

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA ZORKO

**PRIMERJAVA DVEH IMUNOKEMIJSKIH METOD ZA
DOLOČANJE PROTEINA S-100B PRI POŠKODBAH
GLAVE**

**COMPARISON OF TWO IMMUNOCHEMICAL METHODS
FOR DETERMINATION OF PROTEIN S-100B AT HEAD
INJURIES**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala v laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika.

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., višjemu svetniku, za strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji družini, prijateljem in vsem ostalim, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku predloženega diplomskega dela in mi bili v oporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarju, mag. farm., višjega svetnika.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
KAZALO SLIK	VI
KAZALO TABEL	VII
SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC	VIII
1 UVOD	1
1.1 PROTEIN S-100B	1
1.1.1 Struktura	1
1.1.2 Nahajanje in funkcija.....	2
1.1.3 Uporaba proteina S-100B v diagnostiki	2
1.1.3.1 Tumorski označevalec.....	3
1.1.3.2 Pokazatelj poškodbe glave.....	3
1.2 TUMORSKI OZNAČEVALCI.....	3
1.2.1 Lastnosti idealnih tumorskih označevalcev	4
1.2.2 Delitev tumorskih označevalcev.....	4
1.2.3 Določanje tumorskih označevalcev	5
1.3 POŠKODBE GLAVE IN MOŽGANOV	5
1.3.1 Delitev glede na način nastanka poškodbe	5
1.3.1.1 Odprte poškodbe glave.....	5
1.3.1.2 Zaprte poškodbe glave.....	5
1.3.2 Klinična delitev poškodb glave	6
1.3.2.1 Blaga poškodba glave.....	6
1.3.2.2 Zmerna poškodba glave.....	6
1.3.2.3 Huda poškodba glave.....	6
1.3.3 Delitev poškodb glave glede na patofiziološka dogajanja v možganih.....	7
1.3.3.1 Primarna poškodba.....	7
1.3.3.2 Sekundarna poškodba.....	7
1.4 EPIDEMIOLOGIJA POŠKODB GLAVE	8
1.5 LESTVICE ZA OCENO FUNKCIONALNE OKVARE MOŽGANOV	8
1.5.1 GCS lestvica	8
1.5.2 Glasgowska ocenjevalna lestvica izida (GOS).....	9
1.5.3 Innsbruška lestvica kome (ICS).....	10

1.6	DIAGNOSTIČNE METODE PRI POŠKODBI GLAVE.....	10
1.6.1	Računalniška tomografija (CT)	10
1.6.2	Magnetna resonanca (MRI)	10
1.6.3	Cerebralna angiografija	10
1.7	LABORATORIJSKI PARAMETRI	11
1.7.1	Protein S-100B	11
1.7.2	Nevron-specifična enolaza (NSE)	11
1.7.3	Kisli glijalni fibrilarni protein (GFAP).....	12
1.8	METODE DOLOČANJA PROTEINA S-100B	13
1.8.1	ELISA.....	13
1.8.2	LIA.....	14
2	NAMEN DELA	15
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	METODA ELISA	16
3.1.1	Analizni komplet reagentov CanAg S100 EIA:	16
3.1.2	Oprema (Personal Lab).....	18
3.1.4	Priprava reagentov	18
3.1.5	Analizni postopek.....	19
3.1.6	Izračun rezultatov	21
3.1.7	Značilnosti metode	21
3.1.8	Omejitve pri metodi.....	22
3.2	METODA LIA	23
3.2.1	Analizni komplet reagentov LIAISON® S100	23
3.2.3	Priprava reagentov	23
3.2.4	Analizni postopek.....	24
3.2.5	Izračun rezultatov	24
3.2.6	Referenčno območje.....	24
3.2.7	Značilnosti metode	25
3.2.8	Omejitve pri metodi.....	26
3.3	ZBIRANJE IN PRIPRAVA VZORCEV.....	26
4	REZULTATI.....	27
4.1	LASTNOSTI METODE LIA.....	27
4.1.1	Linearnost	27
4.1.2	Natančnost	28
4.2	ZNAČILNOSTI REZULTATOV VZORCEV	29

5	RAZPRAVA.....	36
6	SKLEP	40
7	LITERATURA.....	41
	PRILOGA	

POVZETEK

Protein S-100B je kisel citoplazemski protein, značilen za centralni in periferni živčni sistem. Nahaja se v glialnih celicah centralnega in perifernega živčevja, predvsem v astrocitih in Schwannovih celicah. Uporabljamo ga na različnih področjih, in sicer kot tumorski označevalec in kot pokazatelj možganskih poškodb. Zaradi strukturnih poškodb celic glije se protein S-100B izloča v zunajcelično matrico in cerebrospinalno tekočino ter nato v krvno obtok. Najprej je veljal za specifični možganski označevalec, vendar so kasneje ugotovili, da se nahaja tudi v drugih tkivih. Protein določamo z imunokemijskimi metodami. V diplomski nalogi smo primerjali metodi ELISA in LIA, da bi ugotovili, katera je primernejša za določanje proteina S-100B v serumu. Analizirali smo 129 vzorcev seruma bolnikov, od katerih smo jih 50 vključili v študijo primerljivosti metod. Kri smo odvzeli 33 bolnikom, ki so imeli srednje hude in hude poškodbe glave. Rezultate smo statistično obdelali in ugotovili, da je srednja vrednost rezultatov, ki smo jih določili z metodo LIA $1,69 \mu\text{g/L}$, standardna deviacija $2,91$ in KV $173,37 \%$. Z metodo ELISA smo določili srednjo vrednost $0,33 \mu\text{g/L}$, standardno deviacijo $0,60$ in KV $181,82 \%$. Korelacijski koeficient je $0,543$, kar pomeni, da metodi dajeta slabo primerljive rezultate. Z metodo LIA smo določili $88,0 \%$ vzorcev, ki so vsebovali vrednost proteina S-100B nad referenčno vrednostjo ($0,15 \mu\text{g/L}$), z metodo ELISA pa smo določili $38,0 \%$ vzorcev, ki so vsebovali vrednost proteina S-100B nad referenčno vrednostjo ($0,124 \mu\text{g/L}$). S testom linearnosti smo zagotovili, da je metoda LIA v redčitvenem območju linearna. S testom ponovljivosti pa smo dokazali, da je metoda natančna, ker koeficient variacije ne presega $6,4 \%$. Razmejitvene vrednosti za posamezno metodo nismo mogli določiti, ker nismo imeli podatkov o CT izvidih bolnikov. Ugotovili smo, da je metoda LIA diagnostično občutljivejša kot metoda ELISA, saj v večji meri detektira povišane vrednosti proteina S-100B. Ugotovili smo tudi, da je metoda ELISA zamudna, ker ni avtomatizirana, za njeno izvedbo pa potrebujemo posebno opremo. Zaradi ročnega dela je večja možnost napak in nezanesljivih rezultatov. Metoda LIA je avtomatizirana, zato je manjša možnost napak in hitra, saj je celoten postopek traja 30 minut. Z diplomsko nalogo smo ugotovili, da je metoda LIA primernejša kot metoda ELISA za določanje proteina S-100B v serumu pri poškodbah glave.

ABSTRACT

S-100B protein is an acidic cytoplasmic protein specific for central and peripheral nervous system. It is localized primarily in glial cells of central and peripheral nervous system, particularly in astrocytes and Schwann cells. It is used in various fields as a tumor marker and as an indicator of brain damage. Due to structural damage of glial cells, the protein S-100B secrete into extracellular matrix and the cerebrospinal fluid and blood circulation then. At the beginning it was considered to be a specific brain marker, but later it was found out to be located in other healthy tissues too. Protein S-100B is determined by immunochemical methods. In this thesis, we compared ELISA and LIA method to determine which is more suitable for the determination of S-100B protein in serum. We analyzed 130 serum samples of patients, who had medium-severe and severe head injuries. The results were statistically analyzed and we found out, that the mean of results determined with method LIA is 1,69 mg/L, standard deviation 2,91 and CV 173,37 %. With method ELISA we determined mean of results 0,33 mg/L, standard deviation 0,60 and CV 181,82 %. With the method LIA was determined 88,0 % of the samples, which included the value of protein S-100B above the reference value. With method ELISA was determined 38,0 % of the samples, which included the value of protein S-100B above the reference value. The correlation coefficient is 0.543, which means that the methods LIA and ELISA do not give comparable results. We demonstrated that method LIA is linear and precise. We could not determined cut-off value for a particular method, because we did not have data of patients CT outcomes. The method LIA gave higher value of protein S-100B and largely determined the increased value. We also found out, that method ELISA needs more time for implementation than method LIA, because it is not automated. To implement the method ELISA, we needed a lot of material and special equipment and because of manual labor is a greater chance of errors and unreliable results. With the thesis, we found out that the method LIA is more appropriate than the method ELISA for determination of protein S-100B protein in serum at brain injuries.

KAZALO SLIK

Slika 1: Dimerna struktura proteina S-100	2
Slika 2: Grafični prikaz linearnosti metode LIA.....	27
Slika 3: Grafični prikaz razmerja med vrednostmi meritev, izmerjenih z metodama LIA in ELISA.....	32
Slika 4: Število vzorcev, odvzetih ob sprejemu, glede na referenčno vrednost (LIA).....	33
Slika 5: Število vzorcev, odvzetih ob sprejemu, glede na referenčno vrednost (ELISA).....	33
Slika 6: Število vzorcev, odvzetih po 12 urah, glede na referenčno vrednost (LIA).....	34
Slika 7: Število vzorcev, odvzetih po 12 urah, glede na referenčno vrednost (ELISA).....	34
Slika 8: Delež bolnikov, glede na to, ali se jim koncentracija proteina S-100B v serumu po 12 urah povešala, znižala ali ostala enaka.....	35

KAZALO TABEL

Tabela 1: GCS lestvica.....	9
Tabela 2: Shema pipetiranja kalibratorjev in vzorcev pri izvedbi metode ELISA.....	19
Tabela 3: Koncentracije snovi, ki še ne povzročajo interferenc pri metodi ELISA	22
Tabela 4: Reagenti v kompletu LIAISON® 100.....	23
Tabela 5: Prikaz operacij analizatorja LIAISON®.....	24
Tabela 6: Koncentracije snovi, ki ne povzročajo interferenc pri metodi LIA	25
Tabela 7: Rezultati testa linearnosti za metodo LIA.....	27
Tabela 8: Rezultati testa natančnosti za metodo LIA.....	28
Tabela 9: Rezultati analize vzorcev, ki smo jih odvzeli ob sprejemu	29
Tabela 10: Rezultati analize vzorcev, ki smo jih odvzeli 12 ur po sprejemu.....	30
Tabela 11: Ujemanje rezultatov obeh metod.....	35

SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC

GCS - Glasgowska lestvica kome

GOS - Glasgowska lestvica izida

ICS - Innsbruška lestvica kome

CT - računalniška tomografija

MRI - magnetna resonanca

NSE - nevron-specifična enolaza

GFAP - kisli gliani fibrilarni protein

HAMA - humana protitelesa proti mišjim protitelesom

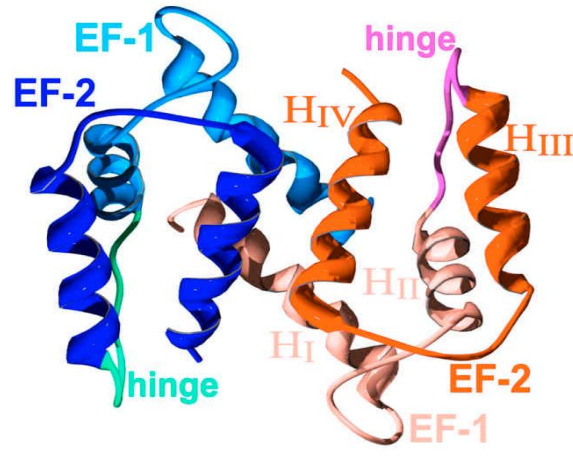
1 UVOD

1.1 PROTEIN S-100B

S-100 protein je dimerni protein z molekularno maso okoli 21kDa. Je kisel citoplazemski protein, katerega ime izhaja iz dejstva, da je popolnoma topen v amonijevem sulfatu pri nevtralnem pH. Najdemo ga pri vretenčarjih, prvič pa so ga izolirali iz govejih možganov. Proteini S-100 sestavljajo multigensko družino proteinov, ki vežejo Ca^{+2} . V njej se nahaja vsaj 21 različnih tipov S-100 proteinov, najznačilnejši pa je protein S-100B, ki je sestavljen iz 92 aminokislin in je tkivno specifičen za nevronske celice. 16 S-100 genov se nahaja na 1q21 človeškem kromosomu, ostali pa na 4. in 9. kromosomu. Gen za podtip S-100B se nahaja na 21q22.3 in obsega 17,3 Kb DNA (1, 2, 3).

1.1.1 Struktura

Protein se nahaja v homodimerni in heterodimerni obliki. Monomera sta med sabo povezana z nekovalentno vezjo. Vsak monomer vsebuje dva dela molekule v obliki EF-roke, ki predstavljata vezavni mesti za dva kalcijeva iona. Vsak S-100 protein je sestavljen iz dveh imunoloških podenot. β podenota je prisotna v vseh S-100 pozitivnih celicah in tumorskih celicah, medtem ko je α podenota prisotna le v srcu, skeletnih mišicah in možganih. Po zgradbi je S-100 protein podoben ostalim beljakovinom, ki vežejo kalcij. Razlikuje se v tem, da je specifičen predvsem za celice glje, medtem ko so ostale beljakovine, ki vežejo kalcij, izražene v številnih celicah. Poleg tega, da S-100 protein veže kalcij, ima tudi visoko afiniteto za vezavo cinka in sodeluje pri uravnavanju beljakovinske fosforilacije v možganih (4, 5, 6).



Slika 1: Dimerna struktura proteina S-100

1.1.2 Nahajanje in funkcija

S-100 protein je značilen za centralni in periferni živčni sistem. Nahaja se v glijalnih celicah centralnega in perifernega živčevja, predvsem v astrocitih in Schwannovih celicah, in je močno povezan s spodbujanjem rasti in preživetjem nevronov. Čeprav porazdelitev tega proteina ni omejena samo na živčni sistem, ima vlogo pri razvoju, funkciji in boleznih živčnega sistema, kar je spodbudilo zanimanje za ta protein. Prve predpostavke, da gre za specifičen možganski označevalec, pa so se pokazale za netočne, saj je protein S-100 prisoten tudi v različnih zdravih tkivih. Tako ga najdemo tudi v hondrocitih, adipocitih, mioepitelijskih celicah, maščobnih celicah, makrofagih, melanocitih, Langerhansovih celicah, dendritičnih celicah in keratinocitih. S-100 protein ima številne znotrajcelične in zunajcelične funkcije. Tako sodeluje pri medcelični komunikaciji, celični rasti in diferenciaciji, strukturi citoskeleta, celičnem metabolizmu, celični gibljivosti, veže in uravnava kalcij, uravnava aktivnost encimov in vnetni odziv (7).

1.1.3 Uporaba proteina S-100B v diagnostiki

Protein S-100B uporabljamo na različnih področjih, in sicer kot tumorski označevalec in kot pokazatelj poškodb glave.

1.1.3.1 Tumorski označevalec

S-100B protein je uporaben kot tumorski označevalec pri bolnikih z nevrinomom, glioblastomom, astroцитomom in meningeomom. Posebno vlogo naj bi imel kot napovedni dejavnik in pri spremljanju zdravljenja bolnikov z rakavim melanomom. Melanom je vrsta kožnega raka, ki se pojavlja v celicah, ki dajejo koži porjavlost (melanociti), in je najnevarnejša oblika kožnega raka. Normalne koncentracije tega označevalca v serumu so manj kot 0,3 µg/L (8, 9).

1.1.3.2 Pokazatelj poškodbe glave

Ker se S-100B protein nahaja predvsem v glialnih celicah in astroцитih, se lahko uporablja kot občutljiv in zanesljiv kazalec možganskih poškodb. Zaradi strukturnih poškodb celic glije S-100B protein uhaja v zunajcelično matrico in cerebrospinalno tekočino ter nato v krvno obtok. Meritve S-100B proteina v vzorcih seruma bolnikov so uporabne pri spremljanju travmatičnih poškodb možganov, ishemičnih možganskih poškodbah ter za diagnostiko in prognozo kliničnega izida po akutni možganski kapi. Normalne vrednosti proteina v serumu so pod 0,2 µg/L (7, 10).

1.2 TUMORSKI OZNAČEVALCI

Tumorski označevalec je snov v krvi, seču ali telesnem tkivu. Prisotnost tumorskega označevalca oziroma prisotnost le-tega v zmanjšanih ali zvečanih koncentracijah lahko kaže na patološki proces v organizmu, ki je posledica raka ali pa katerega drugega obolenja, npr. vnetja. Določanje tumorskih označevalcev nam lahko pokaže prisotnost ali lastnost raka. Rak je poimenovanje za veliko različnih bolezni, katerih glavna značilnost je nenadzorovana razrast spremenjenih, rakastih celic. Tumorski označevalci so torej snovi, ki so produkt malignih celic ali snovi, nastalih v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic. Določamo jih v telesnih tekočinah, najpogosteje v serumu ali plazmi. Tumorski označevalci so lahko nosintetizirane snovi, kakršnih v zdravem organizmu ne najdemo, ali snovi, ki so običajno prisotne v veliko manjših koncentracijah. Določanje tumorskih označevalcev nam lahko pomaga pri diagnozi bolezni,

napovedovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni, izbiri načina zdravljenja ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni. Doslej znani označevalci so zaradi nizke specifičnosti za tkivo, organ in vrsto rakove bolezni ter slabih napovednih lastnosti manj primerni za odkrivanje primarnih rakovih bolezni (9).

1.2.1 Lastnosti idealnih tumorskih označevalcev

Idealen tumorski označevalec naj bi bil prisoten le v tumorskih celicah, značilen naj bi bil za organ in vrsto tumorja, določljiv v serumu vseh bolnikov z istim tipom tumorja. Tvoril naj bi se v zadostnih količinah in bil dokazljiv v serumu že na začetku razvoja tumorja, njegove serumske koncentracije pa naj bi obdržale dinamiko rasti tumorske mase oziroma velikost tumorske mase. Poleg tega naj bi bile serumske koncentracije uporabne kot napovedni dejavnik poteka bolezni pri bolniku z neko vrsto tumorja. Idealnega tumorskega označevalca še ni, saj snovi, ki jih uporabljamo za tumorske označevalce, ne nastajajo samo in izključno kot spremljevalci rakavega procesa (9).

1.2.2 Delitev tumorskih označevalcev

Najpogosteje uporabljena razdelitev, deli tumorske označevalce glede na njihove biokemične lastnosti, mesto nastanka in funkcionalnost. Po tej delitvi ločimo:

- onkofetalne proteine,
- hormone,
- encime,
- tumor spremljajoče antigene,
- posebne serumske proteine,
- mešane označevalce (9).

1.2.3 Določanje tumorskih označevalcev

Ker se tumorski označevalci v telesnih tekočinah nahajajo v zelo majhnih koncentracijah, potrebujemo za njihovo dokazovanje zelo občutljive metode. Najbolj uporabljene metode so encimimunokemijske, luminometrična in radioimunske. Vse te metode so prilagojene za določanje izredno majhnih koncentracij antigena. Specifičnost metod pa je odvisna predvsem od kakovosti protiteles (9).

1.3 POŠKODBE GLAVE IN MOŽGANOV

Poškodbe glave in možganov so lahko po zunanji obliki zaprte, odprte, penetrantne (zastrel) in perforantne (prestrel). Poškodovana so lahko mehka tkiva, kosti svoda in/ali baze lobanje, žile in možganovina. V praksi so poškodbe kombinacija navedenega (11).

1.3.1 Delitev glede na način nastanka poškodbe

1.3.1.1 Odprte poškodbe glave

Odprte poškodbe nastanejo pri zlomu lobanje ali pri predirni rani. Odprta poškodba je posledica večje ali manjše hitrosti. Velika hitrost (prometna nesreča, strelna poškodba) povzroči večje sproščanje sil znotraj lobanje in s tem tudi težje sekundarne poškodbe. Manjša hitrost (padec, udarec s predmetom) povzroči okvaro na mestu udarca (12).

1.3.1.2 Zaprte poškodbe glave

Zaprte poškodbe glave povzročijo pretres možganov, obtolčenino možganov ali raztrganino možganov. Pretres možganov je kratka izguba zavesti zaradi nepenetrantne travmatske poškodbe možganov brez večje ali mikroskopske nenormalnosti parenhima. Ko se poškodovanec prebudi, se ne spominja dogodkov pred poškodbo in-/ali po njej. Simptomi so glavobol, vrtoglavica, zvonjenje v ušesih, navzea in zamegljen vid. Obtolčenine možganov pomenijo površinske obtolčenine in krvavitve iz manjših žil na možganski skorji in pod njo. Raztrganina pomeni trganje možganovine (12).

1.3.2 Klinična delitev poškodb glave

Klinično delimo poškodbe glave glede na stopnjo prizadetosti na blage, zmerne in hude. Glavni parameter pri ocenjevanju stopnje prizadetosti je nivo zavesti, ki lahko niha od kome do popolne budnosti. Nepretrgano spremljanje odzivnosti in nihanja zavesti je uporabno za opazovanje okrevanja, dolgoročno pa za napovedovanje končnega izida ali razvoja intrakranialnih komplikacij (13).

1.3.2.1 Blaga poškodba glave

Okoli 85 % vseh poškodb glave sodi med blage. Največkrat so posledice padcev ali blažjih udarcev. V to skupino sodijo bolniki, ki so za kratek čas izgubili zavest (manj ko 15 minut) ali sploh niso izgubili zavesti, potravmatska amnezija pa je trajala manj kot eno uro. Sprva se pojavi slabost, glavoboli, negotovo ravnotežje, slabša zbranost, spominske težave, težave pri predelovanju novih informacij, skrajna utrudljivost, razdražljivost, neprenašanje hrupa in svetlobe. Vsemu temu se pogosto pridružita še tesnoba in depresija. Smrtnost pri lahkih poškodbah glave je nizka (med 0.04 in 0.29 %), in to skoraj izključno zaradi znotraj možganske krvavitve (14).

1.3.2.2 Zmerna poškodba glave

O zmerni poškodbi glave govorimo takrat, kadar traja izguba zavesti med 15 minut in 6 ur, potravmatska amnezija pa do 24 ur. Pri takih bolnikih se pojavi cela vrsta simptomov, ki so posledica poškodbe. Med njimi so utrujenost, glavobol, vrtoglavica, negotovo ravnotežje, slaba koncentracija, motnje spomina, razdražljivost (14).

1.3.2.3 Huda poškodba glave

O hudi poškodbi glave govorimo takrat, kadar ji sledi koma v trajanju več kot 6 ur ali potravmatska amnezija, ki traja več kot 24 ur. Potekajo številni dinamični in prepletajoči se procesi, ki gredo skozi akutno, subakutno in kronično fazo s številnimi nepredvidljivimi nihanjem.

Še težja kategorija je zelo huda poškodba glave, o kateri govorimo, če nezavest traja 48 ur ali več ali pa je bila potravmatska amnezija dolga 7 dni ali več. Čim dlje trajata koma in potravmatska amnezija, tem slabši bo končni izvid (13, 14).

1.3.3 Delitev poškodb glave glede na patofiziološka dogajanja v možganih

1.3.3.1. Primarna poškodba

Primarna poškodba je okvara možganov, ki nastane pri poškodbi glave. Neposredno po hudi poškodbi glave so mnoge možganske celice funkcionalno prizadete, ne pa uničene. V ugodnih pogojih si lahko opomorejo v nekaj minutah. Primarna okvara prizadene tkivo zaradi neposrednega udarca. Poznamo dve vrsti neposrednih, po udarcu izzvanih poškodb, glede na to, ali sežejo v notranjost lobanje ali ne. Penetrantna poškodba je sorazmerno redka. O njej govorimo takrat, ko predmet, na primer strelni naboj prebije lobanjo, vstopi v možgane in na svoji poti trga možgansko tkivo. Take poškodbe običajno okvarijo sorazmerno omejena področja možganov, temu pa sledijo razmeroma specifični izpadi funkcij. Zaprte možganske poškodbe (nepenetrantne) so dosti pogostejše. Dogajajo se, ko se gibanje možganov nenadoma pospeši ali upočasni, ali če se možgani zelo hitro zavrtijo, običajno po udarcu glave ob drugi predmet. Poškodujejo se zaradi silovitega gibanja, ne pa zaradi tujka v možganih kot pri penetrantni poškodbi. Ko se možgani silovito stresejo, se zaradi takšnega gibanja okvarijo nežne povezave med izrastki živčnih celic (aksoni in dendriti), prekinejo se živčne poti, ki povezujejo celice in področja možganov med seboj. Govorimo o difuzni okvari aksonov (14).

1.3.3.2 Sekundarna poškodba

Sekundarna okvara je posledica prekinjene preskrbe s kisikom, ki ga v možgane prinaša kri. Do prekinitve pride v prvih minutah po poškodbi. Čeprav možgani po teži predstavljajo le dva odstotka celotne telesne teže, porabijo 20 % kisika, ki se prenaša po krvi. Če je ta preskrba prekinjena celo za dve ali tri minute, možganskim celicam zmanjka hrane za energijo in bodo propadle. Sekundarne možganske okvare vključujejo

vrsto patofizioloških dogajanj, kot so oteklina možganovine, ishemija, vnetje možganovine, degeneracija aksonov, ekscitotoksična okvara in apoptotična celična smrt (14, 15).

1.4 EPIDEMIOLOGIJA POŠKODB GLAVE

Poškodba glave je eden izmed vodilnih vzrokov umrljivosti in invalidnosti v razvitih državah. Prizadene predvsem aktivno populacijo pod 45 leti starosti. Slovenski statistični letopis iz leta 2005 navaja, da je v Sloveniji na leto bolnišnično obravnavanih okoli 7000 oseb zaradi nezgodne poškodbe glave. Od tega je po sprejemu v bolnišnico 10 % poškodb opredeljenih kot huda nezgodna poškodba glave, naslednjih 10 % kot srednje huda poškodba glave in ostalo kot blaga poškodba glave. Mortaliteta in invalidnost po hudi nezgodni poškodbi glave je ocenjena na od 25 % do 50 %. Moški utrpijo poškodbe več kot dvakrat pogosteje kot ženske. Najpogostejši vzroki za hudo poškodbo glave so prometne nesreče, poškodbe doma in pri delu, športu in rekreaciji ter medčloveško nasilje. Pri otrocih so pogostejši vzroki padci in povzročijo običajno lažjo poškodbo glave (6, 15).

1.5 LESTVICE ZA OCENO FUNKCIONALNE OKVARE MOŽGANOV

1.5.1 GCS lestvica

Glasgowska lestvica kome (Glasgow coma scale – GCS), ki sta jo sestavila Teasdale in Jennet leta 1974, je preprosta in lahko uporabna tehnika, ki jo uporabljajo po vsem svetu za ocenjevanje stopnje kome po bolnikovi sposobnosti, da se odziva z odpiranjem oči, gibanjem in govorjenjem. S številčno oceno opredelijo bolnikovo odzivnost z vsako od teh kategorij: odpiranje oči, gibalni odziv, besedni odziv. Najnižji skupni seštevek je tri točke, najvišji možni pa 15 točk. Uveljavilo se je, da ocenjujemo poškodbe, ki imajo med 13 in 15 točk kot lahke, med 8 in 12 kot srednje težke in težke, če je ocena nižja od 8 (16, 17).

Tabela 1: GCS lestvica

Odpiranje oči	
Odpre oči spontano	4 točke
Odpre oči na besedni ukaz	3 točke
Odpre oči na bolečinski dražljaj	2 točki
Ne odpre oči na bolečinski dražljaj	1 točka
Govor	
Orientiran govor	5 točk
Zmeden govor	4 točke
Neustrezen govor (posamezne besede)	3 točke
Nerazumljivi glasovi	2 točki
Ni odgovora	1 točka
Motorični odziv	
Premika na ukaz	6 točk
Lokalizira bolečino	5 točk
Umika ud s fleksijo	4 točke
Fleksijski sinergizmi	3 točke
Ekstenzijski odziv	2 točki
Brez odziva	1 točka

1.5.2 Glasgowska ocenjevalna lestvica izida (GOS)

Glasgowska lestvica izida, ki sta jo leta 1975 objavila Jennett in Bond, se največ uporablja za ocenjevanje izida po hudi poškodbi glave. Njeno uporabo priporočajo 6

mesecev po hudi poškodbi glave. GOS pozna 5 kategorij, in sicer smrt, persistentno vegetativno stanje, hudo in zmerno prizadetost ter dober izid (18).

1.5.3 Innsbruška lestvica kome (ICS)

Innsbruška ocenjevalna lestvica kome je kompleksnejša in obsežnejša od GCS in ocenjuje poleg funkcije možganske skorje tudi spremembe v funkciji možganskega debla kot odziv na zvočne in bolečinske dražljaje, spontano držo telesa in gibe, položaj vek ter položaj in gibe zrkel (13).

1.6 DIAGNOSTIČNE METODE PRI POŠKODBI GLAVE

1.6.1 Računalniška tomografija (CT)

Računalniška tomografija je poleg nuklearne magnetne resonance najpomembnejša metoda za direktno ugotavljanje lokaliziranih ali difuznih procesov v možganih in hrbtenjači (tumor, krvavitve, infarkt, absces, atrofija, edem). CT je preiskava, ki pokaže že zelo majhne količine krvi, ki jih je mogoče jasno ločiti od možganskega tkiva. Odlično prikaže tudi kostne zlome, zlasti utorne (19).

1.6.2 Magnetna resonanca (MRI)

MRI je občutljivejša metoda od CT. Prikaže tudi najmanjše pikčaste krvavitve v beli možganski masi, lezije v zadnji lobanjski kotanji ter frontalnem temporalnem režnju, kjer je velika možnost artefaktov na račun kostnih substanc pri snemanju s CT. Slabost MRI je dolžina trajanja preiskave, saj zahteva vsaj še enkrat daljši čas kot CT (19).

1.6.3 Cerebralna angiografija

Cerebralna angiografija je časovno in kadrovsko zahtevnejša, zaradi agresivnega pristopa pa tudi nevarnejša. Uporabljamo jo le takrat, kadar CT oziroma MRI ni na voljo. Je

preiskava, pri kateri s kontrastnim sredstvom prikažemo ekstra- in intrakranialno ožilje. Ob lokalni anesteziji se v arterijo femoralis uvede kateter do aortnega loka, kjer se injicira vodotopno jodno kontrastno sredstvo. Po vbrizgu kontrastnega sredstva sledi serija rentgenski posnetkov. Včasih je bila ta metoda pomembna v diagnostiki travmatskih možganskih krvavitev. Danes pa sta jo na tem področju zamenjali sodobnejši metodi CT in MRI (13, 19).

1.7 LABORATORIJSKI PARAMETRI

1.7.1 Protein S-100B

Protein S-100B ima kratek biološki razpolovni čas v serumu in sicer manj kot 30 minut. Njegovo koncentracijo merimo v likvorju in serumu. Protein S-100B ni samo kazalec možganske okvare. Po zadnjih podatkih naj bi imel nevrotrofične lastnosti, omilil naj bi poškodbo nevronov in prispeval k obnovi centralnega živčnega sistema. Znanе so njegove nevrotoksične lastnosti, in sicer naj bi stimuliral ekspresijo vnetnih citokinov in induciral programirano celično smrt. Časovni profil sproščanja in serumski nivo proteina S-100B sta odvisna od stopnje in vrste možganske okvare. Na splošno višje koncentracije nakazujejo hujšo stopnjo in večji obseg okvare, poleg tega pa so povezane s slabšim izidom po možganski okvari. Protein S-100B je zelo občutljiv, vendar ne zadosti specifičen kazalec možganske okvare. Povečane vrednosti so verjetno tudi posledica zunajlobanjskih izvorov proteinov S-100B. Tudi pri poškodovancih z izolirano poškodbo možganov so skoraj vedno poškodovani tudi lobanjska kost, podkožno tkivo in koža (5, 15).

1.7.2 Nevron-specifična enolaza (NSE)

Nevron-specifična enolaza (NSE) je znotrajcelični encim (dimer) glikolize, ki pretvarja 2-difosfoglicerat v fosfoenolpiruvat. Najprej so ga dokazali v celicah nevroektodermalnega izvora in nevronih. Poznanih je pet izoencimov, med katerimi izoencim $\gamma\gamma$ imenujemo za nevron-specifična enolaza, ker se nahaja v visokih

koncentracijah v citoplazmi nevronov in perifernih nevroendokrinih celicah ter možganskih tumorjih. Prisotnost NSE v likvorju in serumu kaže na možgansko okvaro in okvaro možgansko-krvne pregrade. NSE se zato uporablja kot napovedni označevalec možganskih poškodb pri komi, anoksiji, poškodbi glave, encefalitisu, akutnem cerebralnem infarktu, subarahnoidalni krvavitvi in epilepsiji. NSE je tudi histološki označevalec za umestitev možganskih tumorjev (15, 20).

1.7.3 Kisli glialni fibrilarni protein (GFAP)

Kisli gliani fibrilarni protein je monomerni intermediarni nitasti protein, glavni protein astroglialnega citoskeleta. Astroцитi predstavljajo približno polovico celic v možganih. GFAP sodeluje pri številnih celičnih procesih, kot so celična struktura, celično gibanje in celična komunikacija. Sodeluje pa tudi pri delovanju možgansko-krvne pregrade. Prednost GFAP-a pred proteinom S-100B je v njegovi specifičnosti za možgansko okvaro, saj ga do danes še niso našli zunaj centralnega živčnega sistema. Po travmatski poškodbi možganov se hitro sprosti v kri. Zaradi teh lastnosti je ustrezen označevalec zgodnje diagnostike pri poškodbi možganov (3, 15).

1.8 METODE DOLOČANJA PROTEINA S-100B

Protein S-100B določamo z imunokemijskimi tehnikami. Imunokemijske tehnike so visoko specifične in občutljive tehnike. Omogočajo določitev analitov v koncentracijskem območju od 10^{-6} do 10^{-12} mol/L. Imunokemijske tehnike temeljijo na reakciji med antigeni in protitelesi. Nastanek kompleksa antigen-protitelo detektiramo na različne načine. Detekcija poteka na osnovi imunoprecipitacije ali s pomočjo oznak na antigenu ali protitelesu. Oznake so lahko radioaktivni izotopi, encimi, fluorescentne molekule ali kemiluminiscentne molekule. Značilna je široka uporabnost, saj se uporabljajo za določanje zdravil, hormonov, tumorskih označevalcev, izoencimov, protiteles in antigenov (21).

1.8.1 ELISA

Encimskoimunska metoda (ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay) sodi med imunokemijske tehnike, ki se uporabljajo za določanje antigenov v vzorcu. Pri tej metodi kot oznako uporabljamo encim, ki povzroči spremembo barve substrata in tako omogoči detekcijo prisotnosti preiskovanega protitelesa ali antigena. Najpogosteje uporabljeni encimi so hrenova peroksidaza, alkalna fosfataza in β -D-galaktozidaza. Končni signal lahko detektiramo kolorimetrično, fluorimetrično ali kemiluminiscentno. Značilnost encimov je visoka specifična aktivnost, saj lahko ena molekula encima katalizira pretvorbo številnih molekul substrata, kar pomeni, da se signal pomnoži. ELISA je dvostopenjski, nekompetitivni imunoencimski test, ki temelji na dveh monoklonskih mišjih protitelesih, ki sta specifična za dva različna epitopa, izražena na S-100B proteinu.

Princip metode je uporaba encimsko označenega protitelesa, ki se veže na iskani antigen v vzorcu (tarčni protein), ki je v kompleksu s primarnim protitelesom na trdni fazi. Po dodatku substrata poteče encimska reakcija, v kateri encim pretvori substrat v obarvan produkt. Količino vezavnega antigena v vzorcu določimo preko koncentracije nastalega obarvanega produkta encimske reakcije s pomočjo umeritvene krivulje. Koncentracija iskanega proteina v serumu je sorazmerna koncentraciji nastalega produkta (21, 22).

1.8.2 LIA

LIA (luminescence immunoassay) je dvostranska in heterogena kemiluminiscentna imunokemijska tehnika (»sendvič« princip). Pri kemiluminiscentnih imunokemijskih tehnikah kot oznako uporabljamo luminol in derivate ter akridinijeve estre. Pri kemiluminiscenci gre za oksidacijo organskih molekul. Merimo emisijo fotonov, ki jo dajejo produkti kemijske reakcije pri vračanju iz vzbujenega v osnovno stanje.

Metoda LIA temelji na paramagnetnih delcih, ki so prekriti z monoklonskimi protitelesi. Na ta protitelesa se veže iskani antigen iz vzorca. Na kompleks protitelo-antigen se nato veže protitelo, ki je označeno z derivatom izoluminola. Po dodatku reagenta, ki inducira kemiluminiscentno reakcijo, merimo emisijo fotonov, ki jih oddajajo produkti kemiluminiscentne reakcije. Svetlobni signal merimo s fotopomnoževalko v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Koncentracija proteina S-100B je sorazmerna oddanemu svetlobnemu signalu (21, 23).

2 NAMEN DELA

Namen dela diplomske naloge je ugotoviti, katera izmed metod ELISA in LIA je primernejša za določanje proteina S-100B v serumu. Določili bomo linearnost in natančnost metode LIA. Z metodo ELISA in LIA bomo vzorcem, ki smo jih bolnikom s poškodbo glave odvzeli ob sprejemu, in 12 ur po sprejemu določili koncentracijo proteina S-100B. Ugotovili bomo, v kolikšnem deležu bomo pri skupini opazovanih pacientov dobili povišane vrednosti s posamezno metodo ter na ta način določili analizno občutljivost obeh metod in jih med seboj primerjali.

3 MATERIALI IN METODE

Analizirali smo 129 vzorcev, odvzetih 33 bolnikom s poškodbo glave. Vzorci so bili odvzeti ob sprejemu ter 6, 12, 24, 48 in 72 ur po sprejemu. Ker nismo imeli vzorcev za vse navedene termine, smo v študijo primerljivosti metod vključili samo 50 vzorcev 25 pacientov, katerim kri je bila odvzeta ob sprejemu in 12 ur po njem. Vzorci so bili odvzeti za diagnostične postopke in ne za potrebe diplomske naloge.

3.1 METODA ELISA

V okviru diplomske naloge smo z metodo ELISA določili koncentracije proteina S-100B v serumu bolnikov s poškodbami glave. Meritve smo opravili v laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo.

3.1.1 Uporabili smo analizni komplet CanAg S100 EIA (CanAg Diagnostics AB), z naslednjimi sestavinami:

- streptavidin mikrotiterske ploščice

Na ploščici je 12 x 8 vdolbinic, ki so prevlečene s streptavidinom.

- S100 kalibratorji

Liofilizirani kalibratorji vsebujejo goveji S-100B protein v matrici in 0,02 % NaN₃, ki je konzervans. Kalibratorje smo pred uporabo pripravili z vodo. Koncentracija S-100B proteina v kalibratorju je specifična za vsako serijo in je navedena na etiketi vsake vial.

- Biotin Anti-S100B

Biotin Anti-S100 so monoklonska mišja protitelesa, katerih koncentracija je približno 2 µg/mL. Reagent vsebuje še fosfatni pufer (pH 7,2) s CaCl₂, goveji serumski albumin, goveje imunoglobuline, blokatorje, Tween 20, inertno modro barvilo in 0,01 % metilizotiazolona (MIT), ki je konzervans. Reagent je pripravljen za uporabo.

- Tracer, HRP Anti-S100

Osnovna raztopina HRP Anti-S100 vsebuje monoklonska mišja protitelesa, katerih koncentracija je približno 20 µg/mL. Vsebuje konzervanse. Pred uporabo smo reagent razredčili z Tracer razredčilom.

- Tracer razredčilo

Je fosfatni pufer (pH 7,2), ki vsebuje goveje serumske albumine, blokatorje, detergente, inertno modro barvilo, in 0,01 % metil-izotiazolon (MIT) kot konzervans. Pripravljen je za uporabo.

- TMB HRP-substrat

TMB HRP-substrat vsebuje puferiran vodikov peroksid in 3,3',5,5' tetrametil-benzidin (TMB). Pripravljen je za uporabo. TMB HRP-substrat mora biti brezbarven ali rahlo modrikast. Modra barva pomeni, da je reagent kontaminiran in ga je potrebno zavreči.

- Stop raztopina

Stop raztopina je 0,12 M klorovodikova kislina. Pripravljena je za uporabo.

- Raztopina za spiranje

Raztopina za spiranje je Tris-HCl pufrna raztopina, ki vsebuje Tween 20 in Germall II kot konzervans. Pred uporabo jo razredčimo z vodo v razmerju 1:25.

3.1.2 Oprema (Personal Lab)

- Stresalnik mikrotiterskih ploščic

Stresali smo srednje do zelo intenzivno. Vzdolžno tresenje je bilo približno 200 udarcev / min in nihanje 700 - 900/min.

- Naprava za spiranje mikrotiterskih ploščic

Uporabili smo avtomatsko napravo za spiranje ploščic, ki izvaja en, tri in šest ciklov spiranja.

- Spektrofotometer za mikrotiterske ploščice

Uporabili smo spektrofotometer z valovno dolžino 620 nm in 405 nm ter obsegom absorbance 0 - 3,0.

- Natančne pipete

Uporabili smo pipete s plastičnimi mililitrskimi in mikrolitrskimi nastavki za odmerjanje. Uporabne so tudi 8-kanalne pipete s plastičnimi nastavki za odmerjanje 100 μ L.

3.1.4 Priprava reagentov

- S-100 kalibratorji

Kalibratorjem smo dodali natančno 1,0 ml destilirane vode in rahlo premešali. Pustili smo stati 15 minut.

- Raztopina za spiranje

50 ml koncentrata za spiranje smo prenesli v čisto posodo in razredčili 25-krat z 1200 mL destilirane ali deionizirane vode.

- Delovni reagent

Tracer delovno raztopino smo pripravili tako, da smo 50 μL raztopine Tracer, HRP Anti-S-100 dodali 1 mL Tracer razredčila za en vzorec.

3.1.5 Analizni postopek

Vsako določanje smo opravili v dveh paralelkah za kalibratorje in vzorce. Vse reagente in vzorce smo pred analizo segreli na sobno temperaturo (20 - 25 °C).

1. Pripravili smo S-100 kalibratorje, raztopino za spiranje in delovni reagent po navodilih. Pomembno je bilo, da smo uporabili čist inventar.
2. Potrebno število mikrotiterskih ploščic smo prenesli v nosilce. Ostale mikrotiterske ploščice smo takoj vrnili v aluminijasto vrečko, ki vsebuje sušilno sredstvo in shranili. Vsako ploščico smo sprali z raztopino za spiranje.
3. Odpipetirali smo 50 μL S100 kalibratorja (CAL A, B, C, D, E, F) in vzorcev (Vz 1, Vz 2) v vdolbinice ploščice v skladu z naslednjo shemo.

Tabela 2: Shema pipetiranja kalibratorjev in vzorcev pri metodi ELISA

	1	2	3
A	Cal A	Cal E	
B	Cal A	Cal E	
C	Cal B	Cal F	
D	Cal B	Cal F	
E	Cal C	Vz 1	
F	Cal C	Vz 1	
G	Cal D	Vz 2	
H	Cal D	Vz 2	

4. Z natančno 100 μ L pipeto (ali 8-kanalno precizno pipeto) smo dodali 100 μ L Biotin Anti-S100 protitelesa v vsako vdolbinico. Izogibati smo se morali temu, da bi pipeto držali tik ob robu vdolbinice in da se ne bi dotikali plastične površine ploščice ali površine tekočine.
5. Nosilce s ploščicami smo inkubirali 2 uri (\pm 10 min) pri sobni temperaturi (20 - 25°C) s konstantnim mešanjem na stresalniku za mikrotiterske ploščice.
6. Po prvi inkubaciji smo aspirirali in 3 krat sprali vsako ploščico z raztopino za spiranje.
7. Dodali smo 100 μ L delovnega reagenta v vsako vdolbinico. Upoštevali smo navodila za pipetiranje, ki so navedena v točki 4.
8. Inkubirali smo 1 uro (\pm 5 min) pri sobni temperaturi s konstantnim mešanjem.
9. Po drugi inkubaciji smo aspirirali in 6 -krat sprali vsako ploščico z raztopino za spiranje.
10. Dodali smo 100 μ L TMB HRP-substrata v vsako vdolbinico z upoštevanjem navodil, ki so navedena v točki 4. TMB HRP-substrat je bilo potrebno dodati v vse vdolbinice v čim krajšem času, čas med prvim pipetiranjem in zadnjim pa ni smel presegati 5 minut.
11. Inkubirali smo 30 minut (\pm 5 min) pri sobni temperaturi s konstantnim mešanjem. Potrebno se je bilo izogibati neposredni sončni svetlobi.
12. S spektrofotometrom za mikrotiterske ploščice smo takoj odčitali absorbanco pri valovni dolžini 620 nm.

3.1.6 Izračun rezultatov

Za izračun smo naredili umeritveno krivuljo tako, da smo vnesli vrednosti absorbanc (A) za vsak S-100 kalibrator proti ustrezni koncentraciji (v ng/L). Neznano S100 koncentracijo vzorca smo nato odčitali z umeritvene krivulje z uporabo povprečne vrednosti absorbance obeh vzorcev.

3.1.7 Značilnosti metode

- Merilno območje

Z metodo ELISA lahko določimo koncentracije proteina S-100B med 10 in 3500 ng/L. Če smo pričakovali, da je koncentracija proteina S-100B v vzorcu nad merilnim območjem, smo vzorec pred analizo razredčili z normalnim človeškim serumom. Serumu, ki smo ga uporabili za redčenje, smo morali pred uporabo določiti koncentracijo endogenega proteina S-100B.

- Meja detekcije

Meja detekcije metode ELISA je ≤ 10 ng/L.

- Hookov efekt

Hookov efekt ni bil opazen pri vzorcih s koncentracijo do 150000 ng/L pri 620 nm ali 7000000 ng/L pri 405 nm.

- Analizna specifičnost

ELISA temelji na dveh mišjih monoklonskih protitelesih, specifičnih za dva različna epitopa, ki sta izražena na S-100B proteinu. Tako smo lahko določili protein S-100B brez navzkrižne reaktivnosti z drugimi S100 oblikami. Preverjeno je, da naslednje snovi v določenih koncentracijah ne motijo analize.

Tabela 3: Koncentracije snovi, ki še ne povzročajo interferenc

	Koncentracija, ki še ne povzroča interference
Lipidi	10 mg/mL
Bilirubin, nekonjugiran	0.6 mg/mL
Hemoglobin	3.9 mg/mL

3.1.8 Omejitve pri metodi

Humana protitelesa proti mišjim monoklonskim protitelesom v vzorcu lahko občasno motijo analizo, čeprav so v pufru vključeni specifični blokatorji.

3.2 METODA LIA

Metoda LIA je rutinska metoda, ki jo izvajajo v laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo. Podatke o linearnosti in natančnosti metode smo pridobili od proizvajalca.

3.2.1 Analizni komplet reagentov LIAISON® S100

Uporabili smo analizni komplet LIAISON® S100 (DiaSorin S.p.A.), ki je vseboval vse sestavine, potrebne za analizo (Tabela 4).

Tabela 4: Reagenti v kompletu LIAISON® S100

Reagenti v setu	
1 x 2.3 ml	Suspenzija magnetnih delcev, ki so prekriti z anti-S100 monoklonskimi protitelesi.
1 x 4.0 mL	Razredčilo (samo za CSF)
1 x 23 mL	Raztopina anti-S100 protiteles, označenih z izoluminolom
1 x 14 mL	Analizni pufer

3.2.2 Oprema

Metodo LIA smo izvajali na avtomatskem analizatorju LIAISON®, ki deluje na principu kemiluminiscence.

3.2.3 Priprava reagentov

Preden smo odstranili pečate, smo reagente previdno in rahlo pretresli. Paziti smo morali, da ne nastane pena. Odstranili smo pečat iz vsakega rezervoarja in s palcem zavrteli pokrovček proti dnu stekleničke z magnetnimi delci, da je suspenzija postala rjave barve. Ta postopek je povzročil resuspenzijo magnetnih delcev. Previdno smo obrisali površino, da smo odstranili preostalo tekočino. Nato smo ga namestili v prostor za reagent na

analizatorju LIAISON® s črtno kodo na levi strani in pustili stati 30 minut. Analizator je avtomatsko pretresel in popolnoma resuspendiral magnetne delce.

3.2.4 Analizni postopek

Tabela 5: Tabela prikazuje operacije analizatorja LIAISON® pri izvedbi metode LIA.

100 µL	vzorec, kalibrator ali kontrolni vzorec
+ 20 µL	obloženi magnetni delci
+100 µL	analizni pufer
10 min	inkubacija, ki ji sledi spiranje
+200 µL	sledilni konjugat
10 min	inkubacija, ki ji sledi spiranje
3 s	meritev

3.2.5 Izračun rezultatov

Analizator LIAISON® avtomatsko izračuna koncentracijo S-100B proteina v vzorec v µg/L.

3.2.6 Referenčno območje

Pri 95 % zdravih moških in ženskah je bila ugotovljena vrednost proteina S-100B v serumu pod 0.15 µg/L.

3.2.7 Značilnosti metode

- Merilno območje

Merilno območje metode LIA je med 0.02 in 30 µg/L.

Če smo pričakovali, da je koncentracija proteina S-100B v vzorcu nad merilnim območjem, smo vzorec pred analizo razredčili. Serumske vzorce smo razredčili z normalnim humanim serumom z nizkim titrom proteina S-100B.

- Specifičnost metode

Študije o potencialno motečih snoveh ali pogojih so pokazale, da na ustreznost metode ne vplivajo naslednje koncentracije:

Tabela 6: Koncentracije snovi, ki še ne povzročajo interferenc

	Koncentracija, ki še ne povzroča interference
Lipidi	30 mg/mL
Bilirubin	0.2 mg/mL
Hemoglobin	125 mg/dL

- Meja detekcije

Meja določljivosti metode LIA je < 0.02 µg/L.

- Hookov efekt visoke doze

Hookov efekt visoke doze se ne pojavi pri koncentracijah proteina S-100B pod 2400 µg/L.

3.2.8 Omejitve pri metodi

- Bakterijska kontaminacija in vročinski vplivi na vzorec lahko vplivajo na rezultat analize.
- Čeprav je dodan reagent za nevtralizacijo HAMA (humana protitelesa proti mišjim protitelesom), lahko ekstremno visoke koncentracije HAMA vplivajo na rezultat.
- Vzorce, ki vsebujejo koncentracijo proteina S-100B nad območjem določljivosti razredčimo.

3.3 ZBIRANJE IN PRIPRAVA VZORCEV

Kot vzorec smo uporabili serum. Če testa nismo izvedli v dnevu, ko je vzorec odvzet, smo serum ločili od sedimenta in ga shranili v ločeni epruveti. Vzorec smo hranili 24 ur pri 2 - 8°C, za daljše shranjevanje pa smo vzorec zamrznili pod - 20°C. Izogibati smo se morali večkratnemu zamrzovanju in taljenju, shranjene vzorce pa smo pred uporabo dobro pretresli. Močno hemolizirani ali lipemični vzorci in vzorci, ki so vsebovali delce ali kazali očitno kontaminacijo z mikrobi, niso bili primerni za analizo. Minimalen volumen, ki je bil potreben za posamezno določitev, je 250 µL seruma.

4 REZULTATI

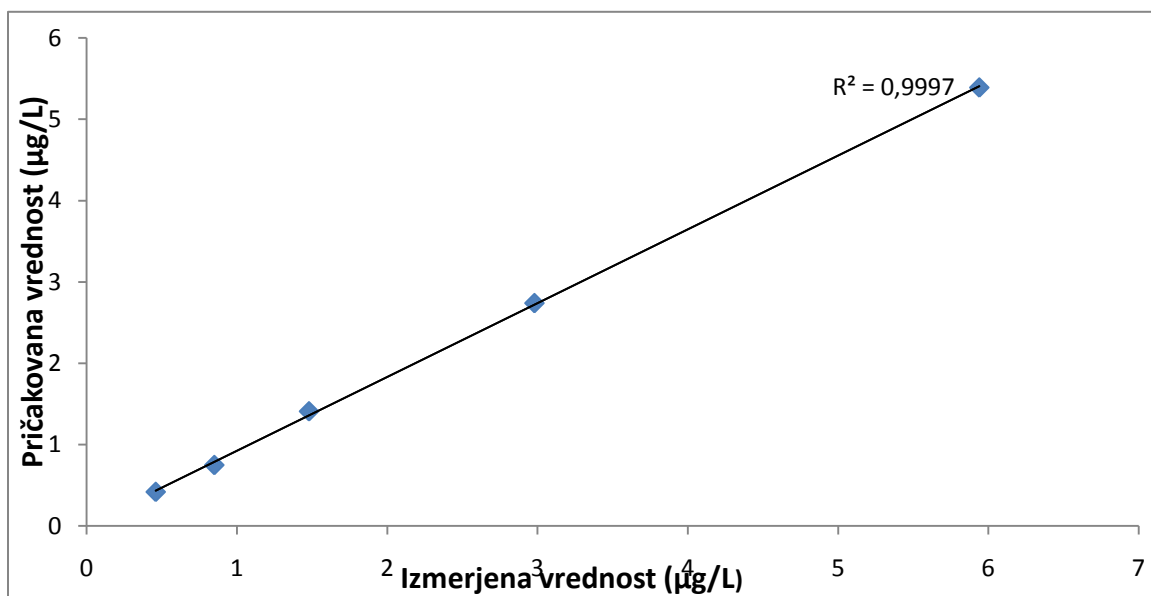
4.1 LASTNOSTI METODE LIA

4.1.1 Linearnost

Linearnost smo določali tako, da smo vzorec serijsko razredčili z normalnim humanim serumom. Izmerjene vrednosti so bile med 105 in 113 % pričakovane vrednosti (Tabela 9). Metoda je v redčitvenem območju linearna (Slika 2).

Tabela 7: Rezultati testa, s katerim smo določili linearnosti metode LIA.

Razredčitev	Izmerjena vrednost ($\mu\text{g/L}$)	Pričakovana vrednost ($\mu\text{g/L}$)	Izkoristek (%)
1 : 2	5.94	5.39	110
1 : 4	2.98	2.74	109
1 : 8	1.48	1.41	105
1 : 16	0.85	0.75	113
1 : 32	0.46	0.42	109



Slika 2: Grafični prikaz razmerja med izmerjenimi in pričakovanimi vrednostmi, ki dokazuje, da je metoda LIA linearna.

4.1.2 Natančnost

Natančnost opisuje, kako se ponavljajo rezultati, ki smo jih dobili na enak način. Test natančnosti smo izvedli tako, da smo šestim vzorcem naredili pet določitev koncentracije proteina S-100B ter tako določili variacijo znotraj serije. Natančnost metode smo ocenili s koeficientom variacije, ki ne presega 6,4 % (Tabela 8).

Tabela 8: Rezultati testa, s katerim smo določili natančnost metode LIA.

Variacija znotraj serije		
Srednja vrednost ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	n*
0.11	6.4	5
0.31	3.1	5
1.6	2.8	5
2.6	3.9	5
9.9	2.8	5
18.4	3.6	5

4.2 ZNAČILNOSTI REZULTATOV VZORCEV**Tabela 9: Koncentracija proteina S-100B ($\mu\text{g/L}$) v vzorcih, ki smo jih odvzeli bolnikom ob sprejemu.**

Število vzorca	Pacient	S-100B LIA (0,15)	S-100B ELISA (0,124)
1	A. R.	0,11	0,043
2	B. M.	2,76	1,05
3	B. L.	2,07	0,453
4	Č. J.	1,1	0,215
5	G. A.	0,94	0,207
6	G. D.	3,09	0,17
7	H. M.	1,6	3,5
8	H. S.	0,45	0,1
9	P. J.	0,9	0,12
10	J. A.	0,43	0,117
11	J. J.	2,34	0,57
12	K. J.	2	1,035
13	M. M.	0,45	0,1
14	P. B.	0,76	0,109
15	P. B.	0,12	0,01
16	S. D.	0,29	0,122
17	S. R.	0,13	0,001
18	Š. B.	0,36	0,01
19	U. M.	0,12	0,012
20	P. R.	0,72	0,097
21	V. J.	0,86	0,157
22	K. B.	1,4	0,44
23	S.I.	1,29	0,12
24	M. D.	1,85	0,225
25	J. I.	7,22	0,68

Tabela 10: Koncentracija proteina S-100B ($\mu\text{g/L}$) v vzorcih, ki smo jih odvzeli bolnikom 12 ur po sprejemu.

Število vzorca	Pacient	S-100B LIA (0,15)	S-100B ELISA (0,124)
1	A. R.	0,11	0,049
2	B. M.	3,06	0,665
3	B. L.	1,52	0,257
4	Č. J.	0,2	0,093
5	G. A.	1,45	0,232
6	G. D.	3,09	0,001
7	H. M.	9,27	1,761
8	H. S.	0,27	0,06
9	P. J.	0,53	0,05
10	J. A.	0,78	0,089
11	J. J.	0,74	0,1
12	K. J.	8,34	0,851
13	M. M	0,42	0,154
14	P. B.	0,58	0,096
15	P. B.	0,1	0,02
16	S. D.	0,2	0,118
17	S. R.	0,21	0,039
18	Š. B.	0,5	0,052
19	U. M.	0,26	0,055
20	P. R.	0,15	0,007
21	V. J.	0,35	0,077
22	K. B.	0,56	0,1
23	S. I.	0,51	0,07
24	M. D.	1,17	0,105
25	J. I.	16,8	1,619

Izračuni

$$\Sigma_{LIA} = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_{50} \dots \text{vsota vseh meritev LIA}$$

$$\Sigma_{LIA} = 0,11 + 2,76 + 2,07 \dots + 16,8 = \underline{84,53}$$

$$\Sigma_{ELISA} = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_{50} \dots \text{vsota vseh meritev ELISA}$$

$$\Sigma_{ELISA} = 0,043 + 1,05 + 0,453 + \dots + 1,619 = \underline{16,38}$$

.....

$$\bar{x}_{LIA} = \frac{\Sigma_{LIA}}{n} \dots \text{povprečna vrednost vseh meritev LIA}$$

$$\bar{x}_{LIA} = \frac{84,53}{50} = \underline{1,69}$$

$$\bar{x}_{ELISA} = \frac{\Sigma_{ELISA}}{n} \dots \text{povprečna vrednost vseh meritev ELISA}$$

$$\bar{x}_{ELISA} = \frac{16,38}{50} = \underline{0,33}$$

.....

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}{n-1}} \dots \text{standardna deviacija za metodo LIA}$$

$$s = \sqrt{\frac{556,84 - \frac{7145,32}{50}}{49}} = \underline{2,906}$$

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}{n-1}} \dots \text{standardna deviacija za metodo ELISA}$$

$$s = \sqrt{\frac{23,20 - \frac{268,30}{50}}{49}} = \underline{0,603}$$

.....

$$KV\%_{LIA} = \frac{s}{\bar{x}_{LIA}} \times 100 \dots \text{koeficient variiranja za metodo LIA}$$

$$KV\%_{LIA} = \frac{2,93}{1,69} \times 100 = \underline{173,37\%}$$

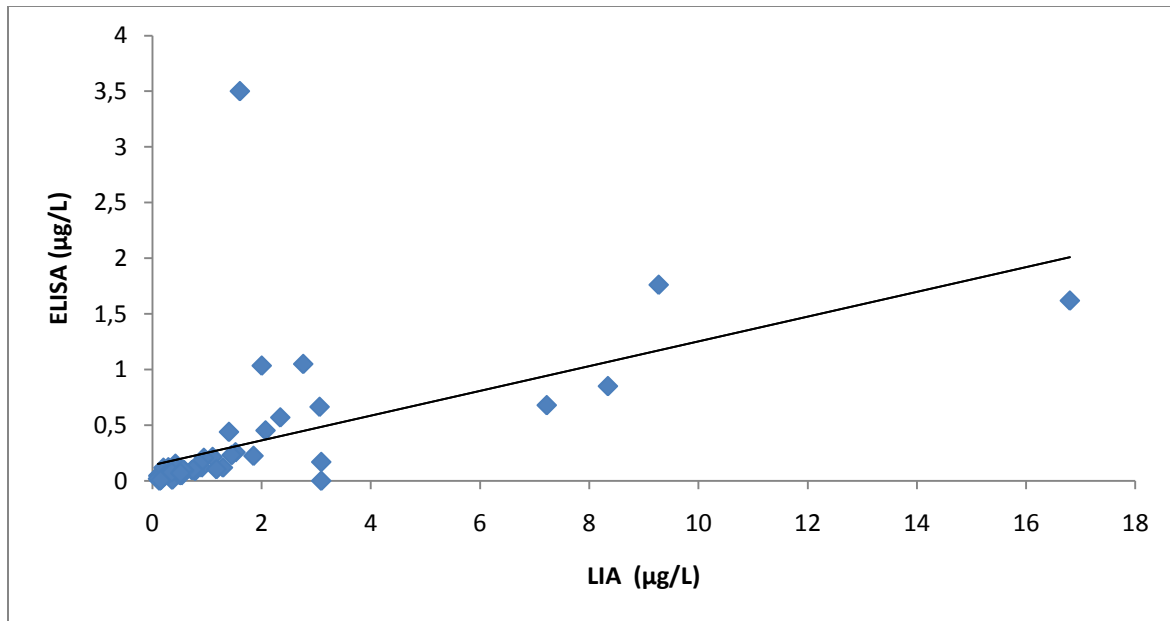
$$KV\%_{ELISA} = \frac{s}{\bar{x}_{ELISA}} \times 100 \dots \text{koeficient variiranja za metodo LIA}$$

$$KV\%_{ELISA} = \frac{0,600}{0,33} \times 100 = \underline{181,82\%}$$

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \times \sum y}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}) \times (\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}} \dots \text{korelacija rezultatov med obema}$$

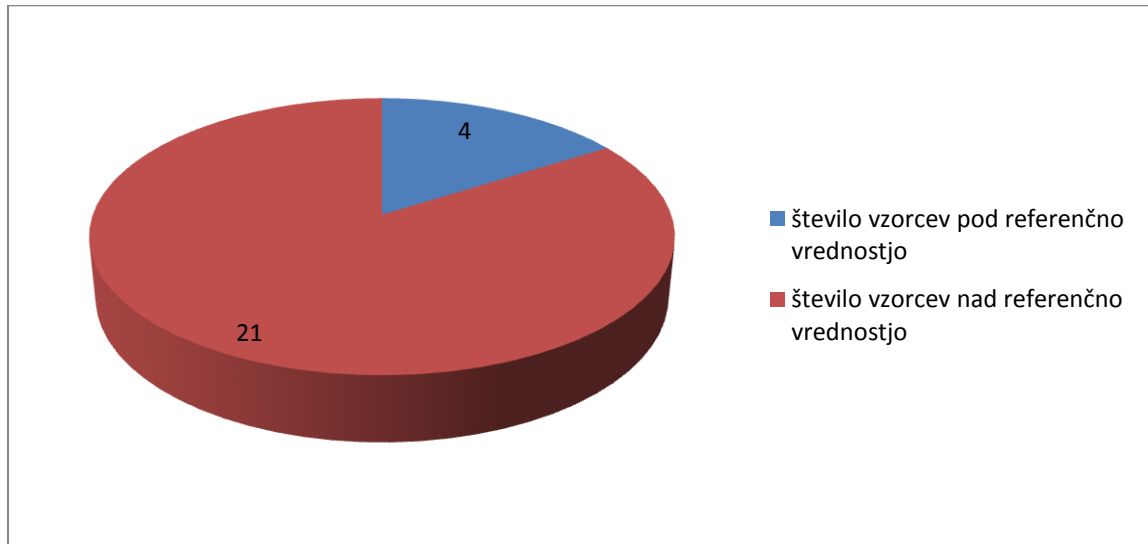
metodama

$$r = \underline{0,543}$$

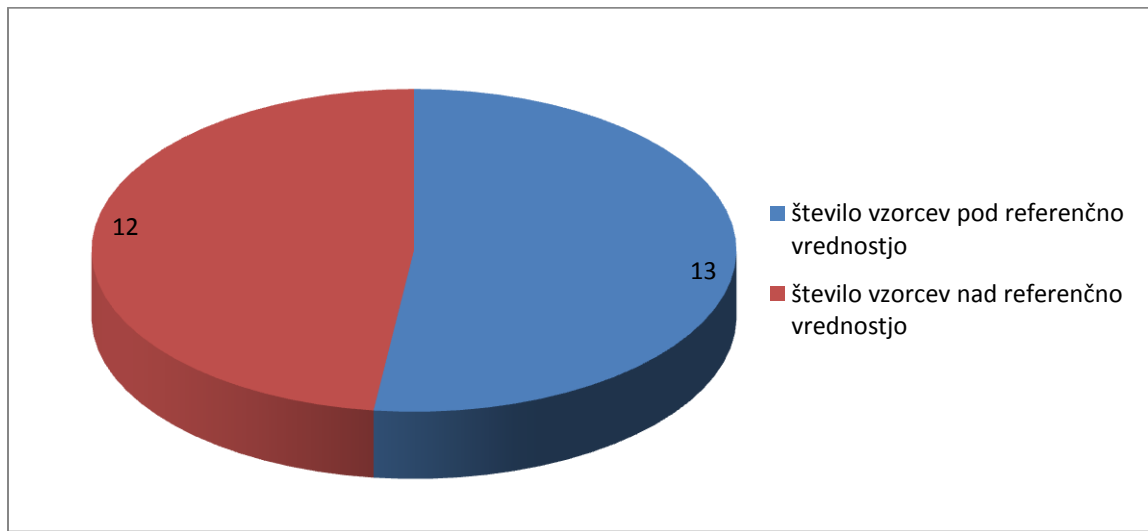


Slika 3: Razmerje med vrednostmi meritev, izmerjenih z metodama LIA in ELISA. (n = 50)

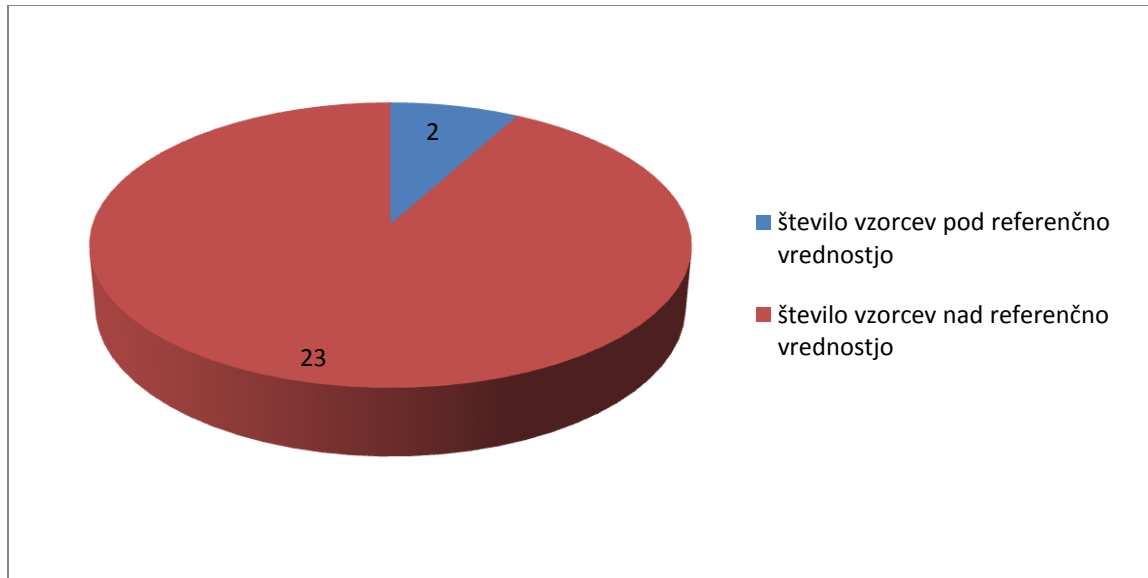
Spodaj je predstavljeno število vzorcev, ki so bili določeni s posamezno metodo glede na to, ali presegajo oziroma ne presegajo referenčno vrednost.



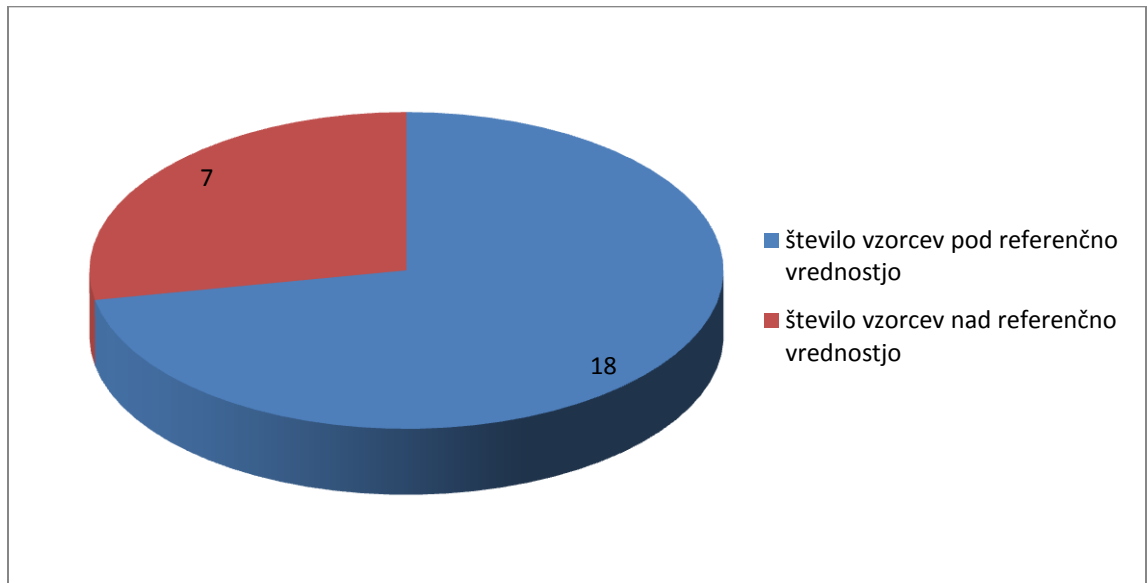
Slika 4: Graf prikazuje število vzorcev, ki so nad oziroma pod referenčno vrednostjo (referenčna vrednost: 0,15 µg/L). Vzorce smo odvzeli ob sprejemu in jih določili z metodo LIA. (n = 25)



Slika 5: Graf prikazuje število vzorcev, ki so nad oziroma pod referenčno vrednostjo (referenčna vrednost: 0,124 µg/L). Vzorce smo odvzeli ob sprejemu in jih določili z metodo ELISA. (n = 25)



Slika 6: Graf prikazuje število vzorcev, ki so nad oziroma pod referenčno vrednostjo (referenčna vrednost: 0,15 µg/L). Vzorce smo odvzeli 12 ur po sprejemu in jih določili z metodo LIA. (n = 25)

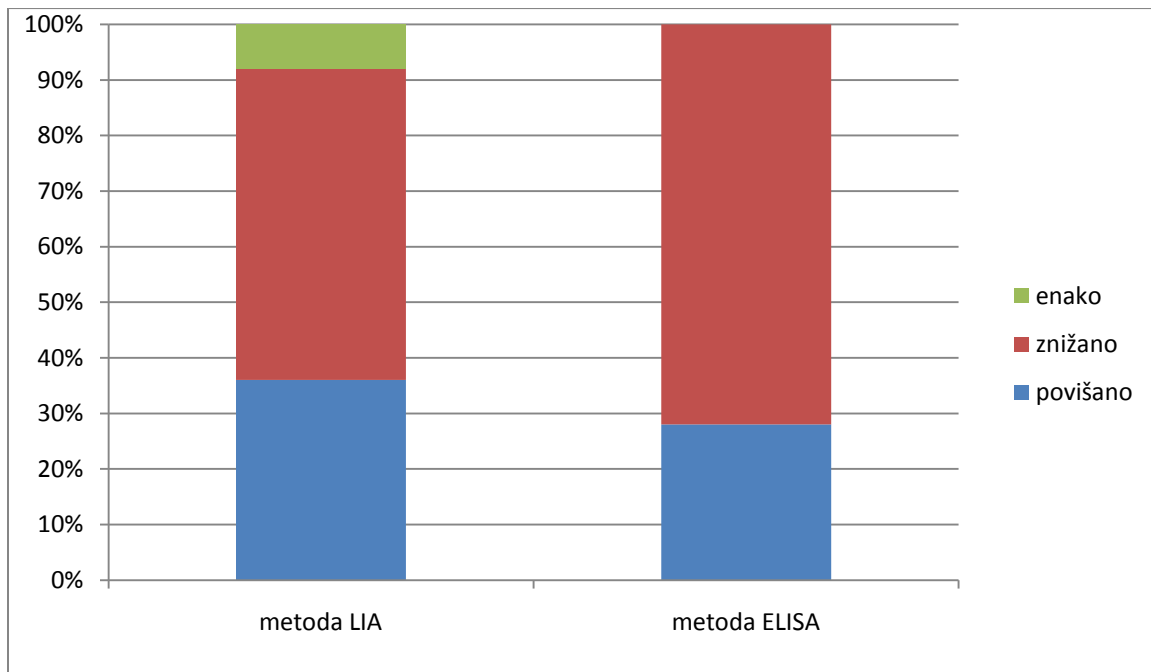


Slika 7: Graf prikazuje število vzorcev, ki so nad oziroma pod referenčno vrednostjo (referenčna vrednost: 0,124 µg/L). Vzorce smo odvzeli 12 po sprejemu in jih določili z metodo ELISA. (n = 25)

Tabela 11: Tabela prikazuje ujemanje rezultatov, ki smo jih pridobili z metodama LIA in ELISA. (n=50)

		LIA	
		+	-
ELISA	+	19	0
	-	25	6

Vzorci smo pacientom odvzeli ob sprejemu in 12 ur po njem, ter določili koncentracijo proteina S-100B z obema metodama. Na ta način smo določili delež pacientov, katerim se je vrednost proteina S-100B po 12 urah zvišala, znižala oziroma ostala enaka.



Slika 8: Graf prikazuje delež pacientov glede na to, ali se jim je koncentracija proteina S-100B v serumu po 12 urah zvišala, znižala oziroma ostala enaka.

5 RAZPRAVA

Protein S-100B se nahaja v glijalnih celicah centralnega in perifernega živčevja, predvsem v astrocitih in Schwannovih celicah. Če se poškodujejo celice glije, protein S-100B uhaja v krvni obtok ali cerebrospinalno tekočino. Zaradi tega dejstva ga lahko uporabljamo kot označevalec možganskih poškodb po travmatični poškodbi glave, ishemični poškodbi možganov in za diagnostiko in prognozo kliničnega izida po akutni možganske kapi (7).

Ker predstavlja nezgodna poškodba glave enega izmed glavnih vzrokov umrljivosti in invalidnosti predvsem med aktivno populacijo, je pomembno, da uporabimo enostavno in hitro metodo, s katero lahko natančno določimo obseg in težo primarne in sekundarne okvare možganov. Takšna metoda bi pripomogla k lažjemu zdravljenju, lahko pa bi služila tudi kot presejalna metoda za odkrivanje možganskih okvar.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, katera izmed metod LIA in ELISA je bolj primerna za določanje proteina S-100B po poškodbah glave, saj je temeljna naloga vsakega laboratorija izvajanje analiz, ki dajejo hitre, točne in zanesljive rezultate.

Najprej smo določili linearnost in natančnost metode LIA. Za ocenitev natančnosti metode smo iz meritev izračunali koeficient variacije, ki ne presega 6,4 % (Tabela 8). S tem smo potrdili, da je metoda natančna. Metoda je tudi v zadostni meri linearna, kar smo prikazali z grafom (Slika 2). S tem smo potrdili, da metoda LIA daje zanesljive rezultate.

Bolnikom s srednje težko in težko poškodbo glavo smo odvzeli vensko kri za določitev serumske koncentracije proteina S-100B. Vzorce, ki smo jih vključili v študijo primerljivosti, smo odvzeli ob sprejemu ter 12 ur po njem ter jih analizirali z metodama LIA in ELISA.

Ker so imeli bolniki, katerim so bili odvzeti vzorci, srednje težke in težke poškodbe glave, smo pričakovali značilno povišane vrednosti proteina S-100B. Ugotovili smo, da je srednja vrednost rezultatov, ki smo jih določili z metodo LIA 1,69 µg/L, standardna deviacija 2,906 in KV 173,37 %. Z metodo ELISA smo določili, da je srednja vrednost rezultatov 0,33 µg/L, standardna deviacija 0,603 in KV 181,8 2%. Korelacijski koeficient, ki predstavlja moč linearne povezanosti med dvema metodama, je 0,543. To pomeni, da so rezultati obeh metod slabo primerljivi. Referenčna vrednost za metodo LIA je 0,15 µg/L, za metodo ELISA 0,124 µg/L. Z metodo LIA smo določili 88 % vseh vzorcev, ki so vsebovali vrednost proteina S-100B nad referenčno vrednostjo, z metodo ELISA smo določili 38 % vseh vzorcev, ki so vsebovali koncentracijo proteina S-100B nad referenčno vrednostjo. Glede na to lahko ugotovimo, da metoda LIA v primerjavi z metodo ELISA v večji meri detektira povišane vrednosti proteina S-100B v serumu.

Metodi LIA in ELISA se razlikujeta v izvedbi. Metoda LIA je avtomatska metoda in jo izvedemo na analizatorju LIAISON®. Vzorce vstavimo v aparaturo, zaženemo program in počakamo na izpis rezultatov. Vsi reagenti v kompletu so identificirani s pomočjo črtnih kod, ki so na etiketi reagentov. Čitalec kod jih prebere, v primeru okvare le -tega pa jih lahko vnesemo tudi ročno. Ker je metoda avtomatizirana, je možnost napak manjša. Metoda je hitra in enostavna, saj sama meritev traja le 3 sekunde. Celoten postopek od vnosa vzorca v aparaturo LIAISON® do končnega rezultata traja približno pol ure.

Metoda ELISA ni avtomatizirana metoda. Vzorce, kalibratorje in reagente moramo pipetirati ročno. Pri pipetiranju moramo biti previdni, da pipete ne držimo tik nad robom vdolbinice na mikrotiterski ploščici in da se ne dotikamo plastične površine ploščice ali površine tekočine, saj bi tako lahko prišlo do kontaminacije. Pomembno je tudi, da dodajanje substrata v vse vdolbinice opravimo čim hitreje, saj čas med prvim in zadnjim pipetiranjem ne sme presegati 5 minut. Zaradi teh dejstev se znatno poveča možnost napak in nezanesljivih rezultatov. Zaradi ročnega pipetiranja vzorcev in reagentov ter

ročnega aspiriranja in spiranja vzorcev je metoda ELISA dokaj zamudna, poleg tega pa čas izvedbe podaljša še inkubiranje vzorcev. Vzorce namreč trikrat inkubiramo, skupni čas inkubacije pa je 3,5 ure. Pred meritvijo moramo pripraviti umeritveno krivuljo, s katere odčitamo koncentracijo proteina S-100B v vzorcu. Poleg tega pa moramo pred izvedbo metode pripraviti še S100 kalibratorje, raztopino za spiranje in delovni reagent. Za izvedbo metode ELISA potrebujemo posebno opremo, kot je stresalnik mikrotiterskih ploščic, naprava za spiranje mikrotiterskih ploščic, spektrofotometer za mikrotiterske ploščice in natančne pipete, kar metodo podraži. Ker v laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo uporabljajo analizator LIAISON® rutinsko za določanje številnih analitov, lahko rečemo, da je določitev proteina S-100B v serumu z metodo LIA za njih cenejša.

Z metodo LIA smo ugotovili, da se je po 12 urah koncentracija proteina S-100B v serumu 9 pacientom povišala, 14 pacientom znižala, pri 2 pacientih pa je koncentracija ostala enaka. Z metodo ELISA pa smo ugotovili, da se je po 12 urah koncentracija proteina S-100B v serumu 7 pacientom povišala, 18 pacientom pa znižala. Sklepamo lahko, da se je pacientom, katerim se je koncentracija proteina S-100B v serumu znižala, stanje izboljševalo. Pri pacientih, katerim se je koncentracija proteina S-100B v serumu zvišala, pa je prišlo do sekundarnih zapletov. Ugotovili smo tudi, da smo z metodo LIA pri večjem številu pacientov določili povišanje koncentracije proteina S-100B po 12 urah kot z metodo ELISA.

Povišane vrednosti proteina S-100B v serumu so lahko posledica tudi zunajlobanjskega sproščanja. Ker imajo poškodovanci z izolirano nezgodno poškodbo možganov v večini primerov poškodovano tudi lobanjsko kost, podkožno tkivo in kožo, je lahko povišana vrednost S-100B proteina tudi posledica teh poškodb. Še večjo možnost izvenlobanjskega izvora proteina S-100B pa imajo pacienti po poizkusu obešanja in po uspešnem kardiopulmonalnem oživljanju. Zato proteina S-100B ne smemo uporabiti kot absolutni dokaz za poškodbe možganov, ampak moramo rezultate vedno razlagati samo v kombinaciji z drugimi metodami, kot je CT glave. Razmejitvene vrednosti za posamezno

metodo nismo mogli določiti, ker nismo imeli podatkov o CT bolnikov. Določili bi jo tako, da bi pacientom, ki imajo nizko koncentracijo proteina S-100B opravili CT. Zbrali bi negativne CT izvide ter koncentracije proteina S-100B v serumu teh bolnikov ter na ta način izračunali razmejitveno vrednost za posamezno metodo.

Ugotovili smo tudi, da je protein S-100B občutljiv, vendar ne dovolj specifičen pokazatelj možganske okvare. Da bi povečali diagnostično specifičnost proteina S-100B, bi hkrati določili še kisli glialni fibrilarni protein, ki je specifičen za možganske okvare, ker ga zunaj centralno živčnega sistema še niso zasledili in je pokazatelj celične smrti (15). Za povečanje specifičnosti bi lahko določili tudi NSE, ki je primarno prisoten v citoplazmi nevronov in povišane koncentracije tega encima v likvorju in serumu kažejo na možgansko okvaro. Povišanje koncentracije omenjenih dveh označevalcev možganskih poškodb pa so lahko posledica hemolize, zato tudi z njihovo določitvijo ne moremo zagotoviti popolne specifičnosti (9). Zato je nujno, da poleg biokemijskih označevalcev uporabimo še druge diagnostične metode, kot je CT glave.

Z diplomsko nalogo smo ugotovili, da je metoda LIA natančna in linearna, z metodo ELISA pa dajeta slabo primerljive rezultate. V nasprotju z metodo ELISA je metoda LIA avtomatizirana, kar zmanjša možnost napak, je hitrejša in enostavnejša. Z analizo vzorcev, ki so bili odvzeti bolnikom s srednje težko in težko nezgodno poškodbo glave, smo ugotovili, da daje metoda LIA višje vrednosti proteina S-100B in da v večji meri detektira povišane vrednosti proteina S100, kar pomeni, da je občutljivejša kot metoda ELISA. Glede na ta dejstva lahko zaključimo, da je metoda LIA primernejša za določanje proteina S-100B v serumu kot metoda ELISA.

6 SKLEP

- Določili smo, da je metoda LIA linearna in natančna ter da metodi LIA in ELISA dajeta slabo primerljive rezultate, saj je koeficient korelacije 0,543.
- Rezultati določanja vzorcev z obema metodama so pokazali, da metoda LIA daje višje vrednosti in v večji meri detektira povišane vrednosti proteina S-100B v serumu.
- Prav tako smo ugotovili, da je metoda ELISA zamudnejša, ker ni avtomatizirana, in zaradi ročnega dela je večja možnost napak in nezanesljivih rezultatov.
- Z diplomsko nalogo smo dokazali, da je metoda LIA primernejša od metode ELISA za določanje proteina S-100B v serumu pri poškodbah možganov.

7 LITERATURA

1. Gaynor R., Irie R., Morton D., Morton D., Herschman H. R.: S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature* 286, julij 1980: 400–401.
2. Heizmann C. W., Fritz G., Schäfer B. W.: S100 proteins: structure, functions and pathology. *Frontiers in Bioscience* 7, maj 2002: 1356–368.
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Glial_fibrillary_acidic_protein, december 2009.
4. CATALOGUE: 8S9h: PRODUCT NAME: S-100 protein, $\beta\beta$ homodimer and $\alpha\beta$ heterodimer, human. HyTest, DataSheet. Dosegljivo na: <http://www.hytest.fi/sites/hytest.fi/files/8S9h.pdf>
5. Catalogue Number MAB079-1: Anti-S-100 Protein, clone 15E2E2. Dosegljivo na: <http://www.millipore.com/catalogue/item/MAB079-1#>
6. Zbornik predavanj: Poškodbe glave – vpliv celovite nevrorehabilitacijske obravnave na funkcijski izid. Inštitut Republike Slovenije, marec 2005.
7. Zimmer DB., Cornwall EH., Landar A., Song W., Zimmer DB., Cornwall EH., Landar, Song W.: The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull.* 1995; 37 (4) :417 – 29.
8. Ocvirk J., Hočevnar M.: Informacije o bolezni in zdravljenju melanoma. Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana 2005.
9. Osredkar, J.: Izbrana poglavja iz klinične kemije. UL FFA, Ljubljana, 2008.
10. Raabe A., Seifert V.: Protein S-100B as a serum marker of brain damage in severe head injury: preliminary results. *Neurosurg Rev* (2000) 23:136–138.
11. Grajn A., Strojnik A.: Poškodbe glave in možganov. *Medicinski mesečnik*, maj 2006: 149-56.
12. Grajn A., Strojnik A.: Poškodbe glave in možganov. *Medicinski mesečnik*, december 2006: 373-83.
13. Košorok, V.: Rehabilitacijska obravnava bolnikov po poškodbi glave. Inštitut R. Slovenije za rehabilitacijo, Ljubljana 1995.

14. Powell, T.: Poškodbe glave: praktični vodnik. Društvo Vita za pomoč po nezgodni poškodbi možganov, Ljubljana 1996.
15. Kremžar B., Gradišek P., Koršič M., Osredkar J.: Posodobljena obravnava bolnikov s hudo poškodbo glavo – analiza S100B in NSE proteinov v serumu in likvorju iz rutinskega punktata. UKC, Ljubljana.
16. Klun, B.: Možganske poškodbe. Zdravniška zbornica Slovenije, Ljubljana 1997.
17. Pilih, I. A.: Analiza prognostične vrednosti klinične ocene poškodovanca s hudo poškodbo glave. Magistersko delo, Ljubljana 1996.
18. Košorok, V.: Rehabilitacija po hudi poškodbi glave – ocenjevanje funkcionalnega izida po mednarodni klasifikaciji okvar, prizadetosti in oviranosti. Magistersko delo, Ljubljana, 1994.
19. Tetičkovoč E.: Klinična nevrologija. Založba obzorja Maribor, 1997.
20. Kravos M., Kralj G., Malešič I.: Encimi v likvorju. Zdrav Vestn 2008; 77: 593–9.
21. Imunokemijske metode. Vaje pri predmetu Inštrumentalne tehnike v biomedicinskih laboratorijih. Fakulteta za farmacijo, šolsko leto 2008/09.
22. CanAg S100 EIA:Navodila za uporabo. CanAg Diagnostics AB, Švedska, 2003.
23. LIASION® S100: Navodilo za uporabo. DiaSorin S.p.A., Italy, 2008.
24. Adamič, Š.: Temelji biostatistike. Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani, Ljubljana 1989.

PRILOGA

Rezultati analize vseh vzorcev.

Število vzorca	Pacient	Čas odvzema vzorca	S-100B LIA	S-100B ELISA
1	A. R.	ob sprejemu	0,11	0,043
2		po 6 urah	0,07	0,001
3		po 12 urah	0,11	0,049
4		po 24 urah	0,06	0,069
5		po 48 urah	0,1	0,06
6		po 72 urah	0,07	0,062
7	B. M.	ob sprejemu	2,76	1,05
8		po 6 urah	2,99	1,185
9		po 12 urah	3,06	0,665
10	B. L.	ob sprejemu	2,07	0,453
11		po 6 urah	1,73	0,259
12		po 12 urah	1,52	0,257
13		po 24 urah	1,25	0,16
14		po 48 urah	1,46	0,151
15	Č. J.	ob sprejemu	1,1	0,215
16		po 6 urah	1,2	0,226
17		po 12 urah	0,2	0,093
18	G. A.	ob sprejemu	0,94	0,207
19		po 6 urah	1,27	0,232
20		po 12 urah	1,45	0,232
21		po 24 urah	1,81	0,256
22		po 48 urah	1,67	0,195
23	G. D.	ob sprejemu	3,09	0,17
24		po 6 urah	0,82	0,764
25		po 12 urah	3,09	0,001
26	H. M	ob sprejemu	1,6	3,5
27		po 6 urah	15,9	1,615
28		po 12 urah	9,27	1,761
29	H. S.	ob sprejemu	0,45	0,1

30		po 6 urah	0,37	0,09
31		po 12 urah	0,27	0,06
32		po 24 urah	0,25	0,082
33	D. M.	ob sprejemu	0,35	0,05
34	P. J.	ob sprejemu	0,9	0,12
35		po 6 urah	0,63	0,08
36		po 12 urah	0,53	0,05
37	J. A.	ob sprejemu	0,43	0,117
38		po 6 urah	0,52	0,099
39		po 12 urah	0,78	0,089
40		po 24 urah	0,64	0,189
41		po 48 urah	1,5	0,075
42		po 72 urah	0,7	0,04
43	J. J.	ob sprejemu	2,34	0,57
44		po 12 urah	0,74	0,1
45		po 24 urah	0,5	0,102
46		po 48 urah	0,47	0,077
47	K. J.	ob sprejemu	2	1,035
48		po 6 urah	4,45	0,947
49		po 12 urah	8,34	0,851
50		po 24 urah	11,4	0,955
51	L. F.	ob sprejemu	11	1,706
52		po 6 urah	1,39	0,146
53	M. A.	ob sprejemu	0,15	0,015
54		po 6 urah	0,08	0,001
55		po 24 urah	0,19	0,004
56		po 48 urah	0,17	0,007
57		po 72 urah	0,18	0,005
58	M. M.	ob sprejemu	0,45	0,1
59		po 12 urah	0,42	0,154
60		po 24 urah	0,81	0,168
61		po 72 urah	1,33	0,179
62	P. M.	ob sprejemu	3,05	0,885
63		po 6 urah	5,63	1,135
64		po 24 urah	7,7	1,114
65		po 48 urah	0,95	0,168

66	P. B.	ob sprejemu	0,76	0,109
67		po 6 urah	0,35	0,099
68		po 12 urah	0,58	0,096
69		po 24 urah	0,49	0,102
70	P. B.	ob sprejemu	0,12	0,01
71		po 6 urah	0,14	0,067
72		po 12 urah	0,1	0,02
73		po 24 urah	0,1	0,02
74	R. M.	ob sprejemu	7,42	2,066
75	S. D.	ob sprejemu	0,29	0,122
76		po 6 urah	0,38	0,181
77		po 12 urah	0,2	0,118
78		po 24 urah	0,44	0,043
79		po 48 urah	0,39	0,09
80	S. R.	ob sprejemu	0,13	0,001
81		po 12 urah	0,21	0,039
82		po 24 urah	0,14	0,003
83	Š. B.	ob sprejemu	0,36	0,01
84		po 6 urah	0,59	0,063
85		po 12 urah	0,5	0,052
86		po 24 urah	0,15	0,001
87	U. M.	ob sprejemu	0,12	0,012
88		po 6 urah	0,21	0,001
89		po 24 urah	0,26	0,055
90		po 24 urah	0,14	0,001
91	S. M.	ob sprejemu	0,23	0,0109
92		po 24 urah	0,15	0,002
93		po 48 urah	0,11	0,001
94		po 72 urah	0,23	0,011
95	P. R.	ob sprejemu	0,72	0,097
96		po 6 urah	0,15	0,009
97		po 12 urah	0,15	0,007
98		po 24 urah	0,14	0,004
99	V. J.	ob sprejemu	0,86	0,157
100		po 6 urah	0,3	0,098
101		po 12 urah	0,35	0,077

102		po 24 urah	0,34	0,102
103		po 48 urah	0,22	0,009
104		po 72 urah	0,28	0,01
105	K. B.	ob sprejemu	1,4	0,44
106		po 6 urah	0,9	0,164
107		po 12 urah	0,56	0,1
108		po 24 urah	0,29	0,041
109		po 72 urah	0,16	0,001
110	S.I.	ob sprejemu	1,29	0,12
111		po 6 urah	0,49	0,05
112		po 12 urah	0,51	0,07
113		po 24 urah	0,45	0,05
114		po 48 urah	0,3	0,03
115		po 72 urah	0,14	0,01
116	M. D.	ob sprejemu	1,85	0,225
117		po 6 urah	1,1	0,113
118		po 12 urah	1,17	0,105
119	V. V.	ob sprejemu	0,77	0,126
120		po 6 urah	0,72	0,098
121		po 24 urah	204	18
122		po 48 urah	1,56	0,104
123	J. I.	ob sprejemu	7,22	0,68
124		po 6 urah	3,91	0,42
125		po 12 urah	16,8	1,619
126		po 24 urah	12,4	1,128
127		po 48 urah	4,78	0,987
128		po 72 urah	8,85	0,852
129	M. A.	ob sprejemu	0,31	0,01