negativno napovedno vrednost (51).

1.4.2.3. Metode določanja

Za določanje koncentracije proteina S-100 se najpogosteje uporabljajo imunološke metode, pri katerih je analizirani vzorec serum. Princip je pri vseh metodah podoben. Antigen iz vzorca inkubiramo z dvema vrstama specifičnih protiteles, ena izmed njih so posebno označena. Prvo protitelo in drugo protitelo se vežeta na isti antigen iz vzorca in skupaj tvorijo sendvič kompleks. Komplekse odkrivamo s pomočjo oznak na protitelesih:

- IEMA – imunoencimometrična metoda, pri kateri nastale imunske komplekse detektiramo kolorimetrično. Eno protitelo je označeno z β -galaktozidazo (40).
- IRMA - imunoradiometrična metoda, kjer komplekse antigen - protitelo detektiramo radioizotopsko. Eno protitelo je označeno z radioizotopskim jodom (^{125}I) (41).
- ECLIA – elektrokemiluminiscenčna imunska metoda je podrobneje opisana v poglavju 3.3.1.

2. NAMEN DELA

Najpogostejša bolezen karotidnih arterij je ateroskleroza. Ta je v skoraj polovici primerov vzrok možganskega infarkta. S pravočasnim operativnim posegom lahko rešimo bolnika, vendar lahko tudi med samim posegom pride do ishemije in možganskega infarkta. Z določanjem koncentracij serumskih bioznačevalcev možganskih okvar lahko pravočasno odkrijemo morebitne možganske poškodbe. Nevron specifična enolaza in protein S-100 sta dva izmed najbolj poznanih in razširjenih označevalcev poškodbe nevronov.

Namen naloge je spremljati koncentracije nevron specifične enolaze in proteina S-100 pri bolnikih po karotidni endarteriektomiji. Primerjali bomo povprečne koncentracije teh dveh označevalcev izmerjenih pred operacijo, po operaciji ter 12, 24 in 48 ur po operaciji. Ugotoviti želimo, ali obstajajo statistično pomembne razlike med skupinami meritev, glede na čas odvzema krvi.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Vzorci

V raziskavo smo vključili 62 preiskovancev, kateri so bili v Splošni bolnišnici Novo Mesto leta 2013 operirani na karotidni arteriji. Od tega je 43 oseb moškega spola in 19 oseb ženskega spola. Najstarejša oseba vključena v raziskavo je bila stara 87 let, najmlajša pa 50 let. Karotidna endarteriektomija je bila opravljena v skladu s smernicami za invazivno zdravljenje karotidne bolezni, ki ga je izdalo Evropsko združenje za žilno kirurgijo. V raziskavo smo vključili bolnike s hemodinamsko pomembno zožitvijo karotidne arterije, pri katerih je bil lumen žile zožen za najmanj 70 % in bolnike po možganski kapi ali drugem nevrološkem dogodku, ki so imeli karotidno arterijo zoženo za več kot 50 %. Večina operirancev (95 %) je bila operirana v lokalni anesteziji. Bolnikom je bila venozna kri odvzeta petkrat, in sicer pred operacijo, takoj po operaciji ter 12, 24, in 48 ur po operaciji. Kri smo odvzeli v epruveto brez antikoagulanta in jo centrifugirali 10 minut pri 1600 x g. Serume smo prelili v epruvete brez dodatkov, jih evidentirali z imenom in priimkom preiskovanca ter zaporedno številko odvzema krvi. Vzorce smo po zbiranju pripeljali v Laboratorij za analitiko hormonov in tumorskih markerjev, ki je del Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Do analize smo vzorce hranili v zamrzovalniku na temperaturi okrog -20 °C. Vzorce smo pred analizo odmrznili, jih prelili v manjše epruvete, ki ustrezajo stojalom za vzorce aparata Cobas e 411, ter jih ponovno evidentirali.

3.1.2. Aparatura

Koncentracije NSE in proteina S-100 v serumskih vzorcih smo izmerili na analizatorju Cobas e 411 proizvajalca Roche (Slika 9). Gre za elektrokemiluminiscenčno tehnologijo, ki zagotavlja visoko analitično občutljivost in široko merilno območje. S to metodo zaznamo izjemno nizke ravni antigena in najmanjše spremembe v koncentraciji merjenega analita. Široko merilno območje zmanjšuje potrebe po redčenju vzorcev in s tem časovne zamude in stroške. Sistem je popolnoma avtomatiziran, vzorce le postavimo v ustrezna stojala in preko zaslona na dotik upravljamo aparat. Zmogljivost aparata je 88 testov na

uro, analiza enega parametra traja 18 minut. Na analizatorju Cobas e 411 je možno meriti različne ščitnične parametre, hormone, srčne in tumorske označevalce, vitamine, različne povzročitelje virusnih okužb idr (52).



Slika 9: Analizator Cobas e 411 (53)

3.1.3. Reagenti, raztopine, tekočine in dodatni material

NSE reagenčni komplet Cobas e 411 (REF 12133113 122) vsebuje po 1 stekleničko, ki vsebuje konzervans in:

- s streptavidinom prevlečene mikrodrelce
- mišja biotinizirana monoklonska protitelesa proti NSE (18E5), fosfatni pufer (pH 7,2)
- mišja monoklonska protitelesa proti NSE (84B10) označena z rutenijevim (II) – tris (bipiridil) kompleksom, fosfatni pufer (pH 7,2) (54).

S100 reagenčni komplet Cobas e 411(REF 03175243 190) vsebuje po 1 stekleničko, ki vsebuje konzervans in:

- s streptavidinom prevlečene mikrodcelce
- mišja biotinizirana monoklonska protitelesa proti S-100, fosfatni pufer (pH 7,2)
- mišja monoklonska protitelesa proti S-100 označena z rutenijevim (II) – tris (bipiridil) kompleksom, fosfatni pufer (pH 7,2).

Stabilnost neodprtega reagenčnega kompleta na 2-8 °C je do datuma označenega na embalaži, po odprtju je na temperaturi od 2-8 °C stabilen 12 tednov, v samem analizatorju pa 8 tednov (55).

Dodatne raztopine/tekočine potrebne za določanje nevron specifične enolaze in proteina S-100 na analizatorju Cobas e 411 :

- Tekočina za spiranje (ProCell) je sistemska tekočina (pH 6,8). Vsebuje fosfatni pufer, tripropilamin (TPA), detergent in konzervans. Uporablja se za generiranje elektrokemijskega signala, za spiranje na streptavidin vezanih mikrodcelcev iz merilne celice in za prenašanje reakcijske zmesi.
- Tekočina za čiščenje merilne celice (CleanCell) je raztopina za čiščenje pretočnega sistema analizatorja in čiščenje merilne celice po vsaki meritvi (pH 13,2). Vsebuje kalijev hidroksid in detergent.
- Dodatek za spiralno tekočino (SysWash) se uporablja za spiranje sistema.
- Tekočina za sistemsko čiščenje analizatorja (SysClean) (56).

Drugi dodatni material potreben za določanje nevron specifične enolaze in proteina S-100 na analizatorju Cobas e 411 :

- Vzorčne posodice (Sample Cups)
- Reakcijske posodice (Assay Cup)
- Nastavki za pipetiranje (AssayTip)
- Odpadna posoda za uporabljene nastavke za pipetiranje in reakcijske posodice
- Adapter za tekočino namenjeno sistemskemu čiščenju
- Posodice za kontrolni material (ControlSet Vials)
- Posodice za kalibracijski material (CalSet Vials) (54, 55, 56)
- Stojala za epruvete (Sample racks)

3.1.4. Kontrolni material

Kontrolni material za NSE in protein S-100 je v dveh nivojih, prvi vsebuje nizko koncentracijo merjenega analita, drugi pa visoko. Kontrolni set za NSE in protein S-100 vsebuje liofilizirani humani serum, ki smo ga raztopili v 3 mL destilirane vode. Tako pripravljeno kontrolo smo pustili na sobni temperaturi 30 minut, da se je popolnoma raztopila in homogenizirala. Nato smo celotno vsebino razdelili v 4 alikvote, enega od njih smo uporabili, ostale 3 pa zamrznili na -20 °C. Oba nivoja kontrole smo izvajali vsak dan za vsak parameter posebej, pred samo meritvijo vzorcev in po kalibraciji. Stabilnost neodprtega (liofiliziranega) kontrolnega materiala je na 2-8 °C do datuma označenega na embalaži (57, 58).

Kontrolni material za nevron specifično enolazo

Za kontrolo NSE smo uporabljali kontrolni material Elecsys PreciControl Tumor Marker REF 11776452 122. Alikvote kontrolnih vzorcev hranimo v zamrzovalniku, na -20 °C, kjer so stabilni 1 mesec. Na temperaturi 2-8 °C so alikvoti stabilni 14 dni, v analizatorju do 5 ur, na temperaturi od 20-25 °C pa 24 ur (57). Razpon koncentracij NSE v kontrolnem materialu z nizko koncentracijo analita je od 9,58 – 15,6 µg/L (srednja vrednost 12,6 µg/L). Razpon koncentracij NSE v kontrolnem materialu z visoko koncentracijo analita je od 75,6 – 123,0 µg/L (srednja vrednost 99,5 µg/L) (59).

Kontrolni material za protein S-100

Za kontrolo proteina S-100 smo uporabljali kontrolni material Elecsys PreciControl Universal 1 and 2 REF 11731416 190. Alikvote kontrolnih vzorcev hranimo v zamrzovalniku, na -20 °C, kjer so stabilni 1 mesec. Na temperaturi 2-8 °C so alikvoti stabilni 3 dni, v analizatorju pa le do 5 ur (57). Razpon koncentracij S-100 v kontrolnem materialu z nizko koncentracijo analita je od 0,150 – 0,230 µg/L (srednja vrednost 0,190 µg/L). Razpon koncentracij proteina S-100 v kontrolnem materialu z visoko koncentracijo analita je od 1,90 – 2,92 µg/L (srednja vrednost 2,41 µg/L) (60).

3.1.5. Kalibracijski material

Kalibracija nevron specifične enolaze

Uporabljali smo set kalibratorjev NSE CalSet (REF 12133121 122). Kalibracijski komplet vsebuje dva kalibratorja Cal 1 in Cal 2. Kalibratorja vsebujeta liofiliziran goveji serumski albumin kot matriks, humani NSE in natrijev azid. Koncentracija NSE v prvem kalibratorju je približno 0,5 ng/mL, v drugem kalibratorju pa približno 50 ng/mL. Liofiliziran kalibrator smo raztopili v 1 mL destilirane vode, pustili 15 minut, da se je popolnoma raztopil in homogeniziral, potem pa previdno premešali.

Liofilizat hranimo na temperaturi od 2-8 °C in je uporaben do navedenega datuma uporabe. Raztopljen kalibrator je na temperaturi 2-8 °C uporaben 6 tednov, v samem analizatorju na 20-25 °C pa 3 ure (61).

Kalibracija proteina S-100

Uporabljali smo set kalibratorjev S100 CalSet (REF 03289834 190). Kalibracijski komplet vsebuje dva kalibratorja Cal 1 in Cal 2. Kalibratorja vsebujeta liofiliziran matriks humanega seruma z dodatkom S100B iz govejih možganov. Koncentracija S100B v prvem kalibratorju je približno 0,2 ng/mL, v drugem kalibratorju pa približno 2 ng/mL. Kalibratorja smo ratopili v 1 mL destilirane vode, pustili 15 minut, da se je popolnoma raztopil in homogeniziral, potem pa previdno premešali.

Liofiliziran kalibrator hranimo na temperaturi od 2-8 °C in je uporaben do navedenega datuma uporabe. Raztopljen kalibrator je na temperaturi 2-8 °C uporaben 4 tedne, na -20 °C 3 mesece, v samem analizatorju na 20-25 °C pa 5 ur (62).

3.2. DELOVNI POSTOPEK

Reagenčne komplete je pred uporabo potrebno segreti na sobno temperaturo, jim odpreti pokrove in jih vložiti v analizator. Preverimo, da reagenti niso spenjeni (zračni mehurčki). Reagente po odprtju puščamo v analizatorju. Preden pričnemo z meritvijo vzorcev, je potrebno izvesti kontrolo kakovosti z ustreznim kontrolnim materialom. Po potrebi pred meritvijo kontrolnih vzorcev naredimo še kalibracijo za posamezni analit (ob zamenjavi

serije reagentov, po preteku kalibracije, ob večjih servisnih posegih). Kontrolne vzorce in vzorce bolnikov postavimo v stojala in jih vložimo v aparat. Čitalec črtnih kod prebere kode vzorcev in naročene preiskave. Preiskave lahko za vsak vzorec naročimo tudi sami preko zaslona na dotik. Po končani analizi rezultate ročno vnesenih vzorcev spremljamo preko zaslona, rezultati vzorcev s črtno kodo pa se po analizi samodejno prenesejo v Laboratorijski informacijski sistem.

3.3. METODE

3.3.1. Elektrokemiluminiscenčna imunska metoda

NSE in protein S-100 smo določali z elektrokemiluminiscenčno imunsko metodo na analizatorju Cobas e 411. Metoda je namenjena *in vitro* kvantitativnemu določanju NSE in proteina S-100 v humanih serumskih vzorcih (54, 55). Metodo je validiral proizvajalec, ki je metodo razvil.

Sendvič postopek vezave dveh označenih protiteles in antigena

1. Najprej inkubiramo antigene iz serumskega vzorca s specifičnimi biotiniliranimi monoklonskimi protitelesi in s specifičnimi monoklonskimi protitelesi označenimi z rutenijevim kompleksom. Prvo in drugo protitelo se vežeta na isti antigen iz vzorca in skupaj tvorijo sendvič kompleks.
2. Sledi druga inkubacija, kjer dodamo sendvič kompleksu s streptavidinom prevlečene mikrodrelce (Slika 10). Kompleks se veže na trdno fazo preko interakcije biotina s streptavidinom.
3. Reakcijska zmes se aspirira v merilno celico, kjer so na površini elektrode magnetno ujeti mikrodrelci. Nevezane reagentne in matriksne komponente vzorca odstranimo s spiranjem. Nato z ustvarjanjem ustreznega potenciala na površini elektrode izzovemo kemiluminiscenčno reakcijo in emisijo svetlobe, ki se meri s fotopomnoževalko.
4. Rezultati se kvantificirajo s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo instrument generira preko dvotočkovne kalibracije in glavne krivulje reagenčne kode. Količina oddane svetlobe je sorazmerna količini antigena v vzorcu (54, 55).



Slika 10: Reakcija imunskega kompleksa z mikrodelcem, prirejeno po (63) iz vira (64)

3.3.1.1. Interference

Interference pri merjenju nevron specifične enolaze

Na koncentracijo NSE v vzorcu vpliva:

- ikteričnost vzorca v primeru, da je vrednost bilirubina $> 1231 \mu\text{mol/L}$
- lipemičnost vzorca v primeru, da je vrednost trigliceridov $> 22,8 \text{ mmol/L}$
- biotin, če je njegova vrednost $> 409 \text{ nmol/L}$
- hemoliziran vzorec, saj eritrociti vsebujejo NSE
- revmatoidni dejavnik, če je njegova vrednost $> 1500 \text{ IU/mL}$ (54)

Interference pri merjenju proteina S-100

Na koncentracijo proteina S-100 v vzorcu vpliva:

- ikteričnost vzorca v primeru, da je vrednost bilirubina $> 428 \mu\text{mol/L}$
- hemoliziran vzorec v primeru, da je vrednost hemoglobina $> 0,621 \text{ mmol/L}$
- lipemičnost vzorca v primeru, da je vrednost lipidov $> 1500 \text{ mg/dL}$
- biotin, če je njegova vrednost $> 205 \text{ nmol/L}$ (55)

3.3.1.2. Ponovljivost rezultatov

Proizvajalec je ponovljivost meritev koncentracij NSE in proteina S-100 določil s pomočjo Elecsys reagentov, humanih serumov in kontrolnega materiala. Ponovljivost meritev so testirali 6 krat dnevno 10 dni.

Ponovljivost v seriji meritev koncentracij nevron specifične enolaze (za tri vzorce in šest ponovitev enega vzorca): povprečni koeficient variacije je 2,5 %. Ponovljivost med serijami meritev koncentracij nevron specifične enolaze (za tri vzorce in šest ponovitev enega vzorca v desetih serijah analiz): povprečni koeficient variacije je 4,2 %.

Ponovljivost v seriji meritev koncentracij proteina S-100 (za tri vzorce in šest ponovitev enega vzorca): povprečni koeficient variacije je 1,8 %. Ponovljivost med serijami meritev koncentracij proteina S-100 (za tri vzorce in šest ponovitev enega vzorca v desetih serijah analiz): povprečni koeficient variacije je 2,4 % (54, 55).

3.3.1.3. Podajanje rezultatov in referenčne vrednosti

Rezultate za nevron specifično enolazo podajamo v $\mu\text{g/L}$. Linearnost metode je do 370 $\mu\text{g/L}$. Referenčna vrednost za NSE je do 25,7 $\mu\text{g/L}$.

Rezultate za protein S-100 podajamo v $\mu\text{g/L}$. Linearnost metode je do 39 $\mu\text{g/L}$. Referenčna vrednost za protein S-100 je do 0,10 $\mu\text{g/L}$.

3.3.2. Statistične metode

Zbrane podatke smo analizirali s pomočjo programa MedCalc verzija 16.4.3. Razdelili smo jih v 5 skupin, ki se razlikujejo glede na čas odvzema krvi, in sicer: pred kirurškim posegom (vzorec št. 1), takoj po posegu (vzorec št. 2), 12 ur po posegu (vzorec št. 3), 24 ur po posegu (vzorec št. 4) in 48 ur po operativnem posegu (vzorec št. 5). Normalnost porazdelitve podatkov smo preverjali s Kolmogorov – Smirnovim testom. Pri uporabi tega testa se v programu MedCalc avtomatsko izvede še Lilliefors korekcija statistične značilnosti. Gre za primerjavo kumulativne porazdelitve podatkov s pričakovano kumulativno normalno porazdelitvijo. Na podatkih, ki se niso normalno porazdeljevali,

smo izvedli logaritemsko transformacijo. Izstopajoče vrednosti oziroma osamelce smo izračunali po Tukey-jevi metodi. Preverjali smo, ali obstajajo statistično pomembne razlike med posameznimi skupinami meritev koncentracij nevron specifične enolaze in proteina S-100. Statistično značilnost smo testirali na nivoju 5% tveganja ($P = 0,05$).

Statistična analiza izmerjenih vrednosti nevron specifične enolaze

Friedmanov test je neparametrična alternativa analizi variance za ponavljajoče meritve. Uporablja se za ugotavljanje statistično pomembnih razlik med skupinami meritev, v katerih se podatki ne porazdeljujejo normalno. Iz testa so avtomatsko izločeni vsi preiskovanci, ki imajo eno ali več manjkajočih vrednosti. Skupine meritev, pri katerih je Friedmanov test pokazal statistično pomembne razlike, smo nadalje analizirali z Wilcoxonovim testom za parne vzorce. To je neparametričen test in je alternativa t-testu za odvisne spremenljivke. V vseh statističnih analizah smo vrednost $P \leq 0,05$ opredelili kot statistično značilno.

Statistična analiza izmerjenih vrednosti proteina S-100

Analiza variance za ponavljajoče meritve (Repeated measures ANOVA) je test za ugotavljanje statistično pomembnih razlik med skupinami meritev, v katerih se podatki porazdeljujejo normalno. Za uporabo tega testa je potrebno izpolniti nekaj predpostavk. Odvisna spremenljivka mora biti merjena kontinuirano (v našem primeru je to čas odvzema krvi). Isti parameter moramo meriti večkrat. Spremenljivke naj bi se normalno porazdeljevale. Ekstremno izstopajoče vrednosti lahko motijo analizo. Iz testa so avtomatsko izločeni vsi preiskovanci, ki imajo eno ali več manjkajočih vrednosti. Pri vsaki analizi se avtomatsko izvede še Bonferroni korekcija za zmanjšanje napake prve vrste (zavrnitev ničelne hipoteze, ko ta velja). Skupine meritev, pri katerih je analiza variance za ponavljajoče meritve pokazala statistično pomembne razlike, smo nadalje analizirali s parnim t-testom. Parni t test se uporablja za primerjavo povprečij dveh odvisnih vzorcev, ki se porazdelujeta normalno. V vseh statističnih analizah smo vrednost $P \leq 0,05$ opredelili kot statistično značilno.

4. REZULTATI

4.1. REZULTATI MERITEV NEVRON SPECIFIČNE ENOLAZE

V raziskavo smo vključili 62 preiskovancev, pri katerih je bila izvedena CEA. Od tega je 43 moških in 19 žensk. Najstarejša oseba vključena v raziskavo je bila stara 87 let, najmlajša pa 50 let. Povprečna starost je 71,5 let. Preiskovancem smo odvzeli kri pred operacijo, takoj po njej, ter 12, 24 in 48 ur po operaciji in v vzorcih izmerili koncentracije nevron specifične enolaze (Preglednica 3).

Preglednica 3: Spol, starost in koncentracije nevron specifične enolaze za posameznega preiskovanca

Zaporedna številka bolnika	Spol	Starost (leta)	NSE pred posegom	NSE takoj po posegu	NSE 12 ur po posegu	NSE 24 ur po posegu	NSE 48 ur po posegu
1	Ž	87	/	3,66	3,64	4,77	7,36
2	M	67	7,11	4,55	3,60	2,76	1,98
3	M	67	4,37	1,67	3,15	3,47	4,03
4	M	71	0,98	0,44	0,34	0,62	0,22
5	Ž	82	1,25	0,05	0,57	2,09	/
6	M	78	1,18	2,75	1,73	/	/
7	Ž	76	8,84	0,63	0,78	0,65	4,76
8	M	50	0,57	8,14	7,43	6,68	6,72
9	Ž	83	2,37	1,00	1,99	0,41	0,47
10	Ž	64	11,30	2,88	3,37	2,73	3,46
11	M	79	6,65	2,59	1,79	13,30	4,75
12	M	63	0,62	1,04	0,63	0,10	2,30
13	Ž	54	4,36	2,11	2,98	2,84	6,39
14	Ž	77	5,78	2,88	1,14	0,94	5,17
15	Ž	79	15,53	6,98	1,01	1,53	2,50
16	M	78	0,54	2,02	/	1,79	6,01
17	M	78	0,62	/	0,14	3,23	0,09
18	M	63	0,35	1,15	1,66	2,09	4,28
19	M	76	7,21	3,07	1,36	3,17	/
20	M	66	11,01	5,77	2,76	4,02	8,19
21	M	73	0,37	1,12	1,52	3,33	/
22	M	74	4,99	2,75	1,79	4,07	6,44
23	M	82	4,56	1,39	1,96	2,62	7,26
24	M	65	0,23	0,91	0,35	0,39	0,44

25	M	83	7,15	0,11	0,91	0,08	0,28
26	M	85	0,23	0,52	0,75	2,22	3,72
27	M	78	1,30	2,03	1,83	2,52	0,58
28	M	70	5,61	2,60	0,59	0,11	/
29	M	72	9,20	3,35	3,97	4,73	7,27
30	M	60	2,94	1,40	1,11	2,29	2,60
31	Ž	71	0,82	4,50	1,59	2,91	6,84
32	M	75	3,83	1,57	0,76	1,88	4,53
33	M	72	0,67	4,97	2,53	7,14	/
34	M	76	0,09	0,63	1,78	0,42	0,56
35	M	76	11,44	2,24	1,55	2,31	5,93
36	M	68	3,71	5,71	1,74	0,72	0,65
37	M	71	0,05	1,35	0,92	0,25	0,37
38	M	62	0,95	9,54	6,41	8,38	17,46
39	M	62	2,14	1,55	0,94	1,30	2,89
40	M	61	49,94	3,08	2,99	0,27	0,34
41	M	82	1,34	0,19	/	0,29	0,93
42	M	83	7,48	6,56	6,72	2,56	1,27
43	M	73	3,53	13,92	1,86	0,65	0,88
44	Ž	73	7,09	1,36	1,28	0,88	1,30
45	Ž	72	6,39	8,31	9,52	5,62	1,61
46	Ž	72	5,12	1,10	3,25	2,89	4,75
47	M	77	0,78	0,84	0,21	0,45	4,94
48	M	69	9,49	4,36	2,25	2,06	12,44
49	Ž	74	2,79	0,46	0,18	0,23	0,15
50	M	77	0,08	1,63	1,32	0,10	/
51	Ž	59	12,53	4,03	3,27	2,56	/
52	Ž	59	3,53	0,18	2,27	1,59	0,05
53	Ž	72	1,38	0,31	0,06	0,12	0,17
54	M	53	2,69	2,55	2,13	1,88	0,21
55	M	77	0,37	0,89	0,62	0,29	0,88
56	Ž	82	4,96	0,21	0,83	0,61	/
57	M	70	7,64	1,16	0,86	1,16	1,66
58	Ž	81	1,25	0,48	0,88	2,26	1,29
59	M	68	2,55	2,01	1,39	3,72	2,30
60	M	54	0,29	2,38	2,69	3,06	7,73
61	M	67	0,74	0,36	0,41	0,05	/
62	Ž	64	4,85	1,89	2,44	3,55	6,18

Koncentracije NSE v serumu so v $\mu\text{g/L}$. S sivo je označena vrednost, ki je bila izključena iz statistične analize.

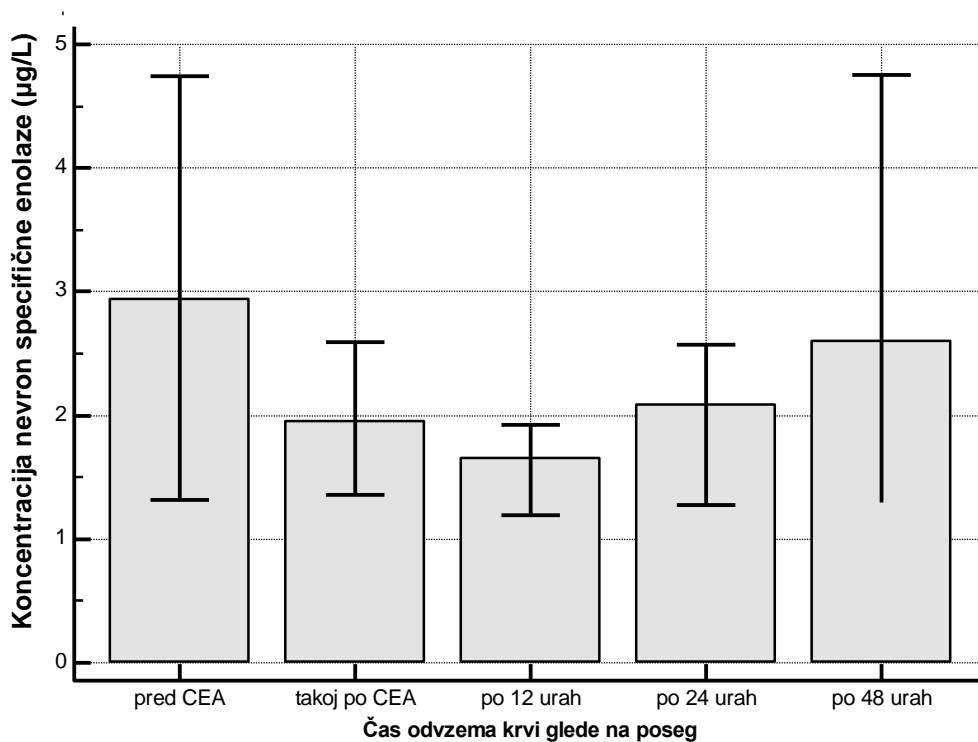
Preglednica 4: Skupno število meritev, število vseh osamelcev in ekstremno izstopajoče vrednosti za posamezno skupino meritev koncentracij nevron specifične enolaze

Nevron specifična enolaza [µg/L]	Število meritev	Število osamelcev	Ekstremno izstopajoče vrednosti [µg/L]
Pred posegom	61 - 1	1 (+0)	49,94 - izločena
Takoj po posegu	61	1 (+5)	13,92
12 ur po posegu	60	1 (+3)	9,52
24 ur po posegu	61	1 (+2)	13,3
48 ur po posegu	52	0 (+1)	/

Število osamelcev (Preglednica 4) je navedeno kot: število ekstremno izstopajočih vrednosti (+ število izstopajočih vrednosti, ki niso ekstremno izstopajoče). V skupini koncentracij NSE izmerjenih pred operacijo imamo eno ekstremno izstopajočo vrednost 49,94 µg/L, ki smo izločili iz analize. V skupini koncentracij NSE izmerjenih takoj po operaciji imamo 5 izstopajočih vrednosti: 6,56 µg/L; 6,98 µg/L; 8,14 µg/L; 8,31 µg/L in 9,54 µg/L. Imamo pa tudi eno ekstremno izstopajočo vrednost 13,92 µg/L. V skupini koncentracij NSE izmerjenih 12 ur po operaciji imamo 3 izstopajoče vrednosti: 6,41 µg/L; 6,72 µg/L in 7,43 µg/L ter eno ekstremno izstopajočo vrednost 9,52 µg/L. V skupini koncentracij NSE izmerjenih 24 ur po operaciji imamo 2 izstopajoči vrednosti: 7,14 µg/L in 8,38 µg/L ter eno ekstremno izstopajočo vrednost 13,30 µg/L. V skupini koncentracij NSE izmerjenih 48 ur po operaciji imamo eno izstopajočo vrednost 17,46 µg/L.

Preglednica 5: Mediana in 95 % interval zaupanja za mediano za posamezno skupino meritev koncentracij nevron specifične enolaze

NSE [µg/L]	Mediana	95 % interval zaupanja za mediano
Pred posegom	2,87	Od 1,30 do 4,58
Takoj po posegu	1,90	Od 1,35 do 2,58
12 ur po posegu	1,63	Od 1,14 do 1,87
24 ur po posegu	2,09	Od 1,21 do 2,56
48 ur po posegu	2,55	Od 1,29 do 4,65



Slika 11: Mediane in 95 % intervali zaupanja za mediane koncentracij nevtron specifične enolaze v µg/L, v odvisnosti od časa odvzema krvi

Višina stolpca (Slika 11) predstavlja mediano, na njem je ograja, ki predstavlja 95 % interval zaupanja za mediano (podatki iz Preglednice 5). Iz Slike 11 je razvidno, da so koncentracije nevtron specifične enolaze pred operativnim posegom (pred CEA) višje, kot takoj po operativnem posegu (takoj po CEA) in 12 ur po posegu. 24 ur po posegu koncentracija nevtron specifične enolaze poraste in narašča vsaj še do 48 ur po posegu, vendar ne doseže višjih koncentracij, kot so bile izmerjene pred operativnim posegom. Odstotek znižanja povprečnih koncentracij NSE po CEA je naveden v Preglednici 6.

Preglednica 6: Razlike med povprečnimi koncentracijami nevtron specifične enolaze izmerjenimi po operaciji, glede na koncentracije izmerjene pred operacijo

Primerjava povprečnih koncentracij NSE [µg/L]	% znižanja povprečne vrednosti
Pred posegom : takoj po posegu	33,8 %
Pred posegom : 12 ur po posegu	43,2 %
Pred posegom : 24 ur po posegu	27,2 %
Pred posegom : 48 ur po posegu	11,1 %

Za testiranje normalnosti porazdelitev (Preglednica 7) smo postavili ničelno in alternativno hipotezo:

- H_0 : vrednosti spremenljivke se porazdeljujejo normalno
- H_a : vrednosti spremenljivke se ne porazdeljujejo normalno

V primeru, da je P vrednost manjša od 0,05, H_0 zavržemo in sklepamo, da se podatki ne porazdeljujejo normalno. Ker se podatki ne porazdeljujejo normalno jih logaritemsko transformiramo in ponovno testiramo ničelno in alternativno hipotezo.

Preglednica 7: Testiranje normalnosti porazdelitve za posamezno skupino meritev koncentracij nevron specifične enolaze

Nevron specifična enolaza [$\mu\text{g/L}$]	P vrednost	P vrednost <u>po logaritemski transformaciji</u>
Pred posegom	$P < 0,01$	$P < 0,01$
Takoj po posegu	$P < 0,01$	$P > 0,10$
12 ur po posegu	$P < 0,01$	$P > 0,10$
24 ur po posegu	$P < 0,01$	$P < 0,01$
48 ur po posegu	$P < 0,01$	$P = 0,02$

Za računanje statistično pomembnih razlik (Preglednica 8) smo postavili ničelno in alternativno hipotezo:

- H_0 : med medianami skupin ni statistično pomembnih razlik v koncentraciji NSE
- H_a : med medianami skupin so statistično pomembne razlike v koncentracijah NSE

V primeru, da je P vrednost manjša od 0,05, H_0 zavržemo in sprejmemo H_a .

Preglednica 8: S Friedmanovim testom izračunane P vrednosti za skupine meritev koncentracij nevron specifične enolaze

<i>Spremenljivka</i>	<i>NSE 1VZ</i>	<i>NSE 2VZ</i>	<i>NSE 3VZ</i>	<i>NSE 4VZ</i>	<i>NSE 5VZ</i>
<i>NSE 1 VZ</i>	/	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P > 0,05$
<i>NSE 2 VZ</i>	$P < 0,05$	/	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
<i>NSE 3 VZ</i>	$P < 0,05$	$P > 0,05$	/	$P > 0,05$	$P < 0,05$
<i>NSE 4 VZ</i>	$P < 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	/	$P < 0,05$
<i>NSE 5 VZ</i>	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	/

Spremenljivke v Preglednici 8 so: koncentracija NSE pred kirurškim posegom (*NSE 1 VZ*), koncentracija NSE takoj po posegu (*NSE 2 VZ*), koncentracija NSE 12 ur po posegu (*NSE 3 VZ*), koncentracija NSE 24 ur po posegu (*NSE 4 VZ*) in koncentracija NSE 48 ur po operativnem posegu (*NSE 5 VZ*).

Rezultati Wilcoxonovih testov

Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo:

- H_0 : med skupinama ni statistično pomembnih razlik v koncentracijah NSE
- H_a : med skupinama so statistično pomembne razlike v koncentracijah NSE

V primeru, da je P vrednost manjša od 0,05, H_0 zavržemo in sprejmemo H_a .

Izračunane P vrednosti z Wilcoxonovim testom, pri katerih smo s Friedmanovim testom ugotovili statistično pomembno razliko v koncentracijah nevron specifične enolaze:

- NSE pred operacijo in NSE takoj po operaciji $\rightarrow P < 0,01$
- NSE pred operacijo in NSE 12 ur po operaciji $\rightarrow P < 0,01$
- NSE pred operacijo in NSE 24 ur po operaciji $\rightarrow P < 0,01$
- NSE 12 ur po operaciji in NSE 48 ur po operaciji $\rightarrow P < 0,01$
- NSE 24 ur po operaciji in NSE 48 ur po operaciji $\rightarrow P < 0,01$

Pri vseh statistično značilnih razlikah ugotovljenih s Friedmanovim testom smo statistično pomembno razliko v koncentracijah nevron specifične enolaze potrdili še z Wilcoxonovim testom.

4.2. REZULTATI MERITEV PROTEINA S-100

V raziskavo smo vključili 62 preiskovancev, pri katerih je bila izvedena CEA. Od tega je 43 moških in 19 žensk. Najstarejša oseba vključena v raziskavo je bila stara 87 let, najmlajša pa 50 let. Povprečna starost je 71,5 let. Preiskovancem smo odvzeli kri pred operacijo, takoj po operaciji, ter 12, 24 in 48 ur po operaciji in v vzorcih izmerili koncentracije proteina S-100 (Preglednica 9).

Preglednica 9: Spol, starost in koncentracije proteina S-100 za posameznega preiskovanca

Zaporedna številka bolnika	Spol	Starost (leta)	S-100 pred posegom	S-100 takoj po posegu	S-100 12 ur po posegu	S-100 24 ur po posegu	S-100 48 ur po posegu
1	Ž	87	/	0,069	0,057	0,057	0,052
2	M	67	0,035	0,042	0,028	0,027	0,016
3	M	67	0,024	0,073	0,035	0,037	0,038
4	M	71	0,062	0,062	0,051	0,059	0,070
5	Ž	82	0,107	0,030	0,023	0,021	/
6	M	78	0,046	0,033	0,027	/	/
7	Ž	76	0,091	0,038	0,042	0,037	0,023
8	M	50	0,073	0,078	0,054	0,054	0,037
9	Ž	83	0,035	0,020	0,019	0,019	0,018
10	Ž	64	0,024	0,019	0,019	0,023	0,061
11	M	79	0,041	0,028	0,022	0,048	0,044
12	M	63	0,044	0,043	0,034	0,046	0,036
13	Ž	54	0,039	0,095	0,042	0,052	0,085
14	Ž	77	0,020	0,038	0,037	0,063	0,046
15	Ž	79	0,038	0,035	0,020	0,022	0,019
16	M	78	0,029	0,015	/	0,018	0,084
17	M	78	0,017	/	0,020	0,038	0,023
18	M	63	0,052	0,039	0,034	0,034	0,047
19	M	76	0,069	0,059	0,043	0,053	/
20	M	66	0,017	0,020	0,018	0,018	0,025
21	M	73	0,024	0,015	0,012	0,012	/
22	M	74	0,010	0,025	0,019	0,021	0,022
23	M	82	0,028	0,035	0,031	0,029	0,031
24	M	65	0,030	0,044	0,023	0,025	0,028
25	M	83	0,126	0,085	0,085	0,070	0,089
26	M	85	0,030	0,019	0,016	0,022	0,094
27	M	78	0,027	0,027	0,020	0,026	0,030

28	M	70	0,025	0,037	0,018	0,034	/
29	M	72	0,044	0,047	0,038	0,036	0,046
30	M	60	0,044	0,032	0,027	0,027	0,027
31	Ž	71	0,029	0,023	0,020	0,020	0,024
32	M	75	0,018	0,032	0,028	0,028	0,032
33	M	72	0,038	0,057	0,020	0,035	/
34	M	76	0,029	0,029	0,020	0,019	0,031
35	M	76	0,037	0,018	0,018	0,014	0,021
36	M	68	0,009	0,020	0,015	0,010	0,021
37	M	71	0,079	0,094	0,087	0,091	0,104
38	M	62	0,024	0,041	0,016	0,025	0,040
39	M	62	0,070	0,049	0,040	0,030	0,045
40	M	61	0,040	0,008	0,006	0,017	0,017
41	M	82	0,079	0,048	/	0,026	0,062
42	M	83	0,019	0,034	0,030	0,024	0,025
43	M	73	0,029	0,017	0,012	0,028	0,021
44	Ž	73	0,343	0,051	0,044	0,030	0,040
45	Ž	72	0,051	0,085	0,033	0,032	0,028
46	Ž	72	0,062	0,091	0,051	0,053	0,056
47	M	77	0,046	0,045	0,022	0,028	0,029
48	M	69	0,049	0,046	0,040	0,035	0,070
49	Ž	74	0,029	0,043	0,041	0,041	0,051
50	M	77	0,017	0,013	0,010	0,017	/
51	Ž	59	0,030	0,022	0,030	0,016	/
52	Ž	59	0,011	0,034	0,012	0,015	0,031
53	Ž	72	0,061	0,052	0,050	0,044	0,032
54	M	53	0,013	0,013	0,015	0,010	0,029
55	M	77	0,022	0,016	0,013	0,031	0,025
56	Ž	82	0,024	0,020	0,014	0,034	/
57	M	70	0,032	0,037	0,023	0,029	0,085
58	Ž	81	0,055	0,072	0,057	0,107	0,053
59	M	68	0,120	0,012	0,005	0,022	0,006
60	M	54	0,021	0,022	0,017	0,019	0,024
61	M	67	0,017	0,020	0,010	0,022	/
62	Ž	64	0,010	0,011	0,011	0,008	0,011

Koncentracije proteina S-100 v serumu so v µg/L. S sivo je označena vrednost, ki je bila izključena iz statistične analize.

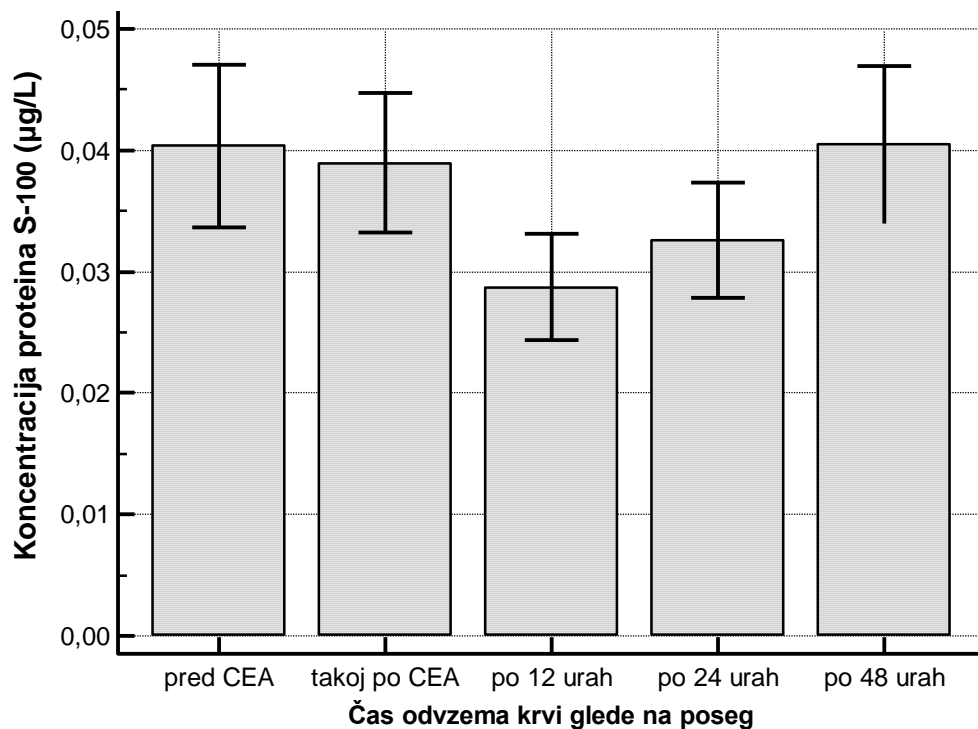
Preglednica 10: Skupno število meritev, število vseh osamelcev in ekstremno izstopajoče vrednosti za posamezno skupino meritev koncentracij proteina S-100

Protein S-100 [µg/L]	Število meritev	Število osamelcev	Ekstremno izstopajoče vrednosti [µg/L]
Pred posegom	61 - 1	1 (+3)	0,343 - izločena
Takoj po posegu	61	0 (+3)	/
12 ur po posegu	60	0 (+2)	/
24 ur po posegu	61	2 (+2)	0,091 in 0,107
48 ur po posegu	52	0 (+2)	/

Število osamelcev (Preglednica 10) je navedeno kot: število ekstremno izstopajočih vrednosti (+ število izstopajočih vrednosti, ki niso ekstremno izstopajoče). V skupini koncentracij proteina S-100 izmerjenih pred operacijo imamo eno ekstremno izstopajočo vrednost 0,343 µg/L, ki smo jo izločili iz analize. Prav tako imamo v skupini koncentracij proteina S-100 izmerjenih pred operacijo 3 izstopajoče vrednosti: 0,107 µg/L; 0,120 µg/L in 0,126 µg/L. V skupini meritev proteina S-100 takoj po operaciji imamo 3 izstopajoče vrednosti: 0,091 µg/L; 0,094 µg/L in 0,095 µg/L. V skupini koncentracij proteina S-100 izmerjenih 12 ur po operaciji imamo 2 izstopajoči vrednosti, in sicer 0,085 µg/L in 0,087 µg/L. V skupini koncentracij proteina S-100 izmerjenih 24 ur po operaciji imamo 2 izstopajoči vrednosti: 0,063 µg/L in 0,070 µg/L ter 2 ekstremno izstopajoči vrednosti: 0,091 µg/L in 0,107 µg/L. V skupini koncentracij proteina S-100 izmerjenih 48 ur po operaciji imamo 2 izstopajoči vrednosti, in sicer 0,094 µg/L in 0,104 µg/L.

Preglednica 11: aritmetična sredina in 95 % interval zaupanja za aritmetično sredino za posamezno skupino meritev koncentracij proteina S-100

Protein S-100 [µg/L]	Aritmetična sredina	95 % interval zaupanja za aritmetično sredino
Pred posegom	0,040	Od 0,034 do 0,047
Takoj po posegu	0,039	Od 0,033 do 0,045
12 ur po posegu	0,029	Od 0,024 do 0,033
24 ur po posegu	0,033	Od 0,028 do 0,037
48 ur po posegu	0,040	Od 0,034 do 0,047



Slika 12: Mediane in 95 % intervali zaupanja za mediane koncentracij proteina S-100 v µg/L, v odvisnosti od časa odvzema krvi

Višina stolpca (Slika 12) predstavlja aritmetično sredino, na njem je ograja, ki predstavlja 95 % interval zaupanja za aritmetično sredino (Preglednica 11). Iz Slike 12 je razvidno, da so koncentracije proteina S-100 pred operativnim posegom (pred CEA) višje, kot takoj po operativnem posegu (takoj po CEA) in 12 ur po posegu. 24 ur po posegu koncentracija proteina S-100 poraste in narašča vsaj še do 48 ur po posegu, vendar ne doseže višjih koncentracij, kot so bile izmerjene pred operativnim posegom. Odstotek znižanja povprečnih koncentracij proteina S-100 po CEA je naveden v Preglednici 12.

Preglednica 12: Razlike povprečnih koncentracij proteina S-100 v vzorcih odvzetih po operaciji glede na povprečno koncentracijo pred operacijo

Primerjava povprečnih koncentracij proteina S-100 [$\mu\text{g/L}$]	% znižanja povprečne vrednosti
Pred posegom : takoj po posegu	2,5 %
Pred posegom : 12 ur po posegu	27,5 %
Pred posegom : 24 ur po posegu	17,5 %
Pred posegom : 48 ur po posegu	0,0 %

Za testiranje normalnosti porazdelitev (Preglednica 13) smo postavili ničelno in alternativno hipotezo:

- H_0 : vrednosti spremenljivke se porazdeljujejo normalno
- H_a : vrednosti spremenljivke se ne porazdeljujejo normalno

V primeru, da je P vrednost manjša od 0,05, H_0 zavržemo in sklepamo, da se podatki ne porazdeljujejo normalno. V primeru, da se podatki ne porazdeljujejo normalno, jih logaritemsko transformiramo in ponovno testiramo ničelno in alternativno hipotezo.

Preglednica 13: Testiranje normalnosti porazdelitve za posamezno skupino meritev koncentracij proteina S-100

Protein S-100 [$\mu\text{g/L}$]	P vrednost	P vrednost po <u>logaritemski transformaciji</u>
Pred posegom	$P < 0,01$	$P > 0,10$
Takoj po posegu	$P > 0,08$	/
12 ur po posegu	$P < 0,01$	$P > 0,10$
24 ur po posegu	$P < 0,01$	$P > 0,10$
48 ur po posegu	$P < 0,01$	$P > 0,10$

Za ugotavljanje statistično pomembnih razlik (Preglednica 14) smo postavili ničelno in alternativno hipotezo:

- H_0 : med posameznimi skupinami odvzemov ni statistično pomembnih razlik v koncentracijah proteina S-100
- H_a : med posameznimi skupinami odvzemov so statistično pomembne razlike v koncentracijah proteina S-100

V primeru, da je P vrednost manjša od 0,05, H_0 zavržemo in sprejmemo H_a .

Preglednica 14: Z analizo variance za ponavljajoče meritve izračunane P vrednosti za skupine meritev koncentracij proteina S-100

<i>Statistično pomembne razlike (p)</i>	<i>S-100 1VZ</i>	<i>S-100 2VZ</i>	<i>S-100 3VZ</i>	<i>S-100 4VZ</i>	<i>S-100 5VZ</i>
<i>S-100 1 VZ</i>	/	$P = 1,00$	$P = 0,03$	$P = 0,42$	$P = 1,00$
<i>S-100 2 VZ</i>	$P = 1,00$	/	$P < 0,01$	$P = 0,08$	$P = 1,00$
<i>S-100 3 VZ</i>	$P = 0,03$	$P < 0,01$	/	$P = 0,15$	$P < 0,01$
<i>S-100 4 VZ</i>	$P = 0,42$	$P = 0,08$	$P = 0,15$	/	$P = 0,45$
<i>S-100 5 VZ</i>	$P = 1,00$	$P = 1,00$	$P < 0,01$	$P = 0,45$	/

Spremenljivke v Preglednici 14 so: koncentracija proteina S-100 pred kirurškim posegom (*S-100 1 VZ*), koncentracija proteina S-100 takoj po posegu (*S-100 2 VZ*), koncentracija proteina S-100 12 ur po posegu (*S-100 3 VZ*), koncentracija proteina S-100 24 ur po posegu (*S-100 4 VZ*) in koncentracija proteina S-100 48 ur po operativnem posegu (*S-100 5 VZ*).

Rezultati parnih t-testov

Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo:

- H_0 : med skupinama ni statistično pomembnih razlik v koncentracija proteina S-100
- H_a : med skupinama so statistično pomembne razlike v koncentracijah proteina S-100

V primeru, da je P vrednost manjša od 0,05, H_0 zavržemo in sprejmemo H_a .

S parnim t-testom izračunane P vrednosti za pare, pri katerih smo z analizo variance za ponavljajoče meritve ugotovili statistično pomembno razliko:

- Protein S-100 pred operacijo in protein S-100 12 ur po operaciji $\rightarrow P < 0,01$
- Protein S-100 takoj po operaciji in protein S-100 12 ur po operaciji $\rightarrow P < 0,01$
- Protein S-100 12 ur po operaciji in protein S-100 48 ur po operaciji $\rightarrow P = 0,01$

Pri vseh statistično značilnih razlikah ugotovljenih z analizo variance za ponavljajoče meritve, smo statistično pomembno razliko v koncentracijah proteina S-100 potrdili še s parnim t-testom.

5. RAZPRAVA

Med boleznimi srca in ožilja, ki sicer veljajo za najpogostejši vzrok obolevnosti in smrtnosti ljudi v razvitem svetu, spada tudi možganski infarkt. Ta je v skoraj polovici primerov posledica karotidne bolezni. Kirurško odstranitev ateromatozne spremembe v arteriji imenujemo endarteriektomija. Poseg je tvegan, saj lahko med samo operacijo in po njej pride do poškodbe možganskih celic (1, 2, 3). S pomočjo biooznačevalcev možganskih okvar poskušamo pravočasno odkriti morebitne možganske poškodbe po karotidni endarteriektomiji. Protein S-100 in nevron specifična enolaza sta dva izmed najbolj razširjenih in poznanih označevalcev poškodbe nevronov (3). Najpogosteje njuno koncentracijo merimo v serumskih vzorcih, saj je odvzem venske krvi manj invaziven od pridobivanja cerebrospinalne tekočine.

V naši raziskavi smo spremljali koncentracije nevron specifične enolaze in proteina S-100 pri 62 bolnikih, ki so prestali karotidno endarteriektomijo. Najstarejša oseba vključena v raziskavo je bila stara 87 let, najmlajša pa 50 let (povprečna starost je 71,5 let). Zanimalo nas je, ali se bodo vrednosti teh dveh označevalcev možganske okvare po operaciji statistično pomembno zvišale. Bolnikom smo kri odvzeli pred operacijo, takoj po operaciji ter 12, 24 in 48 ur po operaciji.

Razprava o rezultatih meritev nevron specifične enolaze

Vrednosti nevron specifične enolaze so pred operativnim posegom višje (mediana = 2,87 $\mu\text{g/L}$), kot takoj po operativnem posegu (mediana = 1,90 $\mu\text{g/L}$) in 12 ur po posegu (mediana = 1,63 $\mu\text{g/L}$). 24 ur po posegu vrednosti NSE porastejo (mediana = 2,09 $\mu\text{g/L}$) in naraščajo vsaj še do 48 ur po posegu (mediana = 2,55 $\mu\text{g/L}$), vendar ne dosežejo višjih vrednosti, kot so bile izmerjene pred operativnim posegom. Ker vrednosti počasi naraščajo, bi bilo zanimivo izmeriti koncentracije NSE tudi 3 in več dni po posegu. V primerjavi s povprečno koncentracijo NSE pred operacijo se torej povprečna koncentracija NSE takoj po operaciji zniža za 33,8 %. Največje znižanje koncentracij v primerjavi s povprečno koncentracijo NSE pred operacijo zasledimo 12 ur po operaciji, in sicer za 43,2 %. 24 ur po operaciji je povprečna koncentracija NSE za 27,2 % nižja v primerjavi s povprečno koncentracijo NSE pred operacijo, 48 ur po operaciji pa je nižja od slednje za 11,1 %.

Pričakovali smo, da se bodo koncentracije nevron specifične enolaze po operaciji zvišale in da bomo lahko na podlagi referenčne vrednosti sklepali, da gre pri kakšnem bolniku za poškodbo možganov po CEA. Ker do zvišanja koncentracij NSE nad referenčno vrednostjo ni prišlo pri nobenem bolniku po CEA sklepamo, da bolniki niso utrpeli poškodb možganov, ki bi bile posledica karotidne endarteriektomije. Sklep bi morali dokončno potrditi še z magnetno resonanco ali računalniško tomografijo možganov. Le tako bi lahko zagotovo vedeli, da po operaciji ni prišlo do poškodbe možganov.

Zvišano koncentracijo nevron specifične enolaze smo zaznali pri le eni osebi (vrednost 49,94 $\mu\text{g/L}$). Gre za ekstremno izstopajočo vrednost, izmerjeno v serumu bolnika pred karotidno endarteriektomijo. Vrednost smo izločili iz analize, saj je visoka koncentracija posledica predhodne poškodbe nevronov, ne pa njihove poškodbe po karotidni endarteriektomiji. Pri tem bolniku so se vrednosti nevron specifične enolaze po operaciji normalizirale, zato sklepamo, da po operaciji ni utrpel dodatnih možganskih poškodb. Ostalih izstopajočih in ekstremno izstopajočih vrednosti, ki so se pojavile v vzorcih odvzetih po operaciji, nismo izločili iz statistične obdelave. Nobena oseba ni imela po operaciji zvišane koncentracije nevron specifične enolaze, zato sklepamo, da niso utrpeli možganske okvare, ki bi bila posledica karotidne endarteriektomije.

Pri testiranju normalnosti porazdelitev smo ugotovili, da se v nobeni skupini meritev koncentracij nevron specifične enolaze podatki ne porazdeljujejo normalno (vsi $P < 0,01$). Podatke smo logaritemsko transformirali in ponovno testirali normalnost porazdelitve. Ugotovili smo, da se po logaritemski transformaciji vrednosti NSE izmerjene takoj po CEA in tiste izmerjene 12 ur po CEA porazdeljujejo normalno ($p > 0,10$). Ostali podatki se ne porazdeljujejo normalno ($p \leq 0,02$).

Zaključimo lahko, da obstajajo statistično pomembne razlike med skupino meritev koncentracij NSE pred CEA v primerjavi s skupinami meritev koncentracij takoj po operaciji ter 12 in 24 ur po operaciji (pri vseh je $P < 0,01$). Obstajajo tudi statistično pomembne razlike med skupino meritev koncentracij NSE 12 ur po operaciji in 48 ur po operaciji ($p < 0,01$). Prav tako smo ugotovili statistično pomembne razlike med skupino meritev koncentracij proteina NSE 24 ur po operaciji in skupino meritev koncentracij 48 ur po operaciji ($p < 0,01$). Ugotovili smo torej, da se koncentracije NSE izmerjene pred CEA statistično razlikujejo od koncentracij NSE izmerjenih skoraj v vseh meritvah po CEA

(razen 48 ur po CEA). Vrednosti nevron specifične enolaze so v roku 24 ur po CEA statistično pomembno nižje od koncentracij izmerjenih pred CEA. Koncentracije NSE izmerjene 48 ur po CEA pa so statistično pomembno višje od koncentracij NSE izmerjenih 12 ur in 24 ur po CEA. Dobro bi bilo, če bi lahko koncentracije NSE pri bolnikih spremljali še dlje časa, da bi videli, ali bi te še naprej naraščale.

Podobne rezultate kot mi so dobili tudi Dragas M. in sodelavci leta 2015. Objavili so namreč študijo, v kateri so primerjali skupino bolnikov, pri katerih so med CEA uporabili obvod in skupino bolnikov, pri katerih so opravili CEA brez obvoda. Bolniki po CEA z obvodom so imeli takoj po operaciji in 24 ur po operaciji statistično pomembno nižje koncentracije NSE v serumu, v primerjavi s koncentracijami NSE pred posegom. Pri bolnikih po CEA brez obvoda so NSE koncentracije porastle, vendar ne statistično pomembno. Bolnike so razdelili še v dve podskupini, glede na prisotnost simptomov karotidne bolezni. Pri asimptomatskih bolnikih po CEA z obvodom pride do statistično pomembnega znižanja koncentracij NSE takoj po operaciji in 24 ur po operaciji. Ni pa statistično pomembnih sprememb koncentracij NSE pri asimptomatskih bolnikih po CEA brez uporabe obvoda. Do statistično pomembnega znižanja NSE koncentracij pride tudi prvi dan po CEA z obvodom pri simptomatskih bolnikih. Pomembno zvišanje koncentracij NSE beležijo 24 ur po operaciji pri simptomatskih bolnikih po CEA brez obvoda (65).

V Združenih državah Amerike so E. Sander in sodelavci leta 2001 ugotovili, da subtilne možganske poškodbe po CEA niso povezane s statistično pomembnim povečanjem nevron specifične enolaze v serumu operirancev. Bolnike z velikimi spremembami v nevropsihometričnem testiranju po operaciji so primerjali z bolniki brez sprememb v nevropsihometričnem testiranju po operaciji. V roku 72 ur po operaciji med skupinama ni bilo pomembnih razlik v meritvah koncentracij NSE (66).

Razprava o rezultatih meritev proteina S-100

Koncentracije proteina S-100 pred operativnim posegom so malenkost višje (povprečna vrednost = 0,040 $\mu\text{g/L}$), kot takoj po operativnem posegu (povprečna vrednost = 0,039 $\mu\text{g/L}$). Najnižje koncentracije proteina S-100 zaznamo 12 ur po posegu (povprečna vrednost = 0,023 $\mu\text{g/L}$). Po enem dnevu po posegu koncentracije proteina spet narastejo

(povprečna vrednost = 0,33 µg/L) in dva dni po posegu dosežejo isto raven kot pred posegom (povprečna vrednost = 0,040 µg/L). Ker vrednosti počasi naraščajo, bi bilo zanimivo izmeriti koncentracije proteina S-100 tudi 3 in več dni po posegu. V primerjavi s povprečno koncentracijo proteina S-100 pred operacijo se povprečna koncentracija proteina S-100 takoj po operaciji zniža za 2,5 %. Največje znižanje koncentracij v primerjavi s povprečno koncentracijo proteina S-100 pred operacijo zasledimo 12 ur po operaciji, in sicer za 27,5 %. 24 ur po operaciji je povprečna koncentracija proteina S-100 za 17,5 % nižja v primerjavi s povprečno koncentracijo proteina S-100 pred operacijo. 48 ur po operaciji se povprečna koncentracija proteina S-100 ne razlikuje od povprečne koncentracija proteina S-100 pred operacijo. Pričakovali smo, da se bodo koncentracije proteina S-100 po operaciji zvišale in da bomo lahko na podlagi referenčne vrednosti sklepali, da gre za poškodbo možganov po CEA.

V skupini koncentracij proteina S-100 izmerjenih pred operacijo imamo štiri zvišane koncentracije proteina S-100. Ena izmed njih je ekstremno izstopajoča vrednost 0,343 µg/L, ki smo jo izločili iz analize. Ena oseba je imela pred operacijo mejno zvišano vrednost proteina S-100 (0,107 µg/L), vendar je bila izločena iz analize variance za ponavljajoče meritve, saj nismo imeli podatka o vseh petih koncentracijah proteina S-100. Je pa bila ta vrednost vključena v nadaljnjem testiranju s parnim t-testom. Pri dveh osebah smo izmerili pred operacijo rahlo zvišane koncentracije proteina S-100 (0,120 µg/L in 0,126 µg/L), ki bi lahko kazale na predhodno poškodbo možganskih celic. Pri teh dveh bolnikih so se po operaciji vrednosti proteina S-100 normalizirale. Bolnik (zaporedna številka 25), ki je imel pred operacijo vrednost proteina S-100 0,126 µg/L ima vseskozi višje koncentracije kot ostali bolniki. Pri tej osebi bi bilo priporočljivo opraviti še kakšno potrditveno slikovno preiskavo, s čimer bi izključili poškodbo možganov.

Ostalih izstopajočih in ekstremno izstopajočih vrednosti, ki so se pojavile v vzorcih odvzetih po operaciji, nismo izločili iz statistične obdelave. Te vrednosti bi lahko bile posledica poškodbe možganskih celic po CEA. Ena oseba je imela 24 ur po operaciji mejno zvišano koncentracijo proteina S-100 (0,107 µg/L). Temu bolniku so se kasneje vrednosti spet normalizirale in je imel vrednost proteina S-100 48 ur po operaciji nižjo kot pred operacijo. Ker ta oseba takoj po operaciji ni imela zvišane koncentracije proteina S-100 sklepamo, da v tem primeru ni prišlo do poškodbe možganskih celic, ki bi bila posledica CEA. Pri osebi (zaporedna številka 37), ki je imela vrednost proteina S-100 48 ur

po CEA mejno zvišano (0,104 µg/L) smo opazili, da ima skozi celoten čas spremljanja koncentracij višje vrednosti kot ostale osebe. Sumimo, da bi lahko šlo za poškodbo možganskih celic po CEA. Sum bi morali potrditi z magnetno resonanco ali računalniško tomografijo možganov. Pri tej osebi smo napram drugim osebam izmerili precej nižje vrednosti NSE skozi celoten čas spremljanja koncentracij.

Pri testiranju normalnosti porazdelitev smo ugotovili, da se samo podatki, izmerjeni takoj po operaciji, porazdeljujejo normalno ($p > 0,08$). Ostali podatki se niso porazdeljevali normalno ($p < 0,01$), zato smo jih logaritemsko transformirali in ponovno testirali normalnost porazdelitve. Ugotovili smo, da se po logaritemski transformaciji izmerjene vrednosti proteina S-100 tudi v vseh drugih skupinah porazdeljujejo normalno ($p > 0,10$).

Zaključimo lahko, da obstajajo statistično pomembne razlike med skupino meritev koncentracij proteina S-100 pred CEA in skupino meritev koncentracij 12 ur po CEA ($p < 0,01$). Obstajajo tudi statistično pomembne razlike med skupino meritev koncentracij proteina S-100 takoj po CEA in skupino meritev koncentracij 12 ur po CEA ($p < 0,01$). Prav tako smo ugotovili statistično pomembne razlike med skupino meritev koncentracij proteina S-100 12 ur po CEA in skupino meritev koncentracij 48 ur po CEA ($p = 0,01$). Ugotovili smo torej, da se koncentracije proteina S-100 izmerjene 12 ur po CEA statistično pomembno razlikujejo od večine koncentracij proteina S-100 izmerjenih pred in po CEA (razen 24 ur po CEA). Vrednosti proteina S-100 so 12 ur po CEA statistično pomembno nižje od koncentracij izmerjenih pred CEA, takoj po CEA in 48 ur po CEA. Vrednosti proteina S-100 začnejo v roku 24 ur po CEA ponovno naraščati, zato bi bilo dobro, če bi lahko koncentracije spremljali še dlje časa, da bi videli, ali bi te naprej naraščale.

Za razliko od naših rezultatov so Dragas M. in sodelavci leta 2015 ugotovili, da koncentracije proteina S-100 statistično narastejo po CEA. Primerjali so skupino bolnikov, pri katerih so med CEA uporabili obvod in skupino bolnikov, pri katerih so opravili CEA brez obvoda. Koncentracije proteina S-100 so bile pri obeh skupinah po CEA statistično višje kot pred CEA. 24 ur po operaciji so bile koncentracije primerljive s tistimi pred CEA. Bolnike so razdelili še v dve podskupini, glede na prisotnost simptomov karotidne bolezni. Asimptomatski in simptomatski bolniki so imeli po CEA statistično pomembne višje koncentracije proteina S-100 v primerjavi s koncentracijami pred CEA (65). Uporabnost proteina S-100 kot označevalca možganskih poškodb so leta 2001 potrdili tudi E. Sander in

sodelavci. Ugotovili so, da imajo bolniki z velikimi spremembami v nevropsihometričnem testiranju po CEA statistično pomembno višje vrednosti proteina S-100, kot bolniki brez sprememb v nevropsihometričnem testiranju po CEA. Subtilne možganske poškodbe po CEA so torej povezane s statistično pomembnim zvišanjem serumskih koncentracij proteina S-100 (66).

Podobne rezultate kot mi pa so leta 2000 dobili Lars S. Rasmussen in sodelavci. V raziskavo so vključili 22 bolnikov po CEA in 16 bolnikov po operaciji anevrizme abdominalne aorte. Koncentracije nevron specifične enolaze in protein S-100 so bile enako kot v naši raziskavi, bistveno nižje po operaciji, kot pred njo. Nevropsihološki testi po CEA so kazali na kognitivno disfunkcijo pri 19 % bolnikov 3 mesece po CEA. V študiji niso zaznali korelacije med spremembo kognitivne funkcije in spremembo serumskih koncentracij NSE in proteina S-100. Zaključili so, da subtilne poškodbe možganov ne moremo zaznati z merjenjem nevron specifične enolaze in proteina S-100 β po karotidni endarteriektomiji (67). Podobno so istega leta ugotovili tudi F. Gao in sodelavci. Izvedli so raziskavo na desetih bolnikih po CEA. Pri šestih bolnikih so poleg seruma odvzeli še cerebrospinalno tekočino. Koncentracije proteina S-100 so bile med operacijo normalne pri devetih bolnikih, pri enem bolniku s hudo hipertenzijo pa je koncentracija narastla že prvo uro po operaciji. Pri dveh bolnikih so med posegom izmerili zvišane koncentracije proteina S-100 v cerebrospinalni tekočini. Ta dva bolnika sta imela 6 mesecev po CEA nevrološke izpade. Serumske koncentracije NSE so se med posegom zvišale, koncentracije v cerebrospinalni tekočini pa se niso spremenile. Zaključili so, da poseg CEA brez zapletov ne povzroči možganskih poškodb, ugotovljenih z merjenjem koncentracij proteina S-100 v serumu. Meritev koncentracij S-100 v cerebrospinalni tekočini je bolj občutljiva tehnika za ugotavljanje lažjih možganskih poškodb. Nevron specifično enolazo so označili kot nespecifično (68).

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo prišli do naslednjih sklepov:

- Povprečne koncentracije nevron specifične enolaze in proteina S-100 so po karotidni endarteriektomiji nižje kot pred posegom.
- Koncentracije nevron specifične enolaze in proteina S-100 do 12 ur po operaciji padajo, nato pa začnejo 24 ur po CEA naraščati. 48 ur po posegu so koncentracije označevalcev podobne kot pred posegom.

Sklepamo lahko, da pri večini preiskovancev ni prišlo do možganskih poškodb, ki bi bile posledica karotidne endarteriektomije. Ne moremo pa tega zagotovo trditi, saj bi potrebovali potrditveno metodo (slikanje možganov) oz. druge nadaljnje preiskave.

7. LITERATURA

1. Košnik M.: Interna medicina, Littera Picta, Ljubljana, 2011.
2. Šinkovec A: Operativno zdravljenje zožitve (endarterektomija) notranje karotide v lokalni anesteziji, Zdravniški vestnik, 2004, letnik 73, številka 12.
3. Gradišek P, Osredkar J, Kremžar B, Koršič M: Biokemijski označevalci nezgodne možganske okvare, Zdravniški vestnik 2011;80: 293-301.
4. Tetičkovič E: Nevrosonologija, Založba Pivec, 2011.
5. Kobe V, Dekleva A, Lenart I F, Širca A, Velepich M: Anatomija; Skripta za študente medicine, 3. del, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2010.
6. Circulation Foundation: Carotid, dostopano 10.6.2016 <http://www.deepameditours.com/treatments/carotid-artery-disease/>.
7. Rakuša M, Menih M, Magdič J: Sodobni pogledi na možgansko kap, Univerzitetni klinični center Maribor, Oddelek za nevrološke bolezni in Združenje nevrologov Slovenije, Maribor 2016.
8. Vincek K, Flis V: Odkrivanje in zdravljenje karotidne bolezni, Med Mes 2007; 3:241-9.
9. World Health Organization Tehnical Reports Series No. 143: Classification of Atherosclerotic Lesions, Ženeva 1958.
10. Ganong WE: Cardiovascular disorders: Vascular disease. In McPhee SJ and Ganong WF (Eds). Pathophysiology of disease. An introduction to clinical medicine, 5 izdaja, The McGraw-Hill Companies, 2006: 300-326.
11. Pihler Veselič B: Vpliv atorvastatina in valsartana na funkcionalne in morfološke spremembe arterij buder, povzročene z aterogeno dieto; diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012.
12. Packard R R, Libby P: Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. Clin Chem 2008; 54 (1): 24-38.
13. Hansson G K: Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. New England Journal of Medicine 2005, 353: 1685-1695.
14. Shishehbor M H, Bhatt D L: Inflammation and atherosclerosis. Current atherosclerosis Reports 2004; 6: 131-9.
15. Blinc A: Ocena prizadetosti žilja, Zbornik, XIII. strokovni sestanek Sekcije za arterijsko hipertenzijo, Slovensko zdravniško društvo, Portorož 2004, stran 20-21.

16. Tetičkovič E, Menih M, Magdič J: Tridimenzionalna ultrasonografija v obravnavi možganskožilnih boleznih, Medicinski mesečnik, april 2005.
17. Singh A S, Atam V, Yathish B E, Dals L, Koonwar S: Role of erythrocyte sedimentation rate in ischemic stroke as an inflammatory marker of carotid atherosclerosis, J. Neurosci Rural Pract. 2014; 5(1): 40-5.
18. Kushner I: The phenomenon of the acute phase response. Ann N Y Acad Sci 1982; 389:39.
19. Pearson T A, Mensah G A, Alexander R W, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation 2003; 107:499.
20. Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, et al. Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease. N Engl J Med 2008; 359:1897.
21. Roh E J, Lim J W, Ko K O, Cheon E J: A useful predictor of early atherosclerosis in obese children: serum high-sensitivity C-reactive protein, J Korean Med Sci 2007; 22 (2): 192-7.
22. Portal Splošne bolnišnice Novo mesto, dostopano 10.6.2016 <http://www.sb-nm.si/Portals/0/Content/dokumenti/Predstavitve%20oddelkov/zilni/Opracije%20na%20arterijah%2004.pdf>.
23. Ferguson G G: Carotid endarterectomy. To shunt or not to shunt? Arch Neuronal 1986; 43: 615-617.
24. Browse N L, Ross-Russell R: Carotid endarterectomy and the Javid shunt: The early results of 215 consecutive operations of transient ischaemic attacks, Br J Surg 1984; 71: 53-57.
25. Haqqani O, Iafrati MD, Estes JM, Talavera F, Lopez Rowe V: Carotid Endarterectomy, Medscape, 2014.
26. Yanying M, James K L: Potential serum biomarkers in the pathophysiological processes of stroke, Expert Rev Neurother, 2014, 14 (2): 173-185.
27. Yiwang Guo in sodelavci: Pathophysiology and Biomarkers in Acute Ischemic Stroke – A Review, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013, 12 (6): 1097-1105.
28. Korfiatis S in sodelavci: Serum biochemical markers of brain injury: Mini Rev Med Chem, 2009; 9 (2):227-34.

29. Vizin T, Kos J: Gamma-enolase: a well-known tumour marker, with a less-known role in cancer; *Radiol Oncol.* 2015 Sep; 49(3): 217-226.
30. Díaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, García-Melero A, López-Aleman R: α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations: *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:156795.
31. Marangos PJ, Schmechel DE: Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci.* 1987; 10: 269-95.
32. Vižin T: Vloga gama-enolaze pri raku in njeno uravnavanje s proteolitičnimi encimi,; Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2015.
33. Wikipedia: Enolase, dostopano 10.6.2016 https://en.wikipedia.org/wiki/Enolase_2.
34. Huang EJ, Reichardt LF: Trk receptors: roles in neuronal signal transduction, *Annu Rev Biochem.* 2003; 72:609-42.
35. Reichardt LF: Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361 (1473): 1545-64.
36. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Pečar U: Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells, *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(8-9):1685-96, 2009.
37. Johnsson P. Markers of cerebral ischemia after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1996; 10: 120–6.
38. Ilkka Hemmila: Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays, *Clin. Chem.* 31/3, 359-370 (1985).
39. Stuart Woodhead J, Weeks I: Chemiluminiscence immunoassay, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 57, No. 3, pp. 523-529, 1985.
40. Zafar S, Ghafoor F, Naz S, Haq I: Stabilization studies of working strength preparation of human albumin-HRP conjugate, *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.* 2012; 45 (1): 1-5.
41. Chapman RS: Immunoassays in clinical chemistry (Principles of immunoradiometric assays), Chapter 6, Division of Biochemical Endocrinology, Hammersmith Hospital, United Kingdom.

42. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:637–668.
43. Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 2002;7:d1356–1368.
44. Haimoto H, Hosoda S, Kato K: Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues, *Lab Invest*, 1987; 57 (5): 489-98.
45. Krnjak L, Trunk P, Geršak B, Osredkar J: Biokemični in klinični pomen koncentracije proteina S100B pri bolnikih, operiranih na srcu. *Farmaceutski vestnik*, 2002; 53:383-378.
46. Wikipedia: S100 protein, dostopano 10.6.2016: https://en.wikipedia.org/wiki/S100_protein.
47. Hongyan C, Chengshan X, Qing'e J, Zihua L: S100 protein familiy in human cancer, *Am J Cancer Res.* 2014; 4(2): 89-115.
48. Donato R in sodelavci: Functions of S100 proteins, *Curr Mol Med.* 2013, 13(1): 24-57.
49. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions of the brain. *Resor Neuronal Neurosci* 2003; 21:97-108.
50. Kövesdi E, Lückl J, Bukovics P, Farkas O, Pál J, Czeiter E, et al. Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. *Acta Neurochir* 2010; 152: 1–17.
51. Krnjak L: Prognostični pomen proteina S100B in njegove podenote S100BB kot kazalca za oceno okvare možganov pri poškodbah glave, doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011.
52. Cobas e 411 analyzer, dostopano 12.6.2016 https://www.aub.edu.lb/fm/cmop/downloads/cobas_e_411_EN.pdf.
53. Katalog Roche, dostopano 10.6.2016: <http://www.elk-spb.ru/catalogue/?id=27&lev=25&view=44>.
54. Navodila proizvajalca Cobas e 411 za reagent KIT NSE, Roche Diagnostics.
55. Navodila proizvajalca Cobas e 411 za reagent KIT S100, Roche Diagnostics.
56. Roche Diagnostics: Cobas e 411, Navodila za uporabo aparata.
57. Navodila proizvajalca Cobas: PreciControl Tumor Marker REF 11776452.

58. Navodila proizvajalca Cobas, Roche Diagnostics: 510 (k) Summary- PreciControl Universal, 2009.
59. Navodila proizvajalca Cobas e 411 za Control KIT NSE, Roche Diagnostics.
60. Navodila proizvajalca Cobas e 411 za Control KIT S100, Roche Diagnostics.
61. Navodila proizvajalca Cobas za NSE CalSet, REF 12133121.
62. Navodila proizvajalca Cobas za S100 CalSet, REF 03289834.
63. <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/gaertner-markus-2004-09-24/HTML/chapter2.html#N10614>.
64. Malnar M: Vrednotenje ujemanja rezultatov elektrokemiluminiscenčne metode in encimske imunske metode z mikrodenci pri določanju gonadotropnih hormonov in prolaktina, magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2015.
65. Dragas M in sodelavci: Fluctuations of serum neuron specific enolase and protein S-100 β concentrations in relation to the use of shunt during carotid endarterectomy, april, 2015.
66. Sander E in sodelavci: Serum S100B protein levels are correlated with subclinical neurocognitive declines after carotid endarterectomy, Department of neurological surgery, Columbia University, New York 2001.
67. Rasmussen L S in sodelavci: Subtle brain damage cannot be detected by measuring neuron – specific enolase and S-100 β protein after carotid endarterectomy, Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia, Vol 14, No 2, 2000: pp 166-170.
68. Gao F, Harris D N F, Sapsed- Byrne S, Standfield N J: Nerve tissue protein S-100 and neurone – specific enolase concentrations in cerebrospinal fluid and blood during carotid endarterectomy, Department of anasthesia, London, 2000, 55, 764-769.