

Univerza v Ljubljani

Fakulteta za farmacijo



NATAŠA JANČAR

**SPREMLJANJE BIOOZNAČEVALCEV IN OCENE GLOMERULNE
FILTRACIJE PRI BOLNIKI Z LEVKOARAIOSI**

MONITORING OF BIOMARKERS AND ASSESSMENT OF GLOMERULAR
FILTRATION IN PATIENTS WITH LEUKOARAIOSIS

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo sem opravljala na KIKKB v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana pod mentorstvom izr. prof. dr. Milana Skitka, spec. med. biokemije in somentorstvom dr. Aleša Jerina, spec. med. biokemije.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala po vodstvu mentorja izr. prof. dr. Milana Skitka, spec. med. biokemije.

Ljubljana, april 2013

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in vzpodbudne besede pri izdelavi magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Milanu Skitku, spec. med. biokemije in somentorju dr. Alešu Jerinu, spec. med. biokemije.

Zahvaljujem se tudi Stanki Cankar za pomoč in vodenje pri izvajanju laboratorijskega dela, posebno zahvalo namenjam sodelavki Ani Mariji Kosednar.

Izjemno zahvalo sem dolžna tudi staršem, sestri ter nenazadnje moji dragi hčerki Juliji, ki so mi tekom študija nesebično stali ob strani in mi pomagali.

Zahvala tudi vsem tistim, ki so kakorkoli bili del mojega študentskega življenja.

POVZETEK

Demenca je poznana že skoraj dve tisočletji. Najbolj pogosta je Alzheimerjeva bolezen, sledijo pa ji vaskularne demence, kamor spada levkoaraioza. Levkoaraiozo označujejo s slikovnimi preiskavami ugotovljene difuzne spremembe bele možganovine pri starejših osebah z dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni. Levkoaraioza tako predstavlja dejavnik tveganja za možgansko kap in demenco. Vnetni procesi v povezavi s starostjo so povezani s spremembami v možganih. Patofiziologija ni docela pojasnjena, teorija se navezuje na moteno delovanje endotelija.

V naši raziskavi smo preučevali levkoaraiozo iz vidika laboratorijskih biooznačevalcev kot so interlevkin-6, C-reaktivni protein visoke občutljivosti, dejavnik tumorske nekroze- α , homocistein, kreatinin, oceno glomerularne filtracije po CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation) formuli ter endotelin. V našo raziskavo je bilo vključenih 34 bolnikov z levkoaraiozo in 23 bolnikov brez levkoaraioze, vendar z dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni. Interlevkin-6, C-reaktivni protein visoke občutljivosti ter dejavnik tumorske nekroze - α v serumu smo določali z kemiluminiscenčno imunometrično metodo, koncentracijo endotelina z encimsko imunsko metodo (ELISA), homocistein v serumu z imunološko tehniko polarizacije fluorescence (FPIA), kreatinin v serumu spektrofotometrično, ter izračunali oceno glomerularne filtracije po CKD-EPI formuli.

Pri obeh skupinah smo primerjali biooznačevalce vnetja (interlevkin-6, C-reaktivni protein visoke občutljivosti), endotelijskih/aterosklerotičnih sprememb (dejavnik tumorske nekroze- α , homocistein, endotelin) in ledvične funkcije (kreatinin, oceno glomerularne filtracije po CKD-EPI). Ugotovili smo, da statistično značilne razlike koncentracij daje le kreatinin ($p=0,035$) in da so biooznačevalci ledvične funkcije pomemben napovedni dejavnik za levkoaraiozo. Diagnostično zanesljivost preučevanega kreatinina smo ocenili s pomočjo površine pod krivuljo ROC. Določili smo različne mejne vrednosti in izračunali občutljivost in specifičnost. V sklopu biooznačevalcev ledvične funkcije bi bilo smiselno določiti še kak novejši označevalec, npr. serumski cistatin. Ostali biooznačevalci niso dali statistično značilnih razlik. Podobne raziskave so redke in rezultati raziskav so si nasprotujoči. Morda bi večje število bolnikov lahko dalo statistično značilne razlike tudi v primeru ocene glomerularne filtracije po CKD-EPI in C-reaktivnega proteina visoke občutljivosti. Zaradi majhnega števila bolnikov bi bilo potrebno v prihodnje študijo razširiti na večje število

bolnikov. Posledično lahko zaključimo, da je vzorec bolnikov vsekakor premajhen za dokončne zaključke.

ABSTRACT

Dementia has been known for almost two thousand years. The most common is Alzheimer's disease, followed by vascular dementias, including leukoaraiosis. Leukoaraiosis is characterised by diffuse changes in the white brain matter established by imaging techniques in elderly persons with risk factors of cerebrovascular diseases. Leukoaraiosis is therefore a risk factor of stroke and dementia. Inflammatory processes related to ageing are associated with changes in the brain. The pathophysiology has not been fully understood, but the theory suggests that the functioning of the endothelium is impaired.

Our study investigated leukoaraiosis from the aspect of laboratory biomarkers such as interleukin-6, high sensitivity C-reactive protein, Tumor Necrosis Factor- α , homocystein, creatinine, glomerular filtration rate (CKD-EPI - Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation) and Endothelin-1. The study included 34 patients with leukoaraiosis and 23 patients without leukoaraiosis who had risk factors of cerebrovascular diseases. Serum interleukin-6, high sensitivity C-reactive protein and Tumor Necrosis Factor- α were determined by the chemiluminiscent immunometric method, Endothelin-1 levels were measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), serum levels of homocystein with fluorescent polarization immunoassay (FPIA), serum creatinine was determined spectrophotometrically, and glomerular filtration rate was calculated according to the CKD-EPI equation.

In both groups, inflammatory biomarkers (interleukin-6, high sensitivity C-reactive protein), biomarkers of endothelial/atherosclerotic changes (Tumor Necrosis Factor- α , homocystein, Endothelin-1) and renal function biomarkers creatinine, glomerular filtration rate (CKD-EPI) were determined. Only the creatinine levels ($p=0.035$) demonstrated statistically significant changes, while renal function biomarkers proved to be an important prognostic factor of leukoaraiosis. The diagnostic reliability of the investigated creatinine was assessed using the area under the ROC (receiver operating curve). Different limit values were determined, and the sensitivity and specificity were calculated. It would have been reasonable to measure an additional, newer renal function biomarker, such as serum cysteine. Other biomarkers demonstrated no statistically significant changes. Similar studies are rare and their results are conflicting. A higher number of patients might have provided statistical differences also for glomerular filtration rate (CKD-EPI) and high sensitivity C-reactive protein. Due to the

small number of patients in the present study, further research should include more patients. Consequently, the patient sample was insufficient to draw any final conclusions.

SEZNAM OKRAJŠAV

CKD-EPI	formula za izračun glomerulne filtracije (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation)
CT	računalniška tomografija
CŽS	centralni živčni sistem
EDHF	endotelijsko odvisni dilatator
ET-1	endotelin
ELISA	encimsko-immunska metoda
FPIA	imunološka tehnika polarizacije fluorescence (fluorescent polarization immunoassay)
GC/LC	plinska kromatografija v povezavi z tekočinsko kromatografijo
GC/MS	plinska kromatografija v povezavi s masno spektrometrijo
GF	glomerulna filtracija
GMC	gladkomišične celice
HCY	homocistein
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
hs-CRP	c –reaktivni protein visoke občutljivosti
IDMS	izotopna dilucijska masna spektrometrija
IL-1	interlevkin 1
IL-6	interlevkin 6
IZ	interval zaupanja
K/DOQI	smernice Ameriškega nefrološkega združenja (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation)

KLB	kronična ledvična bolezen
KR	kreatinin
LA	levkoaraiioza
MDRD	formula za izračun glomerulne filtracije (Modification of Diet in Renal Disease)
MR	magnetna resonanca
MŽB	možgansko žilne bolezni
NIST SRM 967	sekundarni referenčni material za kreatinin
NO	dušikov oksid
OR	razmerje obetov
ORV	orientacijske referentne vrednosti
PGI ₂	prostaglandini
RIA	izotop radioimunska metoda
ROC	površina pod krivuljo
SAA	serumski amiloid A
SD	standardna deviacija
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa
VKP	vaskularna kognitivna prizadetost

KAZALO

1. UVOD	1
1.1 DEMENCA	1
1.1.1 DEFINICIJA.....	1
1.1.2 STADIJI DEMENCE	1
1.1.3 RAZVRSTITEV DEMENCE IN VZROKI	2
1.1.3.1 VASKULARNA (ŽILNA) DEMENCA.....	2
1.2 ANATOMIJA MOŽGANOV	3
1.3 LEVKOARAIIOZA.....	4
1.3.1 PATOFIZIOLOGIJA LEVKOARAIIOZE.....	5
1.3.2 ENDOTELIJSKA DISFUNKCIJA	5
1.3.3 ELASTIČNE ZNAČILNOSTI ARTERIJ	6
1.4 LABORATORIJSKAMEDICINA	6
1.4.1 IN-VIVO: OSNOVE MAGNETNE RESONANCE	6
1.4.2 IN-VITRO: DOLOČANJE BIOOZNAČEVALCEV ENDOTELIJSKE DISFUNKCIJE, VNETJA IN LEDVIČNE FUNKCIJE.....	8
1.4.2.1 C-REAKTIVNI PROTEIN VISOKE OBCUTLJIVOSTI hs-CRP (high sensitive C- reactive protein).....	8
1.4.2.2 HOMOCISTEIN	9
1.4.2.3 INTERLEVKIN-6.....	10
1.4.2.4 DEJAVNIK TUMORSKE NEKROZE- α	11
1.4.2.5 ENDOTELIN.....	11
1.5 KRONIČNA LEDVIČNA BOLEZEN IN LEVKOARAIIOZA.....	12
1.5.1 KREATININ	13
1.5.2 OCENA GLOMERULNE FILTRACIJE	14
1.5.3 CKD-EPI ENAČBA	15
2 NAMEN NALOGE.....	16

3	EKSPERIMENTALNI DEL	17
3.1	MATERIAL ZA ANALIZO	17
3.2	METODE DOLOČANJA	18
3.2.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE hs-CRP, IL-6 in TNF- α	19
3.2.1.1	DOLOČANJE hs-CRP.....	19
3.2.1.1.1	Reagenti, kalibratorji, kontrole.....	19
3.2.1.1.2	Princip metode.....	20
3.2.1.1.3	Stabilnost vzorca	20
3.2.1.1.4	Podajanje rezultatov	20
3.2.1.1.5	Merilno območje	20
3.2.1.1.6	Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle	20
3.2.1.2	DOLOČANJE IL-6.....	21
3.2.1.2.1	Reagenti, kalibratorji, kontrole.....	21
3.2.1.2.2	Princip metode.....	21
3.2.1.2.3	Stabilnost vzorca	22
3.2.1.2.4	Podajanje rezultatov	22
3.2.1.2.5	Merilno območje	22
3.2.1.2.6	Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle	22
3.2.1.3	DOLOČANJE TNF- α	22
3.2.1.3.1	Reagenti, kalibratorji, kontrole.....	22
3.2.1.3.2	Princip metode.....	23
3.2.1.3.3	Stabilnost vzorca	23
3.2.1.3.4	Podajanje rezultatov	23
3.2.1.3.5	Merilno območje	23
3.2.1.3.6	Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle	24
3.2.2	DOLOČANJE KONCENTRACIJE ENDOTELINA.....	24
3.2.2.1	DOLOČANJE ET-1	24

3.2.2.1.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole.....	24
3.2.2.1.2. Princip metode.....	25
3.2.2.1.3 Stabilnost vzorca	27
3.2.2.1.4. Podajanje rezultatov	27
3.2.2.1.5. Merilno območje	27
3.2.2.1.6. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle	27
3.2.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE HOMOCISTEINA.....	27
3.2.3.1 DOLOČANJE HOMOCISTEINA (HCY).....	27
3.2.3.1.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole.....	27
3.2.3.1.2 Princip metode.....	28
3.2.3.1.3. Stabilnost vzorca	28
3.2.3.1.4. Podajanje rezultatov	29
3.2.3.1.5. Merilno območje	29
3.2.3.1.6. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle	29
3.2.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE KREATININA.....	29
3.2.4.1. DOLOČANJE KREATININA (KR).....	29
3.2.4.1.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole.....	29
3.2.4.1.2. Princip metode.....	30
3.2.4.1.3. Stabilnost vzorca	30
3.2.4.1.4. Podajanje rezultatov	30
3.2.4.1.5. Merilno območje	30
3.2.4.1.6. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle	30
3.2.5 IZRAČUN OCENE GLOMERULNE FILTRACIJE PO CKD-EPI FORMULI	31
3.3 STATISTIČNA ANALIZA.....	31
4 REZULTATI.....	32
5 RAZPRAVA.....	35
6 ZAKLJUČKI	43

7	LITERATURA IN VIRI.....	44
----------	--------------------------------	-----------

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Trenutna klasifikacija kronične ledvične bolezni (KLB), smernice K/DOQI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation).....	13
Preglednica II: 34 preiskovancev iz skupine A z izmerjenimi biooznačevalci (hs-CRP, IL-6, ET-1, HCY, TNF- α , KR ter oGF (CKD-EPI) in z potrjeno LA.....	32
Preglednica III: 23 preiskovancev iz skupine B z izmerjenimi biooznačevalci (hs-CRP, IL-6, ET-1, HCY, TNF- α , KR ter oGF (CKD-EPI) in brez potrjene LA.....	33
Preglednica IV: Primerjava dveh skupin bolnikov na biooznačevalce: hsCRP, IL-6, ET-1, HCY, TNF α , KR in o-GF/CKD-EPI (povprečna vrednost-X, mediana-M).....	34

SEZNAM SLIK

Slika 1: Vodoravni prerez možganov.....	3
Slika 2: Philips, 1,5 T Achieva, Eindhoven, Nizozemska.....	7
Slika 3: Tipične slike Levkoaraoze.....	7
Slika 4: Potek dela na mikrotitrski plošči.....	26

1. UVOD

Spreminjanje zunanosti in notranosti je življenjski proces živih bitij, ki je neizogiben in mu pravimo staranje. Proces staranja bi naj bil čimbolj normalen in brez večjih sprememb (1). Kolo življenja se namreč vrti za vse in ko bo prišel naš čas, ne glede na to kako daleč v prihodnosti je to, si bomo vsi želeli, da bi živeli človeka vredno življenje (2). Žal vedno ni tako. S staranjem lahko nastopijo različne bolezni, ena od njih je zagotovo demenca (3).

1.1 DEMENCA

Demenca je bolezen in pomeni upadanje razuma oz. duha, izhaja pa iz latinščine (4). Približno dvatisoč let nazaj je bila demenca prvič opisana. Danes je demenca v velikem porastu saj se starostna doba podaljšuje, posledično pa predstavlja velik problem tako za človeka, družbo in tudi za zdravstvo (5). V Sloveniji naj bi bilo okrog 25.000 bolnikov z demenco. Demenca je praviloma bolezen starostnikov, vedno več pa je bolnikov, ki so mlajši od 50 let in so zboleli in žal je to število iz leta v leto večje (6).

1.1.1 DEFINICIJA

V 10. mednarodni klasifikaciji bolezni (MKB-10) je demenca (F00-F03) opredeljena kot sindrom, ki ga povzroča možganska bolezen, običajno kronične ali napredujoče narave. Vključuje motnje mnogih višjih živčnih dejavnosti, kot so spomin, mišljenje, orientacija, razumevanje, računanje, sposobnost učenja, sposobnost besednega izražanja in presoja (5).

1.1.2 STADIJI DEMENCE

V prvem, zgodnjem stadiju demence opazimo spremembe kot so: motnje spomina, pozabljanje in spremembe v razpoloženju. Običajno se začne z blago motnjo pozornosti, ko različni predmeti in glasovi spremenijo pozornost pacienta. V ospredju so pozabljivost in čustveni umik, pogosto tudi depresivnost. Osebe z demenco postopoma izgubijo voljo do dela, so žalostne, otopele in apatične.

V drugem, srednjem stadiju demence bolezen napreduje in osebe z demenco imajo več težav s krajevno in časovno orientacijo, sposobnost komunikacije in razumevanja je težja. Motnje postanejo tako moteče, da jih ni več mogoče spregledati. Dnevne aktivnosti pacienti vse težje opravljajo. Časovno razvrščanje dogodkov postane praktično nemogoče. Motnje se stopnjujejo do te mere, da se osebe izgubijo v domačem okolju, odtavajo in ne najdejo poti nazaj domov. V domačem okolju se ne znajdejo več.

V zadnjem stadiju nastopi huda oblika demence, ko so osebe zelo ranljive in zelo majhna je sposobnost samooskrbe, komunikacija postane nemogoča, pojavijo se motnje pri izločanju, večino časa prespijo in ne prepoznajo niti najbližjih. V tej fazi bolezni pacienti ne zmorejo več presojati, so povsem nemočni in redkobesedni, pomnijo samo še nekaj fraz, našega govora ne razumejo in ne zmorejo odgovoriti. Vse bolj se umikajo vase, v svoj svet in postanejo povsem odvisni od drugih. Potrebujejo stalen nadzor in zaradi povečane potrebe po zdravstveni negi pogosto namestitev v dom (7).

1.1.3 RAZVRSTITEV DEMENCE IN VZROKI

Demenca je lahko posledica različnih vzrokov, po nekaterih podatkih jih je več kot dvesto, delimo pa jo na primarne in sekundarne. 85% vseh demenc je primarnih, sekundarne obsegajo le 15% vseh demenc. Najbolj običajna pa tudi najbolj pogosta oblika primarne demence je Alzheimerjeva bolezen, ki predstavlja okrog 50-70% primerov, pravimo ji tudi degenerativna demenca, kjer gre za postopno propadanje živčnih celic in zvečano količino amiloida. Sledijo ji vaskularne demence, demenca z Lewyjevim telescem, Pickova bolezen ter reverzibilne in druge demence (8,9).

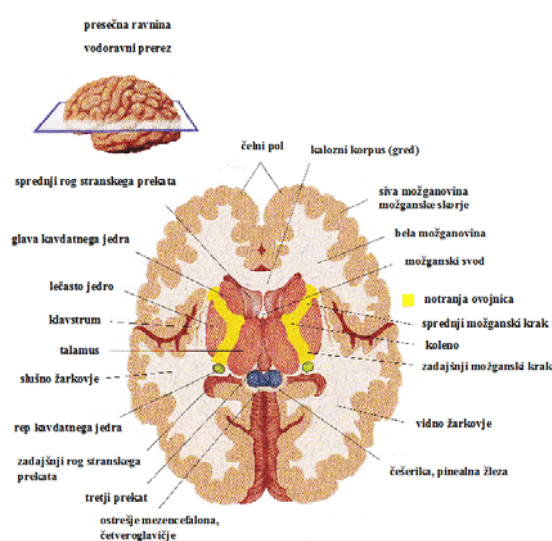
1.1.3.1 VASKULARNA (ŽILNA) DEMENCA

Žilna demenca spada med primarne demence in je posledica motenj v prekrvavitvi možganov. Pogosto je povezana z možgansko kapjo, lahko pa se pojavi ob prisotnosti drugih možganskožilnih bolezni. Vaskularna oz. žilna demenca je skupek različnih sindromov, ki jim je skupen upad spoznavnih sposobnosti ob prisotnosti možganskožilnih bolezni in dejavnikov tveganja za možganskožilne bolezni. Žilno demenco delimo v več podtipov, eden od njih je vaskularna levkopatija z demenco ali levkoaraijoza. Žilna demenca je bolezen, ki jo je mogoče upočasniti z zdravim načinom življenja in zdravljenjem dejavnikov tveganja s

pomočjo kirurškega zdravljenja, antiagregacijske oz. antikoagulantne zaščite, žal pa je preprečiti ne moremo (10).

1.2 ANATOMIJA MOŽGANOV

Možgani so najobsežnejši in najbolj razviti del centralnega živčevja (11). Izpolnjujejo lobanjsko votlino in pri odraslem človeku tehtajo 1300-1500 gr., to je 50-krat več kot hrbtni mozeg. Na možgane je pri človeku vezana večina živčnih funkcij. Možgani nimajo nobene zaloge kisika in glukoze, zato premajhen dotok krvi povzroči nepopravljivo poškodbo tkiva. Možgane sestavljajo možgansko deblo, mali in veliki možgani (12). Možgansko deblo je nadaljevanje hrbtenjače in ji je po zgradbi in pomenu tudi močno podobno. Mali možgani ležijo v zadajšnji lobanjski kotanji. Imajo močno nagubano skorjo, ki je iz celic in je zato sive barve, notranjost, ki jo sestavljajo živčne proge, pa je bele barve (11). Veliki možgani vsebujejo večino možganskih celic in so najpomembnejša krmilna enota možganov, hkrati so tudi najobsežnejši del centralnega živčevja. Delimo jih na diencefalon in telencefalon. Diencefalon je sestavljen predvsem iz sive substance (osrednja – centralna jedra). Telencefalon obsega možganski polobli – hemisferi. Hemisferi sta sestavljeni iz sive in bele snovi. Siva je zbrana na površini kot možganska skorja in v notranjosti kot možganska jedra. Preostalo maso hemisfer sestavlja bela masa. Obsežno belo snov hemisfer sestavlja živčno nitje, ki poteka v različnih smereh. V notranjosti možganov so štiri votline-možganski precati oziroma ventrikli. Skozi prekate kroži mezgovna tekočina- cerebrospinalni likvor (12).



Slika 1: Vodoravni prerez možganov

1.3 LEVKOARIAIOZA

Patofiziološke spremembe bele možganovine, ki so posledica motenj v možganskem pretoku imenujemo vaskularna levkopatija z demenco oz. levkoaraioza. Slikanje z magnetno resonanco prikaže spremembe v beli možganovini bolje od računalniške tomografije (10). Z nevroradiološkimi tehnikami lahko dokažemo okvaro bele možganovine kot posledico pretočnih motenj v majhnih arterijah, in ima številne dejavnike tveganja za ishemično možgansko kap, kar posledično lahko vodi v demenco (13). Beseda izhaja iz grščine (leuko-belo, araios- razredčen) in so jo prvič uporabili leta 1987 za opis spremenjene subkortikalne bele možganovine na CTmožganov (14).

Levkoaraioza označuje s slikovnimi preiskavami ugotovljene difuzne spremembe bele možganovine pri starejših osebah z dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni. Pogostnost LA narašča značilno z starostjo, tako da pred 50. letom znaša le nekaj odstotkov, nato pa narašča z vsakim desetletjem za dva do trikrat (15). LA predstavlja dejavnik tveganja za možgansko kap in demenco. Po 60. letu kar šestina prebivalcev zboli za demenco in šestina prebivalcev utрпи možgansko kap, skupaj pa demenca in možganska kap prizadeneta kar tretjino ljudi (16). Bolnik z demenco je od tuje pomoči odvisen, težak bolnik ob tem pa predstavlja tudi veliko finančno breme za zdravstvo. Pri bolnikih z LA pogosto opazamo kognitivni upad, motnje hoje in pogoste padce (15), ki lahko prizadenejo posameznike, še aktivno vključene v delovni proces. Vaskularna kognitivna prizadetost se kaže z motenimi izvršitvenimi funkcijami in upočasnjeno miselnimi procesi (17). Pri LA čedalje pogosteje izpostavljajo pridružene motnje razpoloženja, predvsem apatijo in depresijo (18,19). Približno 80% bolnikov z LA ima motnje hoje, ki so odvisne od stopnje napredovalosti LA (20), ne pa od starosti, spola, predhodnih možganskih kapi in arterijske hipertenzije (21). Zdi se, da so motnje hoje pri LA povezane z atrofijo čelnega režnja in spremembami bele možganovine, ki privedejo do prekinitve povezav z notranjim delom čelnega režnja (15). Številne raziskave podpirajo povezavo med LA in motnjami hoje s pogostimi padci pri starejših osebah, kar prispeva k pogostim poškodbam in bolnišnični obravnavi (22). Od drugih kliničnih znakov z LA je potrebno omeniti nezmožnost kontrole sečnega mehurja (15). LA je povezana z dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni, kot je arterijska hipertenzija (23). Slednja je povezana z motenim delovanjem sistemskega žilnega endotelija (24). Poleg tega je LA dejavnik tveganja za nastanek lakunarne možganske kapi, ki je posledica okvare malih

možganskih arterij (25). Lakunarna kap naj bi bila povezana z okvaro delovanja sistemskega žilnega endotelija (26).

1.3.1 PATOFIZIOLOGIJA LEVKOARAIIOZE

Patofiziologija LA ni docela pojasnjena. Pri LA so z različnimi metodami ugotavljali zmanjšan pretok v beli možganovini (ishemična teorija). Glavna težava je razlikovanje med hipoperfuzijo in sekundarnim zmanjšanjem krvnega pretoka zaradi zmanjšane delovanja, kljub delujoči živčnožilni sklopitvi. Zato je težko trditi, ali je zmanjšan krvni pretok vzrok ali posledica okvare tkiva (27). Z novimi slikovnimi metodami so namreč ugotovili pomembne spremembe integritete bele možganovine, ki je videti na sekvencah T2 normalna (28). Strukturno popolnoma normalna bela možganovina torej še ne pomeni, da tudi normalno deluje in tako obstaja možnost, da je možganski krvni pretok zmanjšan sekundarno. Po drugi teoriji okvara krvno-možganske pregrade povzroči okvaro bele možganovine zaradi toksičnih učinkov serumskih beljakovin. Pri bolnikih z LA so v beli možganovini ugotovili ekstravazacijo serumskih beljakovin, kot so IgG, komplement in fibrinogen. Najdba je sovpadala z vzorcem LA (29). To kaže, da bi lahko bila okvara bele možganovine mesto, kjer pušča krvno-možganska pregrada (30). Magnetnoresonančna tomografija glave s kontrastnim sredstvom je pokazala zmanjšane integritete krvno-možganske pregrade, kar je bilo povezano s stopnjo izraženosti LA (31). Še več, v nedavno objavljeni raziskavi se je izkazalo, da je prepustnost krvno-možganske pregrade, povečana pri bolnikih z LA tudi v tistih predelih možganov, ki ne kažejo znakov LA (32). Teoriji o zmanjšanjem krvnem pretoku v beli možganovini in okvarah krvno-možganske pregrade si sicer nasprotujeta, vendar bi ju bilo mogoče povezati ravno preko motenega delovanja endotelija. Motnja v delovanju endotelija privede do okvare krvno-možganske pregrade, motene avtoregulacije krvno-možganske pregrade in protrombotičnih sprememb (33).

1.3.2 ENDOTELIJSKA DISFUNKCIJA

Endotelij je pomemben endokrini organ. Sprošča številne vazoaktivne, protiagregacijske, antiproliferativne ter druge dejavnike. Motena funkcija endotelija je pomemben dejavnik v razvoju ateroskleroze. Zgodnji znaki motene funkcije endotelija so motnje v uravnavanju

žilnega tonusa. V ožjem smislu besede gre za moteno tvorbo in sproščanje NO, v širšem smislu besede pa tudi motnjo sproščanja endotelinov (34).

1.3.3 ELASTIČNE ZNAČILNOSTI ARTERIJ

V preteklih letih se je pokazalo, da imajo spremenjene elastične lastnosti arterij neodvisno vlogo pri nastanku možganskožilnih bolezni. Žilje mora s svojim raztezanjem skrbeti za neprestan pretok krvi skozi tkiva. Posebna zgradba žilne stene z gladkimi mišičnimi celicami ter posebno urejenimi vlakni elastina in kolagena omogoča fiziološko nelinearno povečevanje elastičnosti in blaženje pulzirajočega pretoka. Predvsem ob staranju, različnih vnetnih in drugih procesih, pri katerih pride do preoblikovanja vlaken zaradi aktiviranja signalnih poti ter posledičnega aktiviranja metaloproteaz ter hipertrofije kolagenskih vlaken, se poveča togost in zmanjša podajnost predvsem elastičnosti arterij. Z uporabo doplerskih in drugih metod lahko izmerimo različne indekse arterijske podajnosti, ki so se pokazali kot napovedni dejavniki pri ishemični možganski kapi. Povečana togost elastičnih karotidnih arterij je pomemben dejavnik tveganja in posledično možen povzročitelj ishemičnih dogodkov, ki se pri slikanju z magnetno resonanco na T2 (spinsko-spinski relaksacijski čas)- obteženih slikah kažejo kot levkoaraijoza (35).

1.4 LABORATORIJSKA MEDICINA

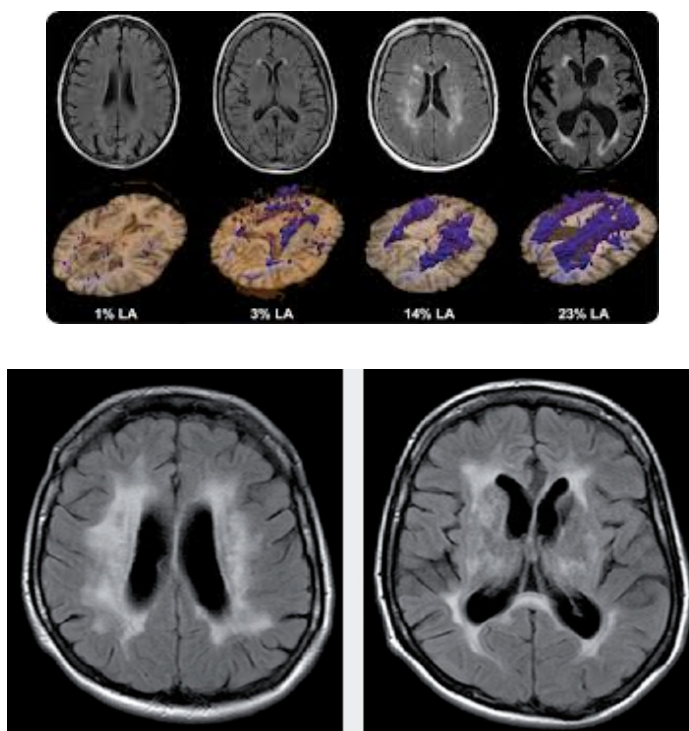
1.4.1 IN-VIVO: OSNOVE MAGNETNE RESONANCE

Magnetna resonanca (MR) je ena od najsodobnejših diagnostičnih metod, ki omogoča zelo dober vpogled v strukturo posameznih organov. Metoda temelji na principu odklona protonov na njihovi krožnici, potem ko je tkivo postavljeno v močno magnetno polje in njihovega vračanja v izhodiščni položaj po izključitvi magnetnega polja. Pri takšnem zanihanju protonov se sprosti določena energija v obliki elektromagnetnih valov. Ta energija daje signal- svetlost. Tkiva, ki vsebujejo več vode, se prikažejo z intenzivnejšim signalom (svetlejša), kostne strukture in patološke kalcifikacije pa se manifestirajo s slabim signalom (temnejša) (36). Z MR lahko prikažemo okvare bele možganovine že, ko so te še majhne in v začetnih obdobjih razvoja. Stopnjo LA pri slikovnih preiskavah določamo s pomočjo vidnih stopenjskih lestvic (Fazekasova lestvica). Novejše MR slikovne tehnike lahko razlikujejo

svežo LA od LA starejšega datuma (37). Magnetno resonančno slikanje daje oceno razširjenosti in lokalizacije lezij.



Slika 2: Philips, 1,5 T Achieva, Eindhoven, Nizozemska



Slika 3: Tipične slike Levkoaraioze

1.4.2 IN-VITRO: DOLOČANJE BIOOZNAČEVALCEV ENDOTELIJSKE DISFUNKCIJE, VNETJA IN LEDVIČNE FUNKCIJE

Ob aktivaciji in okvari endotelija se v kri v povečanih količinah sproščajo nekatere molekule, ki jih lahko določamo laboratorijsko, med njimi medcelično adhezijsko molekulo 1 (ICAM 1), trombomodulin (TM), tkivni faktor (TF), in inhibitor tkivnega faktorja (TFPI) (33). Kot kazalnike disfunkcije endotelija omenjajo z lipoproteini povezano fosfolipazo A2 (Lp-PLA2), mieloperoksidazo (MPO) in visokoobčutljivo C-reaktivno beljakovino (hs-CRP) (38). Med markerje okvare endotelija sodijo tudi faktor tumorske nekroze alfa (TNF α), interleukin-6 (IL-6) ter endotelin (ET-1) (39). Vnetje v žilni steni očitno igra pomembno vlogo v nastanku in napredovanju LA (40). Asimetrični dimetilarginin (ADMA) je kot cirkulirajoči endogeni zaviralec NO vpleten v moteno delovanje endotelija, še posebej ob pridruženih hiperhomocist(e)inemiji, njegove koncentracije pa korelirajo s stopnjo LA (41). Hiperhomocisteinemija je neodvisni dejavnik tveganja za LA, homocistein pa toksičen za endotelij (42). Zadnje raziskave omenjajo vlogo endotelijskih zarodnih celic, ki so vpletene v popravo endotelija. Poseben fenotip haptoglobina (fenotip 1-1) je bil povezan z zmanjšano zmožnostjo endotelija za popravo okvar (43).

V magistrski nalogi smo se osredotočili zgolj na spodaj opisane laboratorijske parametre.

1.4.2.1 C-REAKTIVNI PROTEIN VISOKE OBČUTLJIVOSTI hs-CRP (high sensitive C-reactive protein)

Človeški C-reaktivni protein (CRP) je serumska beljakovina, mol. m. 105 kD, sestavljena iz pet istovetnih polipeptidnih enot, nekovalentno urejenih v ciklični pentamer. Spada v skupino plazemskih beljakovin, imenovanih pentraksini, ki so povsem nesorodni z drugimi znanimi proteini (44). CRP je eden najbolj, če ne kar najbolj občutljiv reaktant akutne faze. Protein se veže na lipide in vezan aktivira sistem komplementa, ki sproži vnetje, opsonizacijo in fagocitozo na CRP vezanih ostankih celic ali bakterij. Sinteza CRP poteka v jetrih, ki se po vnetju zelo hitro poveča. Povišano serumsko koncentracijo CRP pa lahko določimo do 6 ur po vnetju. Zaradi svoje specifičnosti, občutljivosti in možnosti merjenja z različnimi metodami, je CRP verjetno najbolj uporaben za določanje odgovora akutne faze. Povišanje koncentracije

CRP je pokazatelj vnetja, malignih tumorjev in ostalih malignih bolezni. Nizka stopnja vnetja je prepoznana kot pomembna značilnost ateroskleroze, pri kateri je pozornost usmerjena na CRP kot analizo tveganja za srčno žilne primere. Prav tako je pri nizki stopnji vnetja koncentracija CRP pogosto pod mejo določenih normalnih vrednosti. Za C-reaktivni protein visoke občutljivosti (hs-CRP) so morali razširiti merilna območja za dva velikostna razreda nižje kot so meje normalnih vrednosti. Koncentracija CRP pri zdravih ljudeh je običajno pod 8 mg /L. Povišane koncentracije CRP so jasen dokaz za vnetje. Serumske koncentracije pod 5 mg/L imajo prognostični pomen pri kardiovaskularnih boleznih (45). Poznan je vpliv bioloških sprememb na hs-CRP, kot so starost, telesna masa, hormonsko nadomestno zdravljenje ter kajenje in v glavnem vsi povečujejo vrednosti hs-CRP (46). V člankih avtorji opisujejo, da posameznih razlik v hs-CRP med moškimi in ženskami niso opazili. Ta razlika med spoloma je bila potrjena z dvema občutljivima metodama in sicer z nefelometrično in turbidimetrično metodo (47). Hs-CRP je dober pokazatelj vnetja in srčno žilnih bolezni. Med kazalci vnetja je hs-CRP najprimernejši za uporabo v klinični praksi. Najpogosteje uporabljane metode za določanje so: nefelometrija, turbidimetrija, spektrofotometrija, kemiluminiscenčna imunometrična metoda, radialna imunodifuzija in druge (48).

1.4.2.2 HOMOCISTEIN

Homocistein (HCY) je tiolna aminokislina, ki sodeluje pri metabolizmu metionina. HCY nastaja intracelularno, kot intermediat v metabolizmu metionina. HCY se izloča predvsem preko ledvic. Skoraj v celoti se reabsorbira v tubulih in oksidativno katabolizira v CO₂ in sulfate. Tako se le 1% filtriranega homocisteina izloči z urinom. Reducirani HCY ima zelo aktivno prosto tiolno skupino, ki je dovzetna za avtooksidacijo pri fiziološkem pH. Na ta način oblikuje disulfidne vezi med dvema molekulama. V plazmi obstaja le majhen delež HCY (1-2%) v prosti reducirani obliki, preostali del pa je v obliki dveh disulfidov, kot homocistin ali mešani disulfid. Homocistin nastane z vezavo dveh molekul homocisteina, mešani disulfid pa z vezavo homocisteina na cistein. Okoli 70-90% ga je vezanega na plazemske proteine, predvsem na albumine. Koncentracija celotnega HCY v plazmi ali serumu je vsota koncentracij vseh treh oblik (49). Zmerna hiperhomocisteinemija je spoznana kot dejavnik tveganja za žilne bolezni. Številne študije so pokazale povezavo med hiperhomocisteinemijo in srčno žilnim tveganjem. Hiperhomocisteinemija predstavlja 10% vsega srčno žilnega tveganja in povečuje nagnjenje k strjevanju krvi. Domnevajo, da so žilne

poškodbe, ki jih sproži HCY, posledica oksidativnega stresa. Na presnovo HCY vplivajo zdravila, bolezni, fiziološke spremenljivke in življenjske navade. Pomanjkanje folne kisline je najpogostejši vzrok hiperhomocisteinemije. Osebam z velikim tveganjem je zato smiselno izmeriti koncentracijo HCY in jo znižati, če je previsoka (50). Poznanih je več vrst metod, s katerimi lahko določamo koncentracijo HCY. To so: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), encimske metode s kolorimetrično detekcijo (ELISA), plinska kromatografija v povezavi z masno spektrometrijo (GS/MS) ter imunološke metode s spektrometrično in fluorescenčno polarizacijsko detekcijo (FPIA)(49).

1.4.2.3 INTERLEVKIN-6

Interlevkin-6 (IL-6) je glikoprotein, sestavljen iz 184 aminokislin z molekulsko maso med 21,5 in 30 kD. IL-6 je citokin, ki ga izločajo imunske celice kot odgovor na vnetni dražljaj. Sprošča se kot odziv na infekcije ali poškodbe, opažen je tudi pri ljudeh s prekomerno telesno maso ali imunskimi ter metabolnimi boleznimi. Vnetje je potreben in prvoten odziv, vendar ko postane vnetje kronično, nastopijo težave, zato je dobro zmanjševati koncentracijo tega citokina. IL-6 je citokin z imunomodulativnimi učinki, katerega glavni vir so celice, ki neposredno sodelujejo pri imunskem odzivu. IL-6 sodeluje pri aktivaciji vnetnih celic, v jetrih pa stimulira sintezo in sproščanje proteinov akutne faze, predvsem CRP in fibrinogena. Raziskave kažejo, da se raven IL-6 v obtoku med telesno aktivnostjo poveča tudi do 100-krat, torej se izloča tudi iz skeletnih mišic. Je izrazit pleiotropni citokin, kar pomeni, da ima v različnih celicah različne učinke (51,52). IL-6 je multifunkcionalen citokin, ki ni vpleten le v imunski odziv, ampak tudi v vnetje, hematopoezo, presnovo kosti in uravnavanje delovanja živčnega sistema. IL-6 je dobro znan dejavnik tveganja za srčno žilne bolezni, povezane z debelostjo, sladkorno boleznijo tipa 2 in miokardnim infarktom. Količina IL-6 je tudi samostojen pokazatelj subkliničnih aterosklerotičnih lezij in napovedni dejavnik za ishemične dogodke (53,54). Najpogosteje uporabljene metode za določanje IL-6 so: izotop-radioimunski test (RIA), encim-encimskoimunski test (ELISA) ter izoluminol-kemiluminiscenčni test (55).

1.4.2.4 DEJAVNIK TUMORSKE NEKROZE- α

Dejavnik tumorske nekroze - α (TNF- α) je pleiotropni citokin, ki kot del kompleksnega citokinskega sistema uravnava sintezo in ekspresijo drugih citokinov in njihovih receptorjev prek aktivacije citokinskih kaskad. TNF- α je eden glavnih mediatorjev akutnega vnetnega odgovora. Prvič so TNF- α prepoznali kot substanco, ki se je po obdelavi miši z bakterijskim lipopolisaharidom (endotoksinom) pojavila v serumu teh živali, kar je povzročilo nekrozo tumorjev in vivo. Glavni vir TNF- α v krvi so aktivirani mononuklearni fagociti, torej nevtrofilci, krvni monociti in različne celice mononuklearnega fagocitnega sistema, ki so porazdeljene povsod po telesu. Od številnih učinkov TNF- α je sorazmerno dobro raziskano njegovo delovanje med vnetno reakcijo. Glavna vloga TNF- α v tem procesu je privlačenje nevtrofilcev in monocitov na mesto okužbe in aktivacija celic za opravljanje naloge odstranitve mikrobov. TNF- α posreduje ta učinek preko različnih mehanizmov na celice žilnega endotelija in levkocite. Delovanje TNF- α na endotelij in levkocite je ključno za lokalni vnetni odgovor na okužbo z mikrobi. Poleg sodelovanja TNF- α v lokalnih vnetnih reakcijah so njegovi učinki znani tudi pri reakcijah, ki so škodljive za organizem, npr. pri avtoimunskih boleznih. Za določanje TNF- α so najpogostejše uporabljene tri metode: izotop-radioimunski test (RIA), encim-encimskoimunski test (ELISA) ter izoluminol-kemiluminiscenčni test (56).

1.4.2.5 ENDOTELIN

V zadnjih desetletjih se je razkrila pomembnost vazomotorne vloge endotelija. Endotelin (ET-1) je peptid, ki ga sintetizirajo endotelijske celice. Je najmočnejši, doslej znani vazokonstriktor. Deluje na endotelijske celice in gladke mišice žilne stene, poleg vazokonstriktornega ima tudi mitogeni in protrombotični učinek. Endotelini (ET) so družina vazoaktivnih peptidov, ki vključuje tri 21-aminokislinske izoformne oligopeptide, endotelin-1 (ET-1), endotelin-2 (ET-2), endotelin-3 (ET-3) ter novo odkriti endotelin-4 (ET-4). ET-1 je glavna oblika ET v žilah. Za njegovo tvorbo je odgovoren predvsem endotelij. Številni faktorji vplivajo na tvorbo in sproščanje ET-1. V človeškem genomu so identificirali tri receptorske podtipе s specifično afiniteto do endotelinov, in sicer receptorje tipa A (ET_A), tipa

B (ET_B) in tipa C (ET_C). ET_B lahko po občutljivosti za blokatorje in mestu nahajanja razdelimo na dva podtipa, ET_{B1} in ET_{B2} . ET_A in ET_B sta prisotna v stenah žil. ET_A se nahaja predvsem v gladkomišičnih celicah (GMC), ET_B pa v celicah endotelija ter v manjši meri tudi v GMC nekaterih žil. Oba sta prisotna tudi v drugih tkivih in CŽS. ET-1 v možganih lahko preko ET_A receptorjev povzroča močno konstrikcijo večjih in manjših možganskih žil, preko ET_B receptorjev pa dilatacijo. V patofizioloških pogojih ta sistem ne deluje, kar prispeva k žilni disfunkciji ter posledično možganski poškodbi. Endotelini lahko sproščajo ali krčijo GMC, njihov končni učinek je odvisen od receptorja, na katerega se vežejo. Z vezavo na ET_A , ki se nahaja v GMC, delujejo ET neodvisno od endotelija. Povsem drugačen učinek imajo ET_{B1} receptorji. Nahajajo se na celicah endotelija in so soudeleženi pri sproščanju vazodilatatornih snovi, kot so dušikov oksid (NO), prostaglandini (PGI_2), in endotelijsko odvisni dilatator (EDHF), ki so odgovorni za končno, od endotelija odvisno sproščanje GMC. Za določanje ET-1 uporabljamo imunokemijske metode, to so precipitacijske metode (dvojna imunodifuzija, imunoelektroforeza), radioimunske metode ter encimskoimunske metode, ki se tudi najpogosteje uporabljajo (57,58).

1.5 KRONIČNA LEDVIČNA BOLEZEN IN LEVKOARAIIOZA

Kronična ledvična bolezen (KLB) je pogost zdravstveni problem in je lahko posledica ledvične patologije, neledvične bolezni ali kombinacije obeh. KLB se pogosto odkrije sočasno s srčnožilnimi boleznimi in sladkorno boleznijo ter jo obravnavamo kot samostojen dejavnik tveganja za smrt ter srčnožilne bolezni. Pri večini bolnikov KLB ne napreduje do končne ledvične odpovedi, ker le-ti umrejo prej zaradi različnih vzrokov, zlasti srčnožilnih dogodkov. Zato postaja čim zgodnejša diagnoza KLB vse pomembnejša in daje priložnost upočasnitve ledvične insuficience ter hkrati preprečevanja zapletov. Med najbolj ogrožene skupine bolnikov, ki zbolijo za KLB, sodijo bolniki s sladkorno boleznijo, arterijsko hipertenzijo in osebe po 60. letu starosti. V zavesti ljudi so prisotnost in zapleti KLB še vedno premalo poznani, vsaj deloma zaradi svoje dokaj neme klinične slike. KLB je običajno asimptomatska v zgodnjih fazah, pogosto pa celo do 4. stopnje. Niso pa asimptomatski srčnožilni zapleti bolnikov s KLB, ki se neredko pojavljajo že v zgodnejših fazah KLB. Ti zapleti so tudi pripomogli k dejstvu, da je KLB samostojni in neodvisni dejavnik tveganja za srčnožilne

bolezni. Bolniki s KLB imajo kar 10-20x večje tveganje za srčnožilne dogodke v primerjavi z ostalo populacijo. KLB delimo na pet stopenj po kliničnih smernicah Ameriškega nefrološkega združenja (K/DOQI smernice) (59,60).

Preglednica I: Trenutna klasifikacija kronične ledvične bolezni(KLB), smernice K/DOQI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation).

STOPNJA	OPIS	GF (mL/min/1.73 m ²)
1	Ledvična okvara z normalno ali ↑ GF	>90
2	Ledvična okvara z blago ↓ GF	60 – 89
3	Zmerno ↓ GF	30 – 59
4	Hudo ↓ GF	15 – 29
5	Ledvična odpoved	<15 ali dializa

↑ GF- povišana glomerularna filtracija, ↓ GF- znižana glomerularna filtracija

1.5.1 KREATININ

Za oceno glomerulne filtracije (oGF) se v vsakdanji praksi običajno uporablja serumska koncentracija kreatinina (KR). KR v telesu nastaja kot presnovni produkt kreatina in fosfokreatina v mišičnem tkivu. Koncentracija KR v serumu je odvisna od mišične mase, spola in starosti, vendar je relativno stalna. Na nivo koncentracije KR v serumu v manjši meri vpliva tudi prehrana (predvsem beljakovinska). Ocena GF s pomočjo serumskega KR je povezana tudi z laboratorijskim določanjem le-tega. Določamo ga v reakciji z alkalnim pikratom, z encimskimi reakcijami ali kromatografskimi metodami. Plinska oziroma tekočinska kromatografija (GC/LC) z izotopno dilucijsko masno spektrometrijo (IDMS) služi kot referentna metoda in se uporablja v omejenem številu specializiranih laboratorijev. To so metode za določanje prave koncentracije KR, saj se odlikujejo z odlično specifičnostjo in občutljivostjo (sd<0,3%). Določanje KR v reakciji z alkalnim pikratom (Jaffe metoda) najpogosteje uporabljamo v rutinskih laboratorijih. Mnoge endogene in eksogene snovi reagirajo s pikratom, interferirajoče snovi določimo v prebitku od 15 do 25%, zato je metoda slabo specifična. Na osnovi primerjave velikega števila določitev KR z encimsko metodo je možno uporabljati t.i. kompenzirano Jaffejevo metodo. Bistvo te kompenzacije je v matematičnem odštevanju stalne koncentracije KR (21- 26 μmol /L) od izmerjene koncentracije KR v celotnem merskem območju. Zaradi slabe specifičnosti je standardizacija KR postala nujno potrebna. Ključni vpliv na standardizacijo določitve KR ima izdelava in implementacija sekundarnega referenčnega materiala NIST SRM 967. Pripravljen je v dveh

koncentracijskih območjih (približno 67 in 346 $\mu\text{mol/L}$ kreatinina) in je primerljiv z naravnimi vzorci. Sekundarni referenčni material je na razpolago proizvajalcem laboratorijske opreme in reagentov in omogoča sledljivost njihovih metod do IDMS. Serumska koncentracija KR je glede na vse omenjeno predvsem v začetnih fazah KLB slab pokazatelj ledvičnega delovanja. Očistek kreatinina je sicer boljši pokazatelj GF kot serumska koncentracija kreatinina, vendar zahteva 24-urno zbiranje seča, ki pogosto ni zanesljivo (otroci, starostniki).

1.5.2 OCENA GLOMERULNE FILTRACIJE

Glomerulno filtracijo (GF) določata ravnotežje hidrostatskih in koloidno osmotskih sil, ki delujejo na kapilarno membrano glomerulov ter kapilarni filtracijski količnik, produkt prepustnosti in filtracijske površine kapilar glomerula. Temeljna metoda za oceno GF je določitev očistka neke snovi. To je prostornina plazme, ki se v določeni časovni enoti očisti te snovi z izločanjem v seč. Očistek tako predstavlja zmožnost ledvic, da odstranijo določeno snov iz plazme in jo izločijo s sečem. Zlati standard za oceno GF je očistek od zunaj v telo vnesenih (eksogenih) substanc, kot so inulin, ioheksol ter radioizotopov ($^{51}\text{CrEDTA}$, $^{99\text{m}}\text{TcDTPA}$ in ^{125}I -iothalamate). Težava pri uporabi teh sredstev je njihova aplikacija, zbiranje seča, cena, pri radiofarmakih pa še dejstvo, da gre za radioizotopni označevalec in ga zato priistem bolniku ni možno pogosto uporabiti. S sprejetjem K/DOQI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation) smernic so enačbe oz. formule postale pomembne. Najpogostejši enačbi za oceno GF pri odraslih sta Cockcroft-Gaultova enačba in skrajšana enačba MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) raziskave, za otroke in mladostnike pa Schwartzova enačba. V praksi se uporablja poenostavljena (skrajšana) enačba MDRD, ki od določenih laboratorijskih parametrov vključuje le vrednosti serumskega kreatinina, GF pa je podana na standardizirano telesno površino $1,73\text{ m}^2$. Z oceno GF z enačbami lahko sicer do neke mere izničimo nekatere slabosti ocene GF, ki izvirajo iz serumskega kreatinina. Seveda pa imajo tudi formule svoje pomanjkljivosti. Največja je prav gotovo v nespecifičnosti rutinskih metod določanja kreatinina (Jaffe metoda). Prav tako je znano, da ocene niso potrjene pri dovolj velikem številu bolnikov v posameznih stopnjah KLB. Njihova dodatna slabost je tudi v dejstvu, da izhajajo iz raziskav v katere so vključeni ambulantni (nehospitalizirani) bolniki z določenimi antropometričnimi in demografskimi značilnostmi. Danes laboratoriji sporočijo oceno GF avtomatsko hkrati z izmerjeno koncentracijo

serumskega kreatinina. National Kidney Disease Education Program (NKDEP) priporoča poročanje ocene GF z numerično vrednostjo pri ocenjeni hitrosti GF pod 60 ml/min/1,73m², višje vrednosti pa kot oceno GF nad 60 ml/min/1,73m². To so povzele tudi številne smernice v različnih državah. Slabost je, da tako ne moremo ločiti stopnje 1 in stopnje 2 KLB (61).

1.5.3 CKD-EPI ENAČBA

V zadnjem času se pojavljajo tudi nove, izpopolnjene enačbe, ki vsebujejo serumski kreatinin, večinoma upoštevajo že predhodno objavljene podatke različnih raziskav, najbolj znana je CKD-EPI enačba (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation). S pomočjo teh enačb želijo zmanjšati omejitve, ki izvirajo iz MDRD enačbe(61).

Prebivalstvo se stara, zato potrebujemo novo enačbo za izračun GF pri tej skupini prebivalstva. Zlati standard za oGF je drag in zapleten, zato je bil cilj razviti novo formulo, ki bo boljša od MDRD enačbe. Prvič je bila CKD-EPI enačba objavljena v reviji Annals of Internal Medicine. Za izboljšanje natančnosti MDRD formule pri vrednostih >60 mL/min/1,73m² je bila v letu 2009 razvita novejša formula s katero naj bi se zmanjšalo število postavljenih diagnoz ledvičnih obolenj, ki so posledica napačno izračunanih oGF z MDRD formulo. Enačba CKD-EPI vsebuje iste spremenljivke kot MDRD, to je v bistvu spremenjena različica MDRD.

Predvsem pri starejših se je v številnih študijah pokazalo, da so izračuni za GF z CKD-EPI enačbo bolj zanesljivi in natančni. CKD-EPI enačba je spremenila krivulje po starosti. Višje so vrednosti pri mlajših starostnih skupinah in izrazit je upad GF s staranjem. S to izboljšano enačbo bi se v prihodnje lahko izognili tudi dodatnim nepotrebnim testom ali celo bolnišnični oskrbi v smislu dodatnih preiskav.

Poznane so formule za belo in črno raso. 4 različne formule za belo raso se uporabljajo za moške in ženske pri dveh različnih koncentracijah kreatinina (62).

ženske s S-krea < 62 µmol/L: $\text{oGFR [mL/min/1,73m}^2] = 144 * (\text{S-krea}/61,6)^{-0,329} * (0,993)^{\text{starost}}$

ženske s S-krea > 62 µmol/L: $\text{oGFR [mL/min/1,73m}^2] = 144 * (\text{S-krea}/61,6)^{-1,209} * (0,993)^{\text{starost}}$

moški s S-krea <80 µmol/L: $\text{oGFR [mL/min/1,73m}^2] = 141 * (\text{S-krea}/79,2)^{-0,411} * (0,993)^{\text{starost}}$

moški s S-krea >80 µmol/L: $\text{oGFR [mL/min/1,73m}^2] = 141 * (\text{S-krea}/79,2)^{-1,209} * (0,993)^{\text{starost}}$

2 NAMEN NALOGE

Poglavitni namen magistrske naloge je preučevanje levkoaraioze iz vidika laboratorijskih biooznačevalcev, kot so interleukin-6, C-reaktivni protein visoke občutljivosti, dejavnik tumorske nekroze- α , homocistein, kreatinin, ocena glomerularne filtracije po CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation) formuli ter endotelin.

Okvara bele možganovine je posledica pretočnih motenj v majhnih arterijah in predstavlja dejavnik tveganja za ishemično možgansko kap, kar posledično lahko vodi v demenco. Levkoaraiosa(LA) je povezana z dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni (arterijska hipertenzija, sladkorna bolezen, kajenje, hiperholesterolemija,...), dejavniki tveganja pa z motenim delovanjem žilnega endotelija. Ob aktivaciji in okvari endotelija se v kri v povečanih količinah sproščajo nekatere molekule, ki jih lahko določamo laboratorijsko.

V ta namen smo:

- Pri 57 preiskovancih (33 preiskovancev iz skupine A z potrjeno LA in 24 preiskovancev iz skupine B brez potrjene LA, vendar z dejavniki tveganja za MŽB) smo izmerili koncentracijo IL-6, hs-CRP, TNF- α in HCY, KR, ET-1 ter izračunali GF po CKD-EPI formuli.

Hipoteza: Obstaja značilna razlika v vrednostih biooznačevalcev endotelija, vnetja in ledvične funkcije med skupinama preiskovancev s potrjeno LA in brez potrjene LA.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIAL ZA ANALIZO

V raziskavo smo vključili 57 preiskovancev obeh spolov, starih od 41 do 74 let. Preiskovance smo razdelili v dve skupini. Skupina A je vključevala preiskovance z znaki levkoaraioze na MR glave, ter skupina B, ki je vključevala preiskovance z dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni, vendar brez znakov levkoaraioze na MR glave.

Preiskovanci iz skupine A so bolniki, ki se zdravijo v nevroloških ambulantah, Nevrološke klinike, UKC Ljubljana. Vsi preiskovanci so bili pred vstopom v študijo nevrološko pregledani, opravili so MR glave (Philips, 1,5 T Achieva, Eindhoven, Nizozemska), laboratorijske preiskave, EKG in dvojno doplersko ultrazvočno preiskavo vratnih arterij. Torej pogoj za vstop v skupino A je bila potrjena LA na MR glave.

Preiskovance iz skupine B smo vključili v študijo s pomočjo splošnih zdravnikov in internistov. Preiskovanci so po spolu, starosti in dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni ustrezali preiskovancem iz skupine A, ob tem pa niso imeli potrjene LA na MR glave. Tudi preiskovanci iz skupine B so bili nevrološko pregledani, opravili so MR glave, laboratorijske preiskave, EKG in dvojno doplersko ultrazvočno preiskavo vratnih arterij.

Preiskovance iz skupine A in iz skupine B je pregledala ista oseba. Preiskovanci so bili seznanjeni z namenom raziskave in so s podpisom potrdili prostovoljno udeležbo. Pri izvedbi raziskave so bila upoštevana načela Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku, določila Konvencije Sveta Evrope o varovanju človekovih pravic in dostojanstva človeškega bitja v zvezi z uporabo biologije in medicine (Oviedska konvencija) in načelo slovenskega Kodeksa medicinske deontologije. K predlogu za raziskavo je bilo pridobljeno tudi mnenje Republiške komisije za medicinsko etiko.

Vzorci seruma so bili odvzeti po priporočenih postopkih za venski odvzem v vacutainersko epruveto Vacutube® z rdečim zamaškom (laboratorijska diagnostika Burnik). Kri je bila centrifugirana 15 minut pri 3000 obratih. Serum je bil ločen od koaguluma in do analize zamrznjen pri -20°C . V serumskih vzorcih smo izmerili koncentracijo IL-6, hs-CRP, TNF- α , HCY, KR in ET-1 ter izračunali oGF po CKD-EPI formuli.

Vse ostale potrebne podatke o preiskovancih smo pridobili v sodelovanju z Nevrološko kliniko, UKC Ljubljana.

3.2 METODE DOLOČANJA

Vse laboratorijske preiskave smo opravili na KIKKB, UKC Ljubljana. KIKKB dela skladno s standardom ISO 15189 in je pridobil dovoljenje za delo.

Dober laboratorijski test mora biti zanesljiv in točen ter z visoko občutljivostjo in specifičnostjo. Diagnostično vrednost vsakega testa podajamo s specifičnostjo, občutljivostjo, napovedno vrednostjo in učinkovitostjo.

Diagnostična specifičnost je število »pravilno negativnih« (RN) rezultatov v skupini preiskovancev, ki so zdravi in imajo neki rezultat, ki je »pravilno negativen« ali »lažno pozitiven« (LP).

Diagnostična občutljivost je število »pravilno pozitivnih« (RP) rezultatov v skupini preiskovancev z neko boleznijo, ne glede na to ali je test to pokazal ali ne, torej predstavlja skupino »pravilno pozitivnih« in »lažno negativnih« (LN).

Pozitivna napovedna vrednost testa napoveduje, koliko oseb z neko boleznijo bo s tem testom imelo pozitiven rezultat. Negativna napovedna vrednost testa pomeni, koliko oseb, ki nimajo obolenja bo imelo negativen rezultat.

Učinkovitost testa (ujemanje) se nanaša na število vseh pravih rezultatov.

Formule za izračun (63):

- Specifičnost (%) = $(RN / (RN + LP)) \times 100$
- Občutljivost (%) = $(RP / (RP + LN)) \times 100$
- Učinkovitost (%) = $((RP + RN) / (RP + RN + LP + LN)) \times 100$

3.2.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE hs-CRP, IL-6 in TNF- α

V Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev smo določali koncentracijo hs-CRP, IL-6 in TNF- α . Vse tri laboratorijske parametre smo določali na avtomatiziranem analizatorju IMMULITE DPC, Siemens Medical Solutions Diagnostic, ki temelji na principu kemiluminiscenčne imunometrične metode.

3.2.1.1 DOLOČANJE hs-CRP

3.2.1.1.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole

- testne enote s pritrjenimi anti-ligandi
- raztopina anti-hs CRP poliklonalnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo in z ligandom označena anti-hs CRP monoklonalna protitelesa
- kalibrator 1 in 2 (Low in High)
- kontrolni serum I,II,III (L,M,H)
- raztopina za redčenje vzorcev
- raztopina kemiluminiscenčnega substrata
- raztopina za spiranje
- nosilci za vzorce s črtno kodo
- plastične kivete

Vsi reagenti so iz kompletov Siemens: Chemiluminescent Substrate (kat. št. LSUBX), Probe Wash Module (kat.št. LPWS2), Probe Cleaning Kit (kat.št. LKPM), Sample Cup Holders (kat. št. LCHx-y), Sample Cups (kat.št.LSCP), Tri-level CRP Control Module (kat.št. LCRCM) in High Sensitivity CRP (kat.št. LKCRP1).

3.2.1.1.2 Princip metode

Na trden nosilec je vezan anti-ligand, v reagentu je raztopina anti-hs CRP poliklonalnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo in z ligandom označeno anti-hs CRP monoklonalno protitelo. Hs CRP iz vzorca reagira z dvojnimi protitelesi, pri čemer nastanejo imunski kompleksi. Nevezane snovi odstranimo in imunskim kompleksom dodamo substrat, konjugiran z izoluminolom. Alkalna fosfataza razgradi substrat, pri čemer pride do kemiluminiscence. Intenziteta kemiluminiscence je premosorazmerna s koncentracijo hs CRP v vzorcu.

3.2.1.1.3 Stabilnost vzorca

- 3dni na 2-8 °C ali
- 2 meseca na -20 °C

3.2.1.1.4 Podajanje rezultatov

Rezultate podajamo v mg/L.

3.2.1.1.5 Merilno območje

Merilno območje metode je od 0,3-100 mg/L.

3.2.1.1.6 Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle

ORV za hs-CRP: do 1,4 mg/L (64).

3.2.1.2 DOLOČANJE IL-6

3.2.1.2.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole

- testne enote s pritrjenimi anti-IL-6 monoklonalnimi protitelesi
- raztopina anti-IL-6 poliklonalnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo
- kalibrator 1 in 2 (Low in High)
- kontrolni serum I,II
- raztopina kemiluminiscenčnega substrata
- raztopina za spiranje
- nosilci za vzorce s črtno kodo
- plastične kivete

Vsi reagenti so iz kompletov Siemens: Chemiluminescent Substrate (kat. št. LSUBX), Probe Wash Module (kat.št. LPWS2), Probe Cleaning Kit (kat.št. LKPM), Sample Cup Holders (kat. št. LCHx-y), Sample Cups (kat.št.LSCP), A bi-level, human serum-based IMMULITE Cytokine Control Module containing IL-6 (kat.št. LILCM), in IL-6 (kat.št. LK6P1).

3.2.1.2.2. Princip metode

Na trden nosilec so vezana anti-IL-6 monoklonalna protitelesa, v reagentu je raztopina anti-IL-6 poliklonalnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo. IL-6 iz vzorca reagira z dvojnimi protitelesi, pri čemer nastanejo imunski kompleksi. Nevezane snovi odstranimo in imunskim kompleksom dodamo substrat, konjugiran z izoluminolom. Alkalna fosfataza razgradi substrat, pri čemer pride do kemiluminiscence. Intenziteta kemiluminiscence je premosorazmerna s koncentracijo IL-6 v vzorcu.

3.2.1.2.3. Stabilnost vzorca

- 1 dan na 2–8 °C ali
- 6 mesecev na -20 °C

3.2.1.2.4. Podajanje rezultatov

Rezultate podajamo v ng/L.

3.2.1.2.5. Merilno območje

Merilno območje metode ni navedeno.

3.2.1.2.6. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle

ORV za IL-6: v navodilih proizvajalca referenčne vrednosti niso podane, navajajo, da si jih vsak laboratorij določi sam. Pričakovane vrednosti so do 3,5 ng/L (65).

3.2.1.3 DOLOČANJE TNF- α

3.2.1.3.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole

- testne enote s pritrjenimi anti-TNF- α monoklonalnimi protitelesi
- raztopina anti-TNF- α poliklonalnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo
- kalibrator 1 in 2 (Low in High)
- kontrolni serum I,II
- raztopina kemiluminiscenčnega substrata
- raztopina za spiranje

- nosilci za vzorce s črtno kodo
- plastične kivete

Vsi reagenti so iz kompletov Siemens: Chemiluminescent Substrate (kat. št. LSUBX), Probe Wash Module (kat.št. LPWS2), Probe Cleaning Kit (kat.št. LKPM), Sample Cup Holders (kat. št. LCHx-y), Sample Cups (kat.št.LSCP), IMMULITE Cytokine Control Module (bi-level, human serum-based) (kat.št. LILCM) in TNF- α (kat. št. LKNF1).

3.2.1.3.2. Princip metode

Na trden nosilec so vezana anti-TNF- α monoklonalna protitelesa, v reagentu je raztopina anti-TNF- α poliklonalnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo. TNF- α iz vzorca reagira z dvojnimi protitelesi, pri čemer nastanejo imunski kompleksi. Nevezane snovi odstranimo in imunskim kompleksom dodamo substrat, konjugiran z izoluminolom. Alkalna fosfataza razgradi substrat, pri čemer pride do kemiluminiscence. Intenziteta kemiluminiscence je premosorazmerna s koncentracijo TNF- α v vzorcu.

3.2.1.3.3 .Stabilnost vzorca

- 2 dni na 2-8°C ali
- 6 mesecev na -20 °C

3.2.1.3.4. Podajanje rezultatov

Rezultate podajamo v ng/L.

3.2.1.3.5. Merilno območje

Merilno območje metode ni navedeno.

3.2.1.3.6. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle

ORV za TNF- α : v navodilih proizvajalca referenčne vrednosti niso podane, navajajo, da si jih vsak laboratorij določi sam. Pričakovane vrednosti so do 8,0 ng/L (66).

3.2.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE ENDOTELINA

V Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev smo določali koncentracijo ET-1. Za določanje koncentracije ET-1 smo uporabili encimsko imunski test, imenovan ELISA. Absorbanco obarvanega produkta reakcije smo izmerili na spektrofotometru Personal Lab (Adaltis).

3.2.2.1 DOLOČANJE ET-1

3.2.2.1.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole

- Endothelin-1 Microplate - polistirenske mikrotitrne plošče, prevlečene s podganjimi monoklonskimi protitelesi proti ET-1
- Endothelin-1 Conjugate – mišja monoklonska protitelesa proti ET-1 konjugirana s hrenovo peroksidazo
- Endothelin-1 Standard - liofiliziran sintezni ET-1 v humani plazmi
- Assay Diluent RD1 – 105 – raztopina za redčenje
- Calibrator Diluent RD5-48 Concentrate - kalibrator
- Wash Buffer Concentrate – pufer za izpiranje
- Color Reagent A - substrat
- Color Reagent B - substrat

- Stop Solution – raztopina za zaustavitev reakcije
- Endothelin – 1 Controls - kontrola

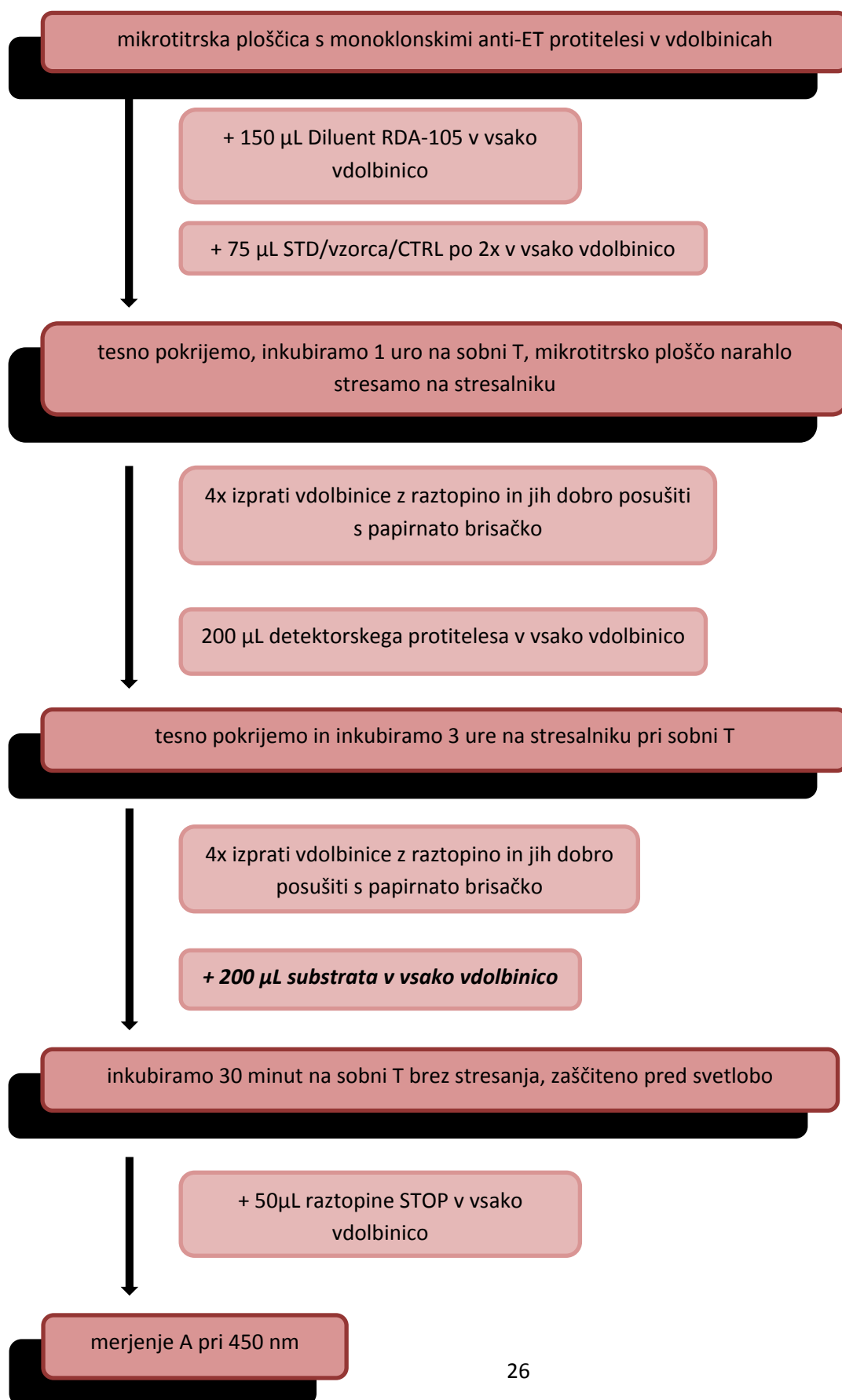
Pred izvedbo testa se pripravi ustrezne raztopine po navodilih proizvajalca.

Vsi reagenti so iz kompletov Pharm Pak (R&D SYSTEMS[®] Catalog # PDET 100) Endothelin-1 Quantikine ELISA Kit.

3.2.2.1.2. Princip metode

Kvantitativno določevanje antigena, ki ima več epitopov, lahko izvedemo z t.i. metodo sendvič ELISA. Uporabljamo dve različni monoklonski protitelesi, specifični za antigen, na katerem prepoznata dva različna epitopa. Imunska reakcija poteka v dveh stopnjah – najprej v vdolbinico mikrotitrne plošče neposredno vežemo prvo specifično protitelo, ki v izbranem vzorcu selektivno veže le antigen, ki nas zanima. Nevezana protitelesa speremo in dodamo vzorec, ki vsebuje antigen. Protitelo z veliko afiniteto do antigena prispeva k boljši občutljivosti testa. Ko antigen reagira z vezanimi protitelesi, speremo vdolbinico in dodamo z encimom konjugirano sekundarno protitelo, ki je specifično za drug epitop na antigenu – pustimo da reagira z vezanim antigenom in nato speremo nevezano sekundarno protitelo. Sledi dodatek substrata in nastanek obarvanega produkta reakcije, kateremu merimo absorbanco (450 nm) s spektrofotometrom.

Slika 4: Potek dela na mikrotitrski plošči



3.2.2.1.3 Stabilnost vzorca

- ni navedeno

3.2.2.1.4. Podajanje rezultatov

Rezultate podajamo v ng/L.

3.2.2.1.5. Merilno območje

Merilno območje metode je od 0,39 - 25,0 ng/L.

3.2.2.1.6. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle

ORV za ET-1: do 2,0 ng/L (67).

3.2.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE HOMOCISTEINA

V Laboratoriju za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil smo določali koncentracijo homocisteina v serumu. Homocistein smo določali na avtomatiziranem analizatorju AXSYM, proizvajalca Abbott, ki temelji na principu imunološke tehnike polarizacije fluorescence (FPIA- fluorescent polarization immunoassay).

3.2.3.1 DOLOČANJE HOMOCISTEINA (HCY)

3.2.3.1.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole

- reagenčna kartuša vsebuje:
 1. označevalec S-adenosyl-L-cysteine Fluorescein v fosfatnem pufru s proteinskim stabilizatorjem

2. rekombinantne S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase v fosfatnem pufru s proteinskim stabilizatorjem

3. mišja monoklonska protitelesa Anti-S-adenosyl-L-homocystein v fosfatnem pufru s proteinskim stabilizatorjem

4. raztopina predreakcijske mešanice, ki vsebuje dithiothreitol in adenzin v citratni kislini

- kalibrator (A-F)
- kontrole I,II,III (L, M, H)
- probe cleaning solution
- solution 4 line diluent
- reakcijske posodice

Vsi reagenti so iz kompletov AxSYM: Homocystein Reagent Pack 100 Tests (5F51-20), Homocysteine Calibrators (9F84-01), Homocysteine Controls (9F84-10), Probe Cleaning Solution (9A35-05), Solution 4 Line Diluent (8A46).

3.2.3.1.2 Princip metode

Vezani homocistein (oksidirana oblika) se reducira do prostega homocisteina, ki se s pomočjo encimske reakcije s SAH hidrolazo ob dodatku adenozina hidrolizira do SAH (S-adenosyl-L-homocystein).

3.2.3.1.3. Stabilnost vzorca

- 2 tedna na 2-8 °C ali

- 8 mesecev na -20 °C

3.2.3.1.4. Podajanje rezultatov

Rezultate podajamo v $\mu\text{mol/L}$.

3.2.3.1.5. Merilno območje

Merilno območje metode je do 48,7 $\mu\text{mol/L}$.

3.2.3.1.6. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle

ORV za HCY: od 5-15 $\mu\text{mol/L}$ (68).

3.2.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE KREATININA

Koncentracijo kreatinina smo določali v 24-urnem laboratoriju. Meritve so potekale na popolnoma avtomatiziranem selektivnem biokemičnem analizatorju Advia 1800 (Siemens), ki temelji na principu spektrofotometrije.

3.2.4.1. DOLOČANJE KREATININA (KR)

3.2.4.1.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole

- Creatinine
- Bayer Chemistry Calibrator
- Lypho. Assyed Chemistry L1
- Lypho. Assyed Chemistry L2

Reagenti in kalibratorji so iz kompletov Siemens: Creatinine (kat. št. 03039070), Bayer Chemistry Calibrator (kat.št.09784096). Kontrole so iz kompleta Bio Rad: Lypho. Assyed Chemistry L1 (kat.št.c-310-5), Lypho. Assyed Chemistry L2 (kat. št C-315-5).

3.2.4.1.2. Princip metode

Jaffejeva reakcija

Kreatinin reagira s pikrinsko kislino v alkalnem mediju, nastali rdeče obarvan kompleks merimo pri 505/575 nm. Ta reakcija ni specifična, ker lahko pikrinska kislina reagira še z drugimi substancami seruma. Ta Jaffejeva metoda je modificirana tako, da se s korelacijo slepe (vpliv bilirubina) in vrednosti intersepta (nespecifične interakcije proteinov) temu vplivu izognemo. Interference : ikterični vzorci ($>513\mu\text{mol/L}$), hemoliza ($>10\text{ g/L}$), lipemija ($>11,3\text{ mmol/L}$).

3.2.4.1.3. Stabilnost vzorca

- 7 dni na $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$
- nedorečeno na -20°C

3.2.4.1.4. Podajanje rezultatov

Rezultate podajamo v $\mu\text{mol/L}$.

3.2.4.1.5. Merilno območje

Merilno območje metode je od 8,84 do $2210\mu\text{mol/L}$.

3.2.4.1.6. Orientacijske referenčne vrednosti za odrasle

ORV za KR: 44 do $97\mu\text{mol/L}$ (69).

3.2.5 IZRAČUN OCENE GLOMERULNE FILTRACIJE PO CKD-EPI FORMULI

GF smo izračunali po CKD-EPI formuli (62).

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili računalniška programa Microsoft Excel (Microsoft, ZDA) in MedCalc verzija 11.4.2.0 Mariakerke, Belgija (dobljene rezultate smo primerjali z neodvisnimi t-testi oz. Mann-Whitney testom v primeru neparametrične porazdelitve rezultatov). Rezultate smo prikazali v preglednicah. Z metodo logistične regresije smo ugotavljali povezanost merjenih parametrov z LA. Krivuljo občutljivosti in specifičnosti ROC (receiver operating curve) smo naredili pri spremenljivkah, ki so bile značilno pomembne za napovedovanje LA. Dobljeni statistični rezultati so nas pripeljali do končnih ugotovitev in sklepov.

4 REZULTATI

V raziskavo je bilo vključenih 57 bolnikov obeh spolov, 23 žensk in 34 moških, starih od 41 do 74 let. Bolnike smo razdelili v dve skupini. Skupina A (34 bolnikov, 22 moških, 12 žensk) je vključevala bolnike z potrjeno LA, ter skupina B (23 bolnikov, 12 moških, 11 žensk), ki je vključevala bolnike z dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni in brez potrjene LA. Vsem bolnikom smo izmerili koncentracijo hs-CRP, IL-6, ET-1, HCY, TNF- α , KR ter izračunali oGF (CKD-EPI).

Preglednica II: 34 preiskovancev iz skupine A z izmerjenimi biooznačevalci (hs-CRP, IL-6, ET-1, HCY, TNF- α , KR ter oGF (CKD-EPI) in z potrjeno LA.

Starost	Spol	hs-CRP (mg/L)	IL-6 (ng/L)	ET-1 (ng/L)	HCY (μ mol/L)	TNF- α (ng/L)	KR (μ mol/L)	oGF (CKD-EPI) (mL/min)
55	Ž	1,6	1,7	1,54	8,7	4,1	68	85,5
64	M	4,8	2,9	0,75	13,4	18,7	86	80,7
48	Ž	4,0	1,1	0,88	13,7	6,1	42	115,1
74	M	0,3	2,2	0,92	20,1	5,3	74	85,2
46	M	0,4	1,5	0,03	11,3	25,1	66	108,7
46	Ž	4,0	3,5	0,40	8,8	26,9	65	96,8
52	M	73,6	19,0	1,37	17,0	10,2	102	71,5
47	Ž	2,2	0,8	0,19	11,3	4,2	76	80,2
62	M	3,2	1,0	1,66	14,5	4,9	97	70,8
56	M	2,0	1,4	0,94	21,1	47,4	124	54,9
63	M	0,5	1,9	2,12	13,6	58,1	84	83,6
63	M	3,0	5,4	2,00	18,8	7,0	113	58,4
63	Ž	2,9	3,3	2,04	12,3	33,9	63	89,9
62	M	1,1	1,4	1,93	18,4	5,8	77	91,8
57	Ž	7,1	3,1	2,06	18,2	6,0	65	90,3
62	M	1,3	3,2	1,65	16,3	7,7	100	68,2
63	M	3,9	3,3	1,23	13,4	6,8	76	91,0
52	Ž	3,2	1,7	1,17	11,2	57,6	65	92,9
60	Ž	28,7	10,9	1,27	10,9	131,0	58	95,8
58	M	0,2	1,2	1,21	15,4	6,7	86	84,2
54	M	0,4	2,6	1,03	13,3	7,9	74	98,0
52	Ž	7,3	8,4	1,10	15,4	6,7	71	83,5
55	M	1,0	2,2	0,70	13,8	10,6	74	98,0
41	Ž	1,0	1,9	1,32	9,3	6,4	57	109,4
66	M	0,5	2,6	3,51	14,4	8,9	87	79,0
59	M	1,2	2,6	1,10	9,7	6,9	116	58,6
62	M	2,4	3,0	2,86	16,1	11,5	74	93,3
57	M	1,4	2,8	2,39	33,8	5,1	87	83,6
55	M	11,9	2,7	0,78	12,2	6,4	78	95,2
54	M	2,0	1,8	1,21	12,1	27,1	102	71,0
67	M	1,1	2,0	1,80	11,8	5,9	83	83,1
54	Ž	0,4	5,7	1,71	13,4	177,0	76	76,3
58	M	4,5	4,8	1,40	15,0	34,0	84	87,2
55	Ž	17,8	5,0	1,54	18,3	23,1	81	70,2

Preglednica III:23 preiskovancev iz skupine B z izmerjenimi biooznačevalci (hs-CRP, IL-6, ET-1, HCY, TNF- α , KR ter oGF (CKD-EPI) in brez potrjene LA.

Starost	Spol	hs-CRP (mg/L)	IL-6 (ng/L)	ET-1 (ng/L)	HCY (μ mol/L)	TNF- α (ng/L)	KR (μ mol/L)	oGF (CKD-EPI) (mL/min)
58	Ž	0,4	0,6	0,28	12,1	4,1	72	78,7
57	M	0,6	6,9	0,99	14,8	42,7	63	102,5
49	M	3,3	1,4	1,05	11,8	15,6	68	105,1
50	Ž	5,4	2,3	1,12	14,6	11,8	76	77,9
55	M	0,4	1,1	1,86	11,5	5,6	71	99,0
59	M	2,4	5,7	1,13	13,0	6,8	73	95,2
63	M	13,7	5,7	1,80	13,4	220,0	89	78,0
53	Ž	1,6	1,9	0,81	15,6	6,0	76	76,3
52	Ž	0,6	2,2	1,08	7,7	9,4	58	101,4
62	Ž	1,8	2,0	1,10	12,5	46,4	69	80,5
54	Ž	1,7	1,9	1,71	13,1	27,3	62	96,9
63	Ž	0,4	1,6	1,55	11,8	16,2	46	100,6
63	Ž	0,5	2,0	1,48	11,4	6,1	54	95,4
57	M	3,1	1,9	1,39	11,8	6,1	63	102,5
44	M	0,6	1,6	0,83	14,9	5,4	91	86,8
47	M	0,2	1,5	1,09	16,4	48,7	92	83,8
53	Ž	5,7	2,3	3,14	12,0	38,0	76	76,3
51	M	2,0	2,9	1,40	15,4	6,5	81	95,1
57	M	0,7	2,4	1,08	14,4	17,6	66	101,3
54	Ž	0,7	3,7	2,04	13,9	38,9	50	104,2
59	Ž	5,3	3,6	1,83	16,9	23,7	94	56,6
60	M	2,4	3,0	1,46	14,8	6,9	72	95,0
53	M	0,5	2,6	1,72	16,2	108,0	80	95,8

Povprečna starost moških je bila 57,8 let ($\pm$ SD = 6,3) let in žensk 54,4 ($\pm$ SD = 5,8) s statistično razliko ($p=0,050$). Povprečna starost v skupini z LA je bila 57,1 ($\pm$ SD = 6,9), v skupini brez LA pa 55,3 let ($\pm$ SD = 5,2) brez statistično značilne razlike ($p=0,295$). Vpliv spola ni bil statistično značilen pri obeh skupinah ($p=0,353$).

Pri obeh skupinah smo primerjali biooznačevalce vnetja (hs-CRP, IL-6), endotelijskih/aterosklerotičnih sprememb (ET-1, HCY, TNF α) in ledvične funkcije (KR, oGF/CKD-EPI) z neodvisnimi t-testi oz. Mann-Whitney testom v primeru neparametrične porazdelitve rezultatov (program MedCalc verzija 11.4.2.0. Mariakerke, Belgija). Diagnostično zanesljivost preučevanih biooznačevalcev smo ocenili s pomočjo površine pod krivuljo (ROC). Napovedna vrednost z logistično regresijo in ROC (receiver operating curve) analizo je bila izvedena na primeru KR s površino pod krivuljo (AUC) s 95% intervalom zaupanja (IZ) in razmerjem obetov (OR, odds ratios). Rezultate, pri katerih je bilo tveganje

statističnega sklepanja manjše od 0,05 ($p < 0,05$) smo šteli za statistično značilne. Naredili smo tudi izračun kvartilov, pri čemer nam vrednost 1. kvartila pove, da je 25% vrednosti spremenljivke nižjih in 75% vrednosti spremenljivke višjih od te koncentracije; 2. kvartil je v bistvu mediana – razdeli vzorec na dva enaka dela, tako je polovica vrednosti nižjih in polovica vrednosti višjih od te koncentracije; 3. kvartil pa pove, da je 75% vrednosti nižjih in 25% vrednosti višjih od te koncentracije.

Preglednica IV: Primerjava dveh skupin bolnikov na biooznačevalce: hsCRP, IL-6, ET-1, HCY, TNF α , KR in o-GF/CKD-EPI (povprečna vrednost-X, mediana-M).

Parameter/skupina	X ($\pm$ SD) M (Q1-Q3) Levkoaraioza -DA	X ($\pm$ SD) M (Q1-Q3) Levkoaraioza -NE	P
Hs-CRP (mg/L)	2,10 (1,00 – 4,00)	1,60 (0,53 – 2,93)	0,213
IL-6 (μ g/L)	2,60 (1,70 – 3,30)	2,20 (1,68 – 2,98)	0,500
ET-1 (μ g/L)	1,30 (0,94 – 1,80)	1,39 (1,08 – 1,72)	0,948
HCY (μ mol/L)	13,65 (11,80 – 16,30)	13,40 (11,85 – 14,88)	0,580
TNF- α (μ g/L)	7,80 (6,10 – 26,90)	15,60 (6,20 – 38,68)	0,389
KR (μ mol/L)	80,3 ($\pm$ 17,6)	71,4 ($\pm$ 13,0)	0,043
o-GF/CKD-EPI (ml/min)	84,8 ($\pm$ 14,1)	90,6 ($\pm$ 12,5)	0,112

hs-CRP= C-reaktivni protein visoke občutljivosti; IL-6=interlevkin-6; ET-1 = endotelin; HCY= homocistein; TNF- α = dejavnik tumorske nekroze- α ; KR= kreatinin; oGF/CKD-EPI =ocena glomerularne filtracije po CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation) formuli

Levkoaraiozo je z logistično regresijo neodvisno napovedal le kreatinin z OR = 1,039, $p=0,035$ in AUC = 0,651 (IZ: 0,513 – 0,772), $p=0,043$. Občutljivost in specifičnost kreatinina pri optimalni koncentraciji $\leq 73 \mu\text{mol/L}$ je 70,6% oz. 60,9%.

Pri vseh ostalih biooznačevalcih ni bilo statistično značilnih razlik, saj je bilo tveganje statističnega sklepanja večje od 0,05 ($p > 0,05$). Iz preglednice IV je razvidna vrednost p, ki je v primeru hs-CRP $p=0,213$, IL-6 $p=0,500$, ET-1 $p=0,948$, HCY $p=0,580$, TNF- α $p=0,389$ ter v primeru o-GF/CKD-EPI $p=0,112$.

5 RAZPRAVA

Demenca je poznana že skoraj dve tisočletji, zaradi podaljševanja življenjske dobe pa število bolnikov z demenco hitro narašča, kar predstavlja velik zdravstveni in družbeni problem. Z zdravim načinom življenja lahko potek demence poskušamo upočasniti, nikakor pa je ne moremo preprečiti. 8 % vseh demenc predstavlja primarna oblika demence, najbolj pogosta je Alzheimerjeva bolezen, sledijo pa ji vaskularne demence, kamor spada tudi levkoaraioza (5,8,9).

Levkoaraioza označuje spremembe bele možganovine zaradi motnje možganskega pretoka, ugotovljene s slikovnimi preiskavami (10). Pogostost LA narašča značilno s starostjo, hkrati pa predstavlja dejavnik tveganja za možgansko kap in demenco (15,16). Približno 80% bolnikov z LA ima motnje hoje, ki so odvisne od stopnje napredovalosti LA, ne pa od starosti, spola, predhodnih možganskih kapi in arterijske hipertenzije (20,21). Patofiziologija LA ni docela pojasnjena. Teoriji o zmanjšanem krvnem pretoku v beli možganovini in okvari krvno – možganske pregrade bi bilo mogoče povezati preko motenega delovanja endotelija (27,33).

Endotelij ima ključno vlogo pri regulaciji pretoka krvi. Predvsem ob staranju in različnih vnetnih procesih lahko pride do spremenjene aktivnosti endotelijskih celic, kar povzroči povečanje togosti in zmanjšanje podajnosti žilnega endotelija. Vnetje v žilni steni torej igra pomembno vlogo v nastanku in napredovanju LA (34,35). Ob aktivaciji in okvari endotelija se v kri v povečanih količinah sproščajo nekatere molekule, ki jih lahko določamo laboratorijsko (33).

V naši nalogi smo se osredotočili na določanje sedmih laboratorijskih biooznačevalcev: hs-CRP, IL-6, ET-1, HCY, TNF- α , KR in oGF/CKD-EPI.

V raziskavo je bilo vključenih 57 bolnikov, 23 žensk ter 34 moških, starih od 41 do 74 let. Bolnike smo razdelili v dve skupini. Skupina A je vključevala 34 bolnikov in vsi so imeli z MR potrjeno diagnozo LA. Skupina B je vključevala 23 bolnikov z dejavniki tveganja za možganskožilne bolezni in brez potrjene LA.

Ker je bil poglobitni namen naše naloge preučevanje levkoaraioze iz vidika laboratorijskih biooznačevalcev, smo vsem 57. bolnikom iz obeh skupin izmerili koncentracijo hs-CRP, IL-6, ET-1, HCY, TNF- α , KR in izračunali oGF po CKD-EPI formuli.

V prvem delu naloge je bil naš namen ugotoviti, kakšne bodo vrednosti merjenih biooznačevalcev. Zanimalo nas je, ali bodo izmerjene vrednosti v referenčnih mejah, ali pa bodo glede na skupine preiskovancev pričakovano povišane.

Kot eden najboljših neodvisnih pokazateljev tveganja za srčno-žilne bolezni in pomemben napovedovalec akutnih zapletov (smrti), hkrati pa kot kazalnik disfunkcije endotelija je zagotovo hs-CRP. Nizka stopnja vnetja je prepoznana kot pomembna značilnost ateroskleroze. Orientacijske referentne vrednosti za odrasle so do 1,4 mg/L. Nižje vrednosti pomenijo manjšo verjetnost subkliničnega vnetja žilnega endotelija. Vrednosti nad to mejo predstavljajo že zmerno oz. visoko tveganje za pojav ishemičnih dogodkov (45,48). Ugotovili smo, da je imelo kar 33 bolnikov zvišane vrednosti, od tega 20 iz skupine A in 12 iz skupine B. Najnižja izmerjena koncentracija hs-CRP je bila 0,2 mg/L, najvišja pa 73,6 mg/L. Tako visoka vrednost lahko kaže na izpostavljenost vnetju, ali celo oksidativnemu stresu. 5 bolnikov je imelo vrednosti večje kot 10 mg/L. V takem primeru lahko sklepamo, da gre za možnost okužbe ali vnetja in bi bilo smiselno pacienta pregledati zaradi možnosti okužbe ali vnetja in analizo čez nekaj časa ponoviti iz svežih vzorcev. Merjenje hs-CRP bi se moralo izvajati v povprečju dvakrat, priporočeno v dveh tednih razmaka na tešče. V skupini A je mediana 2,10, in v skupini B 1,60. Vrednosti v skupini A so torej za malenkost višje. Metode za določanje hs-CRP odlikujeta velika občutljivost in natančnost. Koncentracijo hsCRP smo določali s kemiluminiscenčno imunometrično metodo. To je metoda z dovolj visoko analizno občutljivostjo in mejo detekcije pod 0,3 mg/L. Trenutno še nimamo metode, ki bi predstavljala »zlati standard«, saj so koncentracije prenizke, zato hs-CRP še ni standardiziran. Smiselno je omeniti tudi omejitve v zvezi z določanjem hs-CRP. Metoda ni popolnoma avtomatizirana, zato obstaja možnost pri napaki v predpripravi vzorca (redčenje vzorca in prelivanje v ustrezne kivete).

IL-6 je dobro poznan dejavnik tveganja za nastanek srčno-žilnih bolezni. IL-6 je citokin, značilen za vnetni odziv, izločajo pa ga različne imunske celice. Vnetje je potreben in prvoten odziv, vendar ko postane kronično nastopijo težave, zato je koncentracijo IL-6 smiselno zmanjševati (51,52). Določali smo ga s kemiluminiscenčno imunometrično metodo. Metoda je dovolj visoko analizno občutljiva in natančna. Pričakovane vrednosti so do 3,5 ng/L. Najnižja izmerjena vrednost je 0,57, najvišja pa 19,0. Povišane vrednosti IL-6 je imelo le 12 preiskovancev, od tega 7 iz skupine A in 5 iz skupine B. Mediana je 2,60 pri bolnikih iz skupine A in 2,20 pri bolnikih iz skupine B. Tako IL-6 kot tudi TNF- α sta zaenkrat še

študijska markerja. V primeru IL-6 smo nekako pričakovali, da bo imelo več bolnikov povišane vrednosti. Nekateri študije navajajo, da je IL-6 verjetno pomemben pokazatelj levkoaraioze (40). TNF- α in IL-6 sta tesno povezana, saj TNF- α spodbuja produkcijo IL-6. Študije in vitro in in vivo so pokazale, da IL-6 povratno zavre produkcijo TNF- α , s tem IL-6 zaščiti tkivo preko različnih mehanizmov, vključno z inhibicijo produkcije TNF- α . Tudi TNF- α je vnetni citokin, določali smo ga z enako metodo kot IL-6 (56). Pričakovane vrednosti so do 8,0 ng/L. Najnižja izmerjena vrednost je 4,1, najvišja pa 220,0. Povišane vrednosti smo določili pri 30. bolnikih, od tega pri 16. iz skupine A (mediana je 7,80) in 14. iz skupine B (mediana je 15,60). Pri določanju tega biooznačevalca je bila največja razlika v mediani med obema skupinama. Primerjalna skupina je imela izmerjene veliko višje vrednosti TNF- α .

Številne študije so pokazale povezavo med hiperhomocisteinemijo in srčno žilnim tveganjem. Hiperhomocisteinemija predstavlja 10% vsega srčno žilnega tveganja in povečuje nagnjenje k strjevanju krvi. Domnevajo, da so žilne poškodbe, ki jih sproži homocistein, posledica oksidativnega stresa. Patološki mehanizmi so osnovani na predpostavki, da HCY pospešuje nalaganje fibrina (nastanek tromba) na žilni steni ter da spremeni endotelijske celice in celice gladkega mišičja tako, da povzroči žilno bolezen ali pospeši njen razvoj. Poznana sta dva možna mehanizma, po katerih naj bi HCY spreminjal žilno funkcijo in vključujeta oksidativni stres in spremembe celične metilacije. Kot navajajo študije je torej HCY toksičen za endotelij, hiperhomocisteinemija pa je neodvisni dejavnik tveganja za LA. Orientacijske referentne vrednosti za odrasle se gibljejo med 5-15 $\mu\text{mol/L}$. Vrednosti od 15-30 (40) $\mu\text{mol/L}$ predstavljajo zmerno hiperhomocisteinemijo, vrednosti od 30-100 (200) $\mu\text{mol/L}$ vmesno, in vrednosti nad to mejo predstavljajo hudo hiperhomocisteinemijo (42,49,50). Ugotovili smo, da je imelo le 17 bolnikov rahlo povišane vrednosti in jih lahko opredelimo v skupino z zmerno oz. blago hiperhomocisteinemijo, od tega 12 iz skupine A in 5 iz skupine B. V skupini A je mediana 13,65, v skupini B pa 13,40. Najnižja izmerjena koncentracija znaša 7,7 $\mu\text{mol/L}$, najvišja pa 33,8 $\mu\text{mol/L}$. Zaradi nizke koncentracije v krvi zahteva določanje HCY metodo z dovolj nizko mejo detekcije. Referentna metoda, kot je GC-MS se v rutini redko uporablja. Še zmeraj obstaja problem kalibracije, ter razlike med metodami in laboratoriji. Pri svojem delu smo določali HCY v serumu, z FPIA metodo. Ta metoda je možna le na analizatorju enega proizvajalca, vendar je določitev hitra, rezultati pa so dobro primerljivi z GC-MS metodo. Vse metode uporabljajo podoben princip obdelave plazme ali seruma z reducentom, ki pretvori oksidirane oblike homocisteina v enotno reducirano obliko, ki se

določa neposredno ali po obdelavi z derivatizacijo. Ker je metoda avtomatizirana, se tako izognemo napakam v predpripravi vzorca. Metoda je hitra in enostavna, odlikuje jo točnost ter dejstvo, da je najnižja koncentracija HCY, ki jo še lahko določimo 0,5 $\mu\text{mol/L}$, kar je bistveno nižje od koncentracije HCY v vzorcu. Pri interpretaciji je potrebno upoštevati dejstvo, da HCY v plazmi z leti narašča. Koncentracija je odvisna od spola, moški imajo višje vrednosti kot ženske. Tudi kajenje in alkohol lahko povišata koncentracijo HCY v plazmi. To je posledica splošnega zmanjšanja metabolizma, malabsorpcije ali nezadostnega vnosa folatov, vitamina B12, B6, ter znižane ledvične funkcije (49,50).

Endotelini so do sedaj najbolj znani in učinkoviti endogeni vazokonstriktorji. Sestavljajo skupino treh polipeptidov (ET-1, ET-2, ET-3) med katerimi ima za človeka najpomembnejšo vlogo ET-1, ki nastaja v endotelijskih celicah žil. V fizioloških pogojih ET-1 prek receptorjev ET₁ uravnava tonus žil in krvni tlak, ter prepustnost žil. V patofizioloških pogojih se ravnovesje endotelinskega sistema spremeni. V ishemičnih pogojih so ugotovili povečano število receptorjev ET₃ v endoteliju koronarnih arterij. Po poškodbi postanejo žile bolj občutljive na delovanje endotelinov (57,58). Orientacijske referentne vrednosti so do 2,0 ng/L. Najnižja izmerjena vrednost za ET-1 je 0,03 ng/L, najvišja pa 3,51 ng/L. Povišane vrednosti ET-1 je imelo le 8 bolnikov, smiselno je omeniti, da so bile vrednosti komajda povišane oz. tik nad zgornjo referenčno vrednostjo. Tudi ET-1 je študijski marker, vendar smo glede na veliko napisanega o tem markerju vseeno pričakovali povišane vrednosti. ET-1 smo določali z encimsko imunskim testom sendvič ELISA. Metodo odlikuje velika hitrost, saj je bila analiza izvedena v približno 5. urah. Pomembno je omeniti tudi visoko občutljivost metode, saj lahko z njo določamo zelo majhne koncentracije zelenega analita. Končni produkt reakcije je rumeno obarvan in se meri v posebnem spektrofotometru. Merjenje poteka v 96. vdolbinicah na mikrotitrskih ploščicah hkrati, zato je absorbanca izmerjena v zelo kratkem času. Ker metoda ni avtomatizirana, so seveda možne napake v predpripravi postopka.

Koncentracija kreatinina v serumu je odvisna od mišične mase, spola in starosti, vendar je relativno stalna. Znano je, da se z starostjo zmanjšuje tudi nastajanje kreatinina, kot posledica zmanjševanja mišične mase, kar moramo upoštevati pri interpretaciji laboratorijskih rezultatov. V rutinskih laboratorijih za določanje serumskega kreatinina (sKR) najpogosteje uporabljamo reakcije z alkalnim pikratom (Jaffe metoda). Problem te metode je v tem, da mnoge endogene in eksogene snovi reagirajo s pikratom, zato je slabo specifična. Plinska oziroma tekočinska kromatografija (GC/LC) z izotopno dilucijsko masno spektrometrijo

(IDMS) služi kot referentna metoda, odlikuje jo odlična specifičnost in občutljivost, vendar se izredno redko uporablja. Predvsem v začetnih fazah KLB je serumska koncentracija kreatinina slab pokazatelj ledvičnega delovanja (61). Analiza je bila izvedena na biokemičnem analizatorju Advia 1800 (Siemens), ter daje skladne rezultate z referenčno IDMS. Orientacijske referenčne vrednosti so od 44 do 97 $\mu\text{mol/L}$. Rahlo povišane vrednosti je imelo 6 bolnikov, vendar so bili vsi iz skupine A. V skupini B ni imel noben bolnik povišanega sKR. Kot bomo videli v drugem delu naloge, se je KR izkazal kot edini statistično značilen biooznačevalec levkoaraioze.

Najboljši pokazatelj ledvične funkcije je GF. Laboratorijsko ugotavljanje morebitne KLB je pomembnejše od klinične postavitve diagnoze. Z objavo zadnjih smernic je ocena GF pridobila na pomenu in vlogi pri opredelitvi in vrednotenju KLB. Pomen opredelitve GF je zlasti v oceni stopnje okvare ledvične funkcije, sledenju poteka bolezni in odgovora na zdravljenje. Namen jasne opredelitve KLB glede na GF pa je predvsem v tem, da zajamemo čim večje število bolnikov že v zgodnejših stopnjah KLB in z optimalnim spremljanjem upočasnim napredovanjem KLB. V vsakodnevni klinični praksi se uporablja skrajšana enačba MDRD, ki od laboratorijskih parametrov vključuje le vrednost serumskega kreatinina, GF pa je podana na standardizirano telesno površino $1,73\text{ m}^2$ (59,60). MDRD enačba ima več omejitev, zato je bil cilj razviti novo, izboljšano formulo predvsem za starejšo skupino preiskovancev in tisto z $\text{GF} > 60\text{ ml/min/1,73m}^2$. S tem bi se zmanjšalo število napačno postavljenih diagnoz, posledično bi se izognili dodatnim nepotrebnim testom ali celo bolnišnični oskrbi (61,62). Naši bolniki nikakor niso tipični ledvični bolniki, zato smo vsem bolnikom s pomočjo meritve sKR izračunali oGF po CKD-EPI enačbi. Rahlo znižane vrednosti oGF smo ugotovili pri 3 bolnikih iz skupine A (ti so imeli tudi rahlo povišan sKR) in pri 1 bolniku iz skupine B. Najnižja izračunana vrednost je bila $54,9\text{ ml/min/1,73m}^2$, najvišja pa $115,1\text{ ml/min/1,73m}^2$. Po 45. letu starosti je normalen upad ledvične funkcije in izrazitejši je pri ženskah. Kot lahko razberemo iz preglednice II in III imajo v glavnem vsi bolniki vrednosti oGF nad $70,0\text{ ml/min/1,73m}^2$. Ravno v tem območju ima CKD- EPI enačba večji pomen in daje bolj zanesljive rezultate.

Glavni namen naše raziskave je bila primerjava laboratorijskih biooznačevalcev med obema skupinama. Pri levkoaraiози so z različnimi metodami ugotovili zmanjšan pretok v beli možganovini, zato nas je zanimalo ali lahko s pomočjo laboratorijskih biooznačevalcev značilno napovemo levkoaraiozo. Izkazalo se je, da razen pri kreatininu ($p=0,043$) ne obstaja

statistično značilna razlika pri nobenem drugem merjenem parametru, kar ni bilo po naših pričakovanjih. Študije oz. raziskave, ki so bile narejene na to temo (v glavnem v zadnjem desetletju) so zaenkrat redke, dejstvo pa je, da so si rezultati raziskav nasprotujoči. Posamezne študije, ki so bile opravljene, temeljijo na velikem številu bolnikov (vsaj 500 ali več) in na različnih primerjalnih skupinah, zato jih težko primerjamo z našo. Vsekakor pa te študije navajajo različne ugotovitve, v nekaterih je odnos do vnetnih biooznačevalcev nejasen, v drugih so ugotovili značilno povišane vrednosti biooznačevalcev in so opredeljeni kot značilen napovednik v LA. Nekako pa se v glavnem strinjajo, da so vnetni procesi v povezavi s starostjo pomembno povezani z spremembami v možganih. Za statistično značilne smo šteli rezultate, pri katerih je bilo tveganje statističnega sklepanja manjše od 0,05 ($p < 0,05$). Temeljna naloga laboratorijske medicine je prepoznavanje kvalitativnih, kvantitativnih in funkcijskih sprememb biološkega vzorca, kjer z najnovejšimi dosežki biomedicinske analitike pomembno vpliva na razvitost laboratorijske medicine in odločilno prispeva k nepogrešljivi vlogi laboratorija pri vseh oblikah zdravstvene obravnave pacienta. Laboratorijski izvid je v procesu obravnave bolnika oz. preiskovanca lahko ključnega pomena, saj nekatere spremembe lahko zaznamo le z analizo bioloških vzorcev v laboratoriju. Medicinski laboratorij mora upoštevati in zagotoviti vse zahteve svoje dejavnosti, predvsem za pridobitev zanesljivega rezultata analiz bioloških vzorcev. Do napačnega laboratorijskega rezultata lahko pride vrsta predanaliznih in poanaliznih dejavnikov, katerih poznavanje lahko prepreči ali razloži nepravilen rezultat, ki ni v skladu s kliničnimi predpostavkami. Pri interpretaciji laboratorijskih rezultatov je potrebno upoštevati tudi variiranje vrednosti parametrov v vzorcih (biološka neponovljivost človeških vzorcev). Variiranje vrednosti parametrov v vzorcih je pomembno upoštevati tudi pri ponovnih testiranjih pri istem bolniku. Zagotovo potrebujemo dodatne raziskave in obsežnejšo skupino bolnikov, da bi lahko potrdili pomen laboratorijskih biooznačevalcev v diagnostiki LA. V naši raziskavi je bilo število bolnikov premajhno, da bi lahko z gotovostjo potrdili rezultate raziskave. Verjetno je ravno v premajhnem številu vzorcev vzrok, da nismo dobili pričakovanih rezultatov. Glede na naravo te bolezni in dragih slikovnih tehnik, s katerimi se motnja odkrije in potrdi je tako posledično tudi težje pridobiti zelo veliko število vzorcev. Naša študija je bila pilotska z majhnim številom vzorcev, vsekakor bi potrebovali večje število vzorcev (vsaj 300 ali več). V takšnem primeru ima raziskava oz. analiza opravljenih vzorcev zagotovo večjo statistično moč.

Nastanek in razvoj kroničnih bolezni je kompleksen. Pri razvoju vseh pa vselej sodelujejo isti skupni dejavniki, ki jih imenujemo kar dejavniki tveganja. Njihova prisotnost nakazuje večjo ogroženost in večje tveganje za razvoj kronične bolezni. Dejavniki tveganja delujejo počasi, neopazno, leta in leta. Med najpomembnejše in najpogostejše prisotne dejavnike tveganja danes sodijo: starost, spol, kajenje, nepravilna prehrana, čezmerno pitje alkoholnih pijač, čezmerna telesna masa, telesna nedejavnost, zvišan krvni tlak, zvišan nivo krvnega sladkorja, zvišan nivo holesterola (59,60). Kot zanimivost naj navedem podatke, ki smo jih pridobili iz Klinike za Žilne bolezni, UKC Ljubljana. Iz skupine A je bilo 13 kadilcev, iz skupine B pa 15 (obe skupini zajemata tako kadilce iz preteklosti kot tudi iz sedanjosti). Povišan krvni tlak iz skupine A je imelo kar 21 bolnikov, iz skupine B pa 5. Prisotnost dislipidemij je v obeh skupinah 15. Pozitivno družinsko anamnezo ima v skupini A kar 16 bolnikov, v skupini B pa 13 bolnikov. Del dejavnikov tveganja je prirojen, zato nanje ne moremo vplivati. Moramo pa jih upoštevati pri določanju posameznikove ogroženosti, drugi pa so povezani z načinom življenja in razvadami, zato so odpravljivi. Iz teh podatkov lahko sklepamo, da so ti dejavniki tveganja prisotni skoraj pri polovici bolnikov tako iz skupine A kot tudi iz skupine B. Subkliničnega vnetja ne vidimo, ne zaznamo in ga ne moremo izmeriti. Zato smo v ta namen poskušali določiti koncentracijo hs-CRP. Ugotovili smo, da je $p=0,213$, kar bi lahko pomenilo, da bi večje število bolnikov lahko dalo statistično značilno razliko tudi pri tem biooznačevalcu.

V zadnjem delu naloge smo se osredotočili predvsem na biooznačevalce ledvične funkcije, ker so edini dali statistično značilne rezultate. Med najbolj ogrožene skupine bolnikov, ki zbolijo za KLB, sodijo bolniki s sladkorno boleznijo, arterijsko hipertenzijo in osebe po 60. letu starosti. Glede na raziskave je ugotovljeno, da spadajo bolniki s KLB v zelo ogroženo skupino za srčnožilne dogodke in možgansko kap. Na podlagi teh dejstev bi morda lahko našli eventuelno povezavo med ledvično funkcijo in levkoarizozo. Znano je tudi, da je že blaga motnja ledvične funkcije povezana s pospešeno aterosklerozo, in da tveganje za možgansko kap in KLB s starostjo narašča (59,60). Poškodba organov nastane zaradi okvare žil, ki jih prehranjujejo. Mikroangiopatija je proces, kjer je okvarjeno drobno žilje, med drugim pa povzroča tudi okvaro ledvic. Tudi levkoarizosa je posledica možganske mikroangiopatije. Obstajajo hemodinamske podobnosti med ožiljem oz. žilami v ledvicah in možganih. Iz teh naštetih dejstev lahko sklepamo, da so biooznačevalci ledvične funkcije, kot je sKR pomemben napovedni dejavnik za LA. Iz statističnih podatkov lahko sklepamo, da ima velik

potencial kot napovedni dejavnik tudi oGF ($p=0,112$), ker je zelo blizu mejni vrednosti ($p=0,05$). Tudi v tem primeru lahko sklepamo, da bi večje število bolnikov lahko dalo statistično značilne rezultate. V sklopu biooznačevalcev ledvične funkcije bi bilo vsekakor smiselno določiti še kak novejši označevalec, npr. serumski cistatin C. Napovedno vrednost ($p=0,043$) z logistično regresijo in ROC analizo smo izvedli le na primeru kreatinina s površino pod krivuljo ($AUC=0,651$) s 95% intervalom zaupanja ($IZ=0,513-0,772$) in razmerjem obetov ($OR=1,039$), ker je edini neodvisno napovedal LA. Občutljivost in specifičnost kreatinina (ROC krivulja) pri optimalni koncentraciji $73 \mu\text{mol/L}$ je 70,6% oz. 60,9%.

Kot zanimivost naj še omenim, da novejši članki spremembo bele možganovine imenujejo levkoarioza (70). Zato predlagamo poenotenje poimenovanja te motnje tudi pri nas.

6 ZAKLJUČKI

Osnovne hipoteze naše prospektivne študije o obstoju statistično značilne razlike biooznačevalcev endotelija, vnetja in ledvične funkcije med skupinama preiskovancev s potrjeno LA in brez potrjene LA nismo potrdili, razen v primeru kreatinina v serumu, kjer smo dokazali statistično značilno razliko v motenem delovanju ledvične funkcije med skupinama A in B. Nadaljevanje pilotne študije na širšem številu preiskovancev bi bilo potrebno za dokončno potrditev ali zavrnitev osnovne hipoteze. Naša naloga odpira zanimivo raziskovalno pot za naprej.

7 LITERATURA IN VIRI

1. Acceto B: Starost in staranje, Ljubljana, Cankarjeva založba, 1987: 3.
2. Masslach, Burnout C: The Cost of Caring, Boston, Malor Books, 2003: 23.
3. Velikonja I in sodelavci: Naj ostanejo takšni, kot jih poznamo; vodič za svojce in negovalce starostnikov z vedenjskimi in psihičnimi spremembami pri demenci, Ljubljana, Jannsen- Cilag, Podružnica, 2005: 1.
4. Van Hulsen A: Zid molka. Oblike dela z osebami z demenco na primeru validacije in drugih novih teorij, Logatec, Firis Imperial, 2007: 17-22.
5. Mali J, Vida M A: Demence- izziv za socialno delo, Ljubljana, Fakulteta za socialno delo Univerza v Ljubljani, 2007: 15-17.
6. Vitorovič, S. Dehidracija: Spominčica- Združenje za pomoč pri demenci, Ljubljana, Psihiatrična klinika Ljubljana, 2005.
7. Jurdana M, Poklar Vatovec T, Peršolja Černe M: Razsežnosti kakovostnega staranja, Univerzitetna založba Annales, Koper, 2011, str.179-184.
8. Luskovec A: Psihofizične obremenitve zaposlenih na varovanih oddelkih doma Kranj. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za zdravstvene vede, 2009. Diplomsko delo.
9. Grad A: O demenci, pridobljeno december 2012, s <http://www.zdruzenje cvb.com/clanki:/pdf/12-o-demenci-grd.pdf>.
10. Grad A: Vaskularna demenca, pridobljeno december 2012, s <http://www.ljudmila.org/~zzppd/zbor1-6.htm>.
11. Pocajt M, Širca A: Anatomija in fiziologija, DZS, Ljubljana, 2000: 326-331.
12. Flis V, Miksić K: Izbrana poglavja iz kirurgije, Založba Pivec, Maribor, 2010: 309-311.
13. Grad A: Depresija in možganska kap, pridobljeno december 2012, s <http://www.zdruzenjecvb.com/clanki/pdf/18-depresija-in-mozganska-kap.pdf>.
14. Hachinski VC, Potter P, Merskey H: Leuko-araiosis. Arch Neurol 1987;44:21-3.
15. O'Sullivan M: Leukoaraiosis, Practical Neurology 2008; 8: 26-38.
16. Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Au R, Kannel WB, Wolf PA: The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. Stroke. 2006 Feb;37(2):345-50.

17. Bowler JV: Modern concept of vascular cognitive impairment. *Br Med Bull.* 2007;83:291-305.
18. Alves GS, de Oliveira Alves CE, de Oliveira Lanna ME, Erceira-Valente L, Sudo FK, Moreira D et al: Clinical characteristics in subcortical ischemic white matter disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2009;67(2-A):173-8.
19. Inzitari D, Pracucci G, Poggesi A, Carlucci G, Barkhof F, Chabriat H et al: Changes in white matter as determinant of global functional decline in older independent outpatients: three year follow-up of LADIS (leukoaraiosis and disability) study cohort. *BMJ* 2009;339 :b2477.
20. Whitman GT, Tang Y, Lin A et al: A prospective study of cerebral white matter abnormalities in older people with gait dysfunction. *Neurology* 2001; 57: 990- 4.
21. Baloh RW, Yue Q, Scotch TM et al: White matter lesions and disequilibrium in older people. I. Case – control comparison, *Arch Neurol* 1995; 52: 970- 4.
22. Briley DP, Haroon S, Sergeant SM et al: Does leukoaraiosis predict morbidity and mortality? *Neurology* 2000; 54: 90-4.
23. Khan U, Porteous L, Hassan A, Markus HS: Risk factor profile of cerebral small vessel disease and its subtypes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007 Jul;78(7):702-6.
24. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS: Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. *Hypertension.* 2010 May;55(5):1075-85.
25. Inzitari D: Leukoaraiosis: an independent risk factor for stroke? *Stroke.* 2003 Aug; 34(8):2067-71.
26. Pretnar Oblak J, Sabovic M, Pogacnik T, Sebestjen M, Zaletel M: Flow-mediated dilatation and intima-media thickness in patients with lacunar infarctions. *Acta Neurol Scand.* 2006 Apr;113(4):273-7. Erratum in: *Acta Neurol Scand.* 2006 May;113(5):357.
27. O'Sullivan M, Lythgoe DJ, Pereira AC, et al: Patterns of cerebral blood flow reduction in patients with ischemic leukoaraiosis. *Neurology* 2002;59: 321-6.
28. O'Sullivan M, Summers PE, Jones DK, et al: Normal appearing white matter in ischemic leukoaraiosis: a diffusion tensor MRI study. *Neurology* 2001;57: 2307-10.
29. Wardlaw JM, Sandercock PA, Dennis MS, Starr J: Is breakdown of the blood-brain barrier responsible for lacunar stroke, leukoaraiosis, and dementia? *Stroke* 2003;34: 806-12.
30. Wallin A, Sjögren M, Edman A, Blennow K, Regland B: Symptoms, vascular risk factors and blood-brain barrier function in relation to CT white-matter changes in dementia. *Eur Neurol* 2000;44: 229-35.

31. Starr JM, Wardlaw J, Ferguson K, MacLulich A, Deary IJ, Marshall I: Increased blood-brain barrier permeability in type II diabetes demonstrated by gadolinium magnetic resonance imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74: 70-6.
32. Topakian R, Barrick TR, Howe FA, Markus HS: Blood-brain barrier permeability is increased in normal-appearing white matter in patients with lacunar stroke and leucoaraiosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Feb;81(2): 192-7.
33. Hassan A, Hunt BJ, O'Sullivan M, Parmar K, Bamford JM, Briley D, Brown MM, Thomas DJ, Markus HS: Markers of endothelial dysfunction in lacunar infarction and ischaemic leucoaraiosis. *Brain* 2003;126: 424-32.
34. Mambouli JV, Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*, 1999;31:61-74.
35. Omersa D, Zaletel M: Elastične značilnosti arterij in možganskožilne bolezni, *MED RAZGL*, 8.2.2011.
36. Tetičkovič E in sodelavci: *Klinična nevrologija*, Založba Obzorja Maribor, 1997: 81-82.
37. Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA: MR signal abnormalities at 1,5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *Am J Roentgenology* 1987; 149: 351-6.
38. Wright CB, Moon Y, Paik MC, Brown TR, Rabbani L, Yoshita M et al: Inflammatory biomarkers of vascular risk as correlates of leucoaraiosis. *Stroke*. 2009 Nov;40(11):3466-71.
39. Goldberg RB: Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Sep;94(9);3171-82.
40. Di Napoli M, Papa F: Present insights in the cerebral small vessel disease physiopathology: the role of C-reactive protein. *Recenti Prog Med*. 2006 May;(5):246-56.
41. Khan U, Hassan A, Vallance P, Markus HS: Asymmetric dimethylarginine in cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2007 Feb;38(2);411-3.
42. Hassan A, Hunt BJ, O'Sullivan M, Bell R, D'Souza R, Jeffery S et al: Homocysteine is a risk factor for cerebral small vessel disease, acting via endothelial dysfunction. *Brain*. 2004 Jan;127(Pt1):212-9.
43. Rouhl RP, van Oostenbrugge RJ, Damoiseaux JG, Debrus-Palmans LL, Theunissen RO, Knottnerus IL et al: Haptoglobin phenotype may alter endothelial progenitor cell

cluster formation in cerebral small vessel disease. *Curr Neuovasc Res.* 2009 Feb;6(1):32-41.

44. Vozelj M: Imunologija. Enciklopedijski priročnik, 1. izdaja, Ljubljana, DZS, 1996.
45. Lothar T: C- reactive protein. *Proteins in clinical and Laboratory Medicine*, Frankfurt; 2007:96-106.
46. Bertran N, Camps J, Fernandez- Ballart J, Murphy MM, Arija V, Ferre N, Tous M, Joven J: Evaluation of a high- sensitivity turbidimetric immunoassay for serum C- reactive protein: application to the study of longitudinal changes throughout normal pregnancy, *Clin. Chem. Lab. Med*, 2005;308-313.
47. Mc Connell JP, Branum EL, Ballman KV, Lagerstedt SA, Katzman JA, Jaffe AS: Gender differences in C- reactive protein concentrations- Confirmation with two methods, *Clin. Chem. Lab. Med*, 2000; 56-59.
48. Eda S, Kaufmann J, Molwitz M, Vorberg E: A new method of measuring C- reactive protein, with a low limit of detection, suitable for risk assessment of coronary heart disease, *Scand.J. Clin. Lab. Inv.*, 1999: 32-35.
49. Božič M: Kaj je homocistein?. *Farm Vestn* 2002;53:337-341.
50. Stegnar M: Hiperhomocisteinemija in žilna bolezen. *Farm Vestn* 2002;53:343-346.
51. Bauer J, Herrman F: Interleukin-6 in clinical medicine. *Annals of Hematology*, 1991;62 (6):203-210.
52. Abbas AK, Lichtman AH: *Cellular and Molecular Immunology*, 5 th edition, Philadelphia, Saunders; 2007: 2003.
53. Tedqui A, Mallat Z: Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006; 86 (2):515-581.
54. Abbasi SH, Boroumand MA: Expanded network of inflammatory markers of atherogenesis: where are we now? *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:38-44.
55. Nishimoto N, Kishimoto T: Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(11):619-626.
56. Prelovšek O: Vpliv dejavnika tumorske nekroze- α na izločanje interleukina- 6 iz človeške mišice v kulturi, *MED RAZGL* 2004; 43: 63-76.
57. Kogoj P, Hawlina S, Bunc M: Od endotelija odvisno uravnavanje žilnega napona, *MED RAZGL* 2008; 47: 31-42.

58. Perko D, Zaletel M: Pomen astrocitov, obžilnih živčnih vlaken in možganskega žilnega endotelija pri regulaciji možganskega krvnega pretoka, MED RAZGL 2008; 47: 283-291.
59. Ekart R: Obravnava bolnika s kronično ledvično boleznijo in zapleti, 6. mariborski kongres družinske medicine, 2010: 155-165.
60. Rus P: Bolnik s kronično ledvično boleznijo (KLB) v ambulantni zdravniku družinske medicine, 6. mariborski kongres družinske medicine, 2010: 165-175.
61. Hojs R: Ocena glomerulne filtracije in prevalenca kronične ledvične bolezni, ISIS, marec 2009: 147-153.
62. Levey AS, Stevens LA et al: A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. Ann Intern Med. 2009; 150: 604-612.
63. Osredkar J, Marc J: Laboratorijska medicina I., Univerza v Ljubljani, FFA, 2012: 20-23.
64. IMMULITE/IMMULITE 1000 High Sensitivity CRP (PIELKCRP-2 (3), 2008-05-02).
65. IMMULITE/IMMULITE 1000 IL-6 (PILK6P-17, 2008-07-01).
66. IMMULITE/IMMULITE 1000 TNF α (PIELKNF-1 (11), 2009-02-03).
67. ENDOTHELIN-1 QUANTIKINE ELISA Kit, 2012.
68. ABBOT AXSYM SYSTEM: Homocysteine, September 2011.
69. SOP, Navodila za delo na biokemičnem analizatorju Advia 1800 in Določanje koncentracije kreatinina, KIKKB, Ljubljana, 2012.
70. Wright CB: Inflammatory biomarkers of vascular risk as correlates of leukoariosis, Pub Med 2009; 40 (11): 3466-71.