

# Likvoreja: usporedba dvije metode kvalitativnog određivanja asijalotransferina

---

Iličković, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:442897>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Marko Iličković**

**Likvoreja : usporedba dvije metode kvalitativnog  
određivanja asijalotransferina**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Neurokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Željke Vogrinc.

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Željki Vogrinc na strpljenju, savjetima i pomoći pri izvedbi ovog diplomskog rada. Posebno se zahvaljujem na potpori svojoj obitelji i prijateljima te svim zaposlenicama na Odjelu za opću kliničku biokemiju i analitiku cerebrospinalne tekućine na trudu, brizi i prenesenom znanju.*

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Likvor ili cerebrospinalna tekućina .....	1
1.2.1. Epidemiologija .....	3
1.2.2. Mjesta likvoreje .....	3
1.2.3. Patofiziologija likvoreje.....	4
1.2.4. Prezentacija likvoreje.....	5
1.2.5. Dijagnostika likvoreje .....	5
1.2.5.1. Slikovne tehnike .....	6
1.2.5.2. Biokemijski biljezi likvoreje .....	8
1.2.5.3. Asijalotransferin.....	8
1.2.5.4. Prostaglandin D sintaza .....	9
1.2.6. Liječenje likvoreje .....	10
1.2.7. Prognoza za pacijente s likvorejom .....	12
1.2.8. Prevencija i edukacija pacijenata .....	13
1.2.9. Poboljšanje zdravstvenog tima za bolje ishode .....	13
2. Obrazloženje teme .....	14
3. Materijali i metode .....	15
3.1. Uzorci.....	15
3.2. Metode za dokazivanje asijalotransferina .....	15
3.2.1. In-house metoda za dokazivanje asijalotransferina .....	15
3.2.2. Komercijalni test za dokazivanje asijalotransferina proizvođača Sebia .....	17
3.2.3. Interpretacija rezultata .....	19
3.2.3.1. Interpretacija rezultata in-house metode: .....	19
3.2.3.2. Interpretacija rezultata Sebia testa:.....	20
4. Rezultati.....	25
5. Rasprava.....	34
6. Zaključci.....	36
7. Popis kratica, oznaka i simbola .....	37
8. Literatura: .....	38
9. Sažetak/Summary.....	43

## 1. Uvod

### 1.1. Likvor ili cerebrospinalna tekućina

Likvor ili cerebrospinalna tekućina (CSF) je bistra, bezbojna tekućina koja ispunjava moždane komore (*ventriculi cerebri*), središnji kanal leđne moždine, te prostor između pije i arahnoidne (subarahnoidni prostor). S obzirom na to da su mozak i kralježnična moždina uronjeni u likvor, masa mozga odrasle osobe iznosi 50 grama u odnosu na oko 1500 grama njegove suhe mase, što objašnjava jednu od njenih uloga, mehaničku zaštitu mekim strukturama središnjeg živčanog sustava (SŽS-a) i osigurava stabilan kemijski okoliš unutar SŽS. (Trbojević Čepe i Vogrinc, 2009). Također, sudjeluje u homeostazi cerebralne intersticijske tekućine i neuronskog okruženja regulacijom ravnoteže elektrolita, cirkulacijom aktivnih molekula i eliminacijom katabolita. Likvor transportira produkte koroidnog plexusa do mjesta njihovog djelovanja te takav način distribucije cirkulacijom modulira aktivnost određenih regija mozga. Otpad moždanog metabolizma, produkti peroksidacije i glikozilirani proteini tako se akumuliraju sa smanjenom izmjenom likvora povezanom sa starenjem. Likvor većinom, no ne i potpuno proizvodi koroidni plexus, dok moždana intersticijska tekućina, ependim i kapilare također mogu igrati ulogu u sekreciji likvora. (Sakka i sur., 2011).

U nedavnim opažanjima Yamada (2021) korištenjem napredne tehnike magnetske rezonance (*Time – Spatial Inversion Pulse*), likvor je poslužio kao interni obilježivač za praćenje kretanja likvora. Rezultati su pokazali da se dinamika likvora razlikuje od one koja je objašnjena klasičnom teorijom cirkulacije likvora. Likvor pokazuje pulsiranje, no ne u obliku rasutog protoka (*bulk flow*) od mjesta proizvodnje do apsorpcijskog mjesta.

Ukupni volumen likvora odrasle osobe iznosi otprilike između 125 i 150 mL, a obnavlja se u prosjeku četiri puta dnevno; dnevni volumen proizvedenog likvora iznosi otprilike 600 mL. Krvno-moždana barijera sastoji se od nekoliko anatomskih struktura koje predstavljaju fizičku barijeru difuziji i filtraciji proteina iz krvi u likvor. Integritet te barijere i protok likvora određuju kvalitativni i kvantitativni sastav ukupnih proteina u likvoru. Sastojci likvora nisu uniformni i ovise o mjestu gdje je likvor uzorkovan, zbog rostrokaudalnog gradijenta koncentracije proteina koji prati neuroos (*neuraxis*); najmanje koncentracije su u ventrikularnoj tekućini, dok su najveće u lumbosakralnom području, koje je i najčešće mjesto uzorkovanja (lumbalna punkcija) (Giovanni, 2014).

Pretrage likvora mogu se podijeliti u više programa, od hitnih koji su važni za probiranje manifestacija određenih patoloških stanja ili za isključivanje radne dijagnoze (hitni program), pretraga koje pomažu smanjivanju dijagnostičke nesigurnosti i dozvoljavaju lakšu diferencijalnu dijagnozu (osnovni program), do onih specijalnih, koje se rjeđe koriste u laboratoriju, a podupiru konačnu dijagnozu te pružaju dijagnostičku informaciju (prošireni program) (Trbojević Čepe i Vogrinc, 2009). Rutinska analiza likvora neprocjenjiva je u evaluaciji upalnih, infektivnih i neinfektivnih stanja SŽS-a, u slučajevima CT-negativnog subarahnoidalnog krvarenja ili leptomeningealnih metastaza. Uključuje vizualni pregled uzorka, citološku obradu, određivanje ukupnog broja eritrocita i leukocita, ukupne koncentracije proteina u likvoru, glukoze te laktata (Hegen i sur., 2015).

## 1.2. Likvoreja

Likvoreja ili istjecanje likvora događa se kada cerebrospinalna tekućina izlazi kroz rupturu u duri mater, vanjske ovojnice koja štiti SŽS (Dobrocky i sur., 2022). Istjecanja mogu biti spontana (primarna) i nespontana (sekundarna) (Tai i sur., 2022).

Istjecanje likvora iz SŽS-a može imati opasne posljedice za mozak. Otvorena komunikacija subarahnoidalnog prostora s vanjskim okolišem povećava mogućnost za infekciju unutar središnjeg živčanog sustava npr. bakterijski meningitis jer je omogućen direktan ulazak mikroorganizama. Također, likvoreja može utjecati na funkciju mozga te povećati rizik od direktne traume za moždani parenhim zbog gubitka hidromehaničke potpore. Osim navedenog, istjecanje likvora indicira potrebu za daljnju evaluaciju i liječenje jer može biti posljedica frakture lubanje ([ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)).

Istjecanja mogu biti kranijalna ili kralježnična, ([spinalcsfleak.org](http://spinalcsfleak.org)), kontinuirana ili intermitentna (Bernal-Sprekelsen i sur., 2014).

Traumatska istjecanja se klasificiraju prema latentnosti pojavljivanja te se različite evaluacije i liječenja mogu sukladno s time primijeniti. U akutnom tipu, pacijent se prezentira s istjecanjem likvora unutar prva dva dana od traume, odgođeni tip prezentira barem tjedan dana od traume, dok kasniji tip prezentira unutar tri mjeseca nakon traume (Ramakrishnan i sur., 2022).

Najčešći simptomi su ortostatske glavobolje (92%), mučnina (54%) i bol u vratu (43%), a mogući simptomi su i zvonjenje u ušima, gubitak mirisa ili okusa, vrtoglavica te bol u leđima (D'Antona i sur., 2021).

### **1.2.1. Epidemiologija**

Od svih istjecanja likvora, 80 % njih posljedica su kraniofacijalne traume. Traumatska istjecanja likvora javljaju se u od 12 do 39 % pacijenata s frakturom baze lubanje, dok će prezentacija simptoma istjecanja biti prisutna unutar 48 sati u više od 50 % takvih pacijenata; 70 % unutar tjedan dana i gotovo kod svih takvih pacijenata unutar tri mjeseca. Odgođene prezentacije (npr. više mjeseci) mogu se pripisati kontrakciji rane, nekrozi tkiva, nestanku edema ili povećanju intrakranijalnog tlaka. Čini se da čvrsto prijanjanje dure uz anteriornu bazu lubanje predisponira ovo područje za ozljedu. Jatrogene ozljede čine 16 % svih istjecanja, dok ostala istjecanja različitih etiologija (tumori, kongenitalni koštani defekti i dr.) čine 4 % (Le C i sur., 2016). Likvoreja je također poznata kao i komplikacija posttraumatskih kirurških zahvata, endoskopskih endonazalnih operacija baze lubanje, operacija koje uključuju lumbosakralni dio kralježnice te dijagnostički ili terapijskih lumbalnih punkcija (Menon i Onyia, 2015). Prema Gupta i sur. (2022) 10.1 % pacijenata, kojima je tumor uklonjen endoskopskom endonazalnom resekcijom, imali su likvoreju nakon zahvata.

### **1.2.2. Mjesta likovreje**

Kraniofacijalna trauma može dovesti do različitih prezentacija istjecanja likvora, koje su primarno određene mjestom i mehanizmom ozljede. Likvoreja u bazi lubanje zbiva se kada postoji abnormalna veza između subarahnoidalnog prostora i zračnog prostora u paranazalnim sinusima, nosnoj šupljini, srednjem uhu ili mastoidnim stanicama ( Scoffings, 2021).

Anteriorne frakture baze lubanje su često povezane brzim udarcima prilikom kojih su rešetnica, etmoidalna kost i sfenoidalni sinusi najčešće oštećeni jer su tanki i blisko vezani uz duru. Rjeđe su frakture temporalne kosti povezane s disrupcijom dure, koja može dovesti do likvoreje u ušima (otolikvoreja) ili rjeđe u očima (okulolikvoreja) ( Bagnon i Hudgins, 2014).

Jatrogena istjecanja likvora događaju se najčešće kao posljedica funkcionalne endoskopske operacije; rešetnica i etmoidalna kost u takvim zahvatima primarno su oštećene, slijede ih frontalni i sfenoidni sinusi ( Banks i sur., 2009).

Neurokirurške intervencije pridonose jatrogenim istjecanjima, posebice prilikom endoskopskih transnazalnih operacija hipofize. Predložene etiologije ovih istjecanja protežu se od anatomskih varijacija do tehničkih faktora i mogu biti prepoznate tijekom ili poslije operacije (Banks i sur., 2009).

Spontana istjecanja likvora događaju se bez jasnog početnog događaja, često na razini kralježnice, u torakalnoj i cervikalnoj regiji te rjeđe kod baze lubanje. Spontana istjecanja se uglavnom pripisuju postojećim stanjima koja uzrokuju smanjeni intrakranijalni tlak (ICP), što vodi do ortostatskih glavobolja, najčešće kliničke manifestacije kod spinalnog istjecanja (Lin i sur., 2017).

Također, povezana su i sa povišenim ICP-om ili idiopatskom intrakranijalnom hipertenzijom (IIH). Takva istjecanja su vjerojatno sekundarna nakon erozije tankih koštanih struktura baze lubanje zbog povišenog ICP-a (Englhard i sur. 2018).

Postojeća slabost dure povezana s nasljednim poremećajem matriksa vezivnog tkiva također je opisana kao pridonoseći faktor. Netraumatsko istjecanje likvora može biti uzrokovano i kongenitalnim formacijama baze lubanje te defektom baze lubanje zbog određenog tumora (Pagani-Estévez i sur., 2019).

### **1.2.3. Patofiziologija likvoreje**

Iako se istjecanja likvora mogu nalaziti u bazi lubanje, takav tip istjecanja obično ne uzrokuje ortostatske glavobolje te su više povezane s visokim nego niskim tlakom likvora (u usporedbi sa spontanom istjecanjima, traumama glave i postoperativnim postupcima) (Farnsworth i sur., 2023., Kranz i sur., 2019).

Mehanizam istjecanja likvora nakon traume glave ili kirurškog postupka uglavnom je povezan s probojem u slojeve mukoze, kosti, dure i arahnoidne membrane što vodi do rinolikvoreje - tijekom likvora u nos (Ramakrishnan i sur., 2022).

Divertikuli ovojnice (meningeal diverticula); područja duralne dehiscencije, koja dopuštaju protruziju leptomeninge kroz duralni defekt. Neke divertikule uključuju velike meningealne rupture koje dopuštaju brzo istjecanje likvora dok druge stvaraju slabi kapljajući izlaz likvora s Valsalva maneuvrom. Ventralne rupture su obično prouzročene protruzijama kalcificiranog diska ili oštrim osteofitima završne ploče (*endplate*), koji zarezuju duru, stvarajući longitudinalno orijentiranu rupturu. Istjecanja iz ventralnih ruptura su često brza, rezultirajući s ekstenzivnim



skupljanjima likvora. Kod centralne venozne fistule (CVF) postoji direktna komunikacija između spinalnog subarahnoidnog prostora i odlazeće, paraspinalne vene, koja omogućava brzi gubitak likvora u venoznu cirkulaciju. Likvor se obično resorbira na razini spinalnih živčanih završetaka, arahnoidnim vilima, koji su regulirani vakuolama. Nasuprot tome, gubitak likvora zbog CVF-a je nereguliran, što dovodi do deplecije volumena CSF-a i intrakranijalne hipotenzije. Torakalni dio kralježnice je najčešće mjesto CVF-a (ncbi.nlm.nih.gov).

#### **1.2.4. Prezentacija likvoreje**

Budući da je većina istjecanja likvora posljedica slučajne ili jatrogene traume, anamneza pacijenta koji ima rinoreju ili otoreju trebala bi potaknuti sumnju na istjecanje likvora, stoga bi se trebala pronaći nedavna povijest traume ili kirurškog postupka. Najčešći prezentirajući simptom svih istjecanja baze lubanje je bistra rinoreja uz koju se mogu pojaviti i glavobolja, bol u vratu ili ukočenost (Wang i sur., 2011).

Neki od neuobičajenih simptoma mogu nastati od kompresije struktura u bazi lubanje, produljene moždine ili leđne moždine, zbog hernije mozga, encefalokele, kroz kost i duralni defekt. Takve primjere uključuju galaktoreja, kvadripareza, infarkti i koma (Dobrocky i sur., 2022).

Druge atipične prezentacija kroničnog istjecanja likvora su letargija, deficiti pamćenja, demencija s frontotemporalnim svojstvima (*frontotemporal brain sagging syndrome*), parkinsonizam i ataksija (Wicklund i sur., 2011).

Nedavni dokazi predlažu da duralni defekti često stoje iza neobjašnjenih posteriornih fossa-predominantnih površnih sideroza zbog krvarenja iz trošnih epiduralnih vena na mjestu duralne poderotine (Friedauer i sur., 2022).

#### **1.2.5. Dijagnostika likvoreje**

Oprezna dijagnostika pacijenata za koje se sumnja da imaju istjecanje likvora je od ključne važnosti, potrebno je biti svjestan komponenti likvora, abnormalnosti u rezultatima slikovnih tehnika i mogućih uzroka istjecanja (ncbi.nlm.nih.gov).

Kemijska analiza sekreta skupljenog iz nosa, uha ili oka ( *discharge fluid* ) na koje se sumnja da su cerebrospinalna tekućina siguran je i neinvazivan način ispitivanja istjecanja ( Warnecke i sur., 2004).

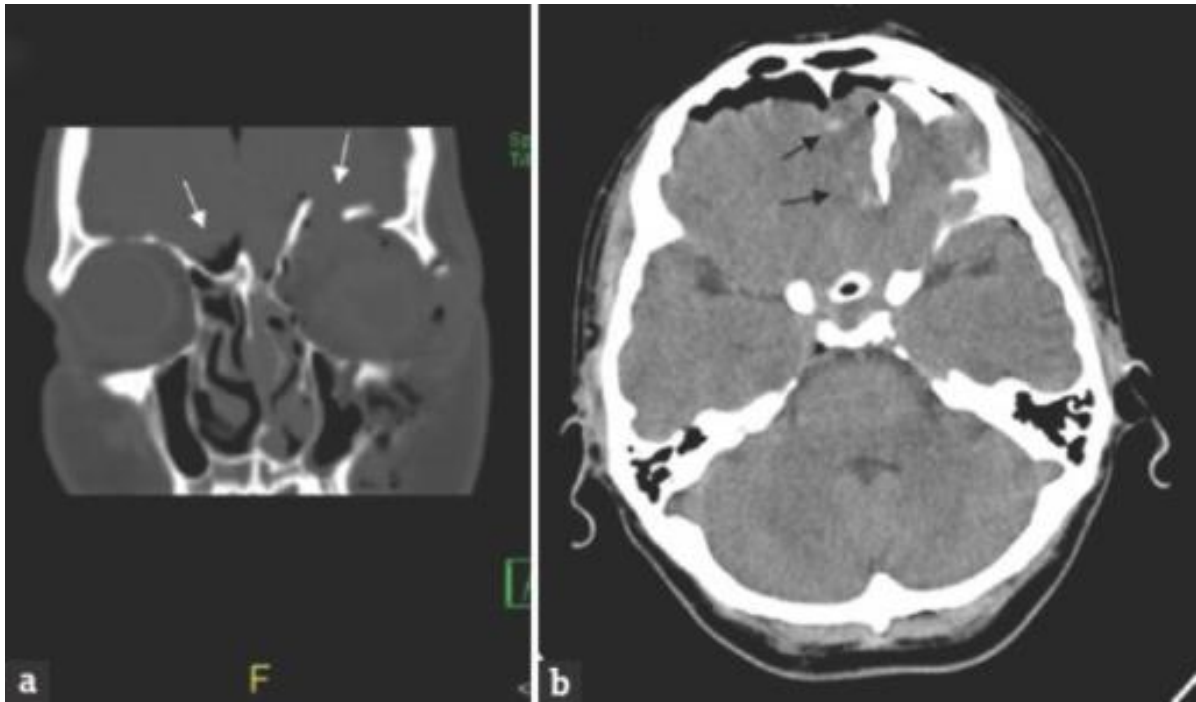
#### **1.2.5.1. Slikovne tehnike**

Kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije (HRCT) paranazalnih sinusa i temporalne kosti obično je dovoljna za identifikaciju jednostrukih koštanih defekata. Ako se sumnja na više defekata na HRCT-i, CT cisternografija je korisna za daljnju lokalizaciju lezija. Ako je inicijalni CT pokazao sumnju na meningoencefalokelu, MR cisternografija je visokoosjetljiva za meka tkiva. Ako je istjecanje intermitentno, ali aktivno, HRCT je i dalje prvi izbor slikovnih tehnika, a u slučaju da je istjecanje neaktivno u vrijeme slikanja, potrebno je razmotriti MR kontrastnu cisternografiju ili radionuklidnu cisternografiju ( Hiremath i sur., 2019).

Radionuklidna cisternografija (RNC) je nuklearno medicinsko ispitivanje u kojem se radioizotop injektira intratekalno lumbalnom punkcijom. Pamučni čepići ( *pledget* ) stavljaju se u nosnu šupljinu na nekoliko sati, a zatim se uklanjaju te se mjeri prisutnost radioizotopa. Sama metoda je invazivna te se više smatra kao dijagnostičko ili potvrdno ispitivanje, nego kao ispitivanje lokacije istjecanja likvora. Intratekalni fluorescein (IF) omogućava identifikaciju fistule vaze lubanje tijekom endoskopije, no za ovu metodu nedostaju smjernice o najboljoj dozi i proceduri za najsigurnije i najefektivnije rezultate (Oakley i sur.)

Uzrok spontane rinolikvoreje može biti pripisan idiopatskoj intrakranijalnoj hipertenziji, tada su preporučene slikovne tehnike poput CT-a i fundoskopije. U slučajevima spontanih istjecanja s intrakranijalnom hipotenzijom, magnetna rezonanca mozga može pokazati intrakranijalno pahimeningealno zadebljanje, a povećanje s kontrastom, subduralno skupljanje tekućine i pomak mozga prema dolje. MRI kralježnice također može pokazati raspad dure i demonstrirati istjecanje CSF-a iz defekata kralježnične dure (Chiapparini i sur. 2004).

U sljedećem primjeru Bunevicius i sur. (2016) možemo vidjeti prikaz pacijenta s traumom glave, ovdje se slikovnim tehnikama (ne-kontrastni i kontrastni CT) uočavaju orbitalna ozljeda s frontobazilarnom kranijalnom frakturom. Pacijent je sljedeći dan razvio nazo- i rinolikvoreju.



Slika 1. Primjer ne-kontrastnog CT-a pacijenta s frakturom gornjeg orbitalnog krova (pokazano strjelicama, preuzeto iz Bunevicius i sur., (2016) uz dopuštenje izdavača)



Slika 2. CT s intratekalnim kontrastom kod istog pacijenta prikazuje istjecanje u frontalni sinus, nosnu šupljinu i lijevu orbitu (bijeke strjelice, preuzeto iz Bunevicius i sur., (2016) uz dopuštenje izdavača)

### 1.2.5.2. Biokemijski biljezi likvoreje

Biokemijski biljezi su objektivne mjere koje daju uvid što se zbiva unutar stanice ili određenog organizma u danom trenutku te mogu poslužiti kao rano upozorenje za neke patološke procese (npr. visoka vrijednost kolesterola je česti biokemijski biljeg za kardiovaskularne bolesti) (niehs.nih.gov).

U prošlosti se za dokazivanje likvoreje koristio test koji je uključivao stavljanje uzorka za koji se sumnja da sadrži likvor na komad tkanine ili papira pri čemu bi pojava znaka prstena („*halo sign*“) bila prediktor rinolikvoreje. Međutim, test je zastario te mu nedostaje prave korisnosti, jer je nepouzdan i većina tekućina, kada su pomiješane s krvlju, mogu dati isti rezultat (znak prstena). Kvantitativno određivanje glukoze bio je jedan od najranijih testova razvijenih za potvrdu rinolikvoreje. Razina glukoze u likvoru obično iznosi oko 60-70 % koncentracije u serumu, no razna patološka stanja mogu utjecati na koncentraciju glukoze u likvoru, što može dovesti do lažno negativnih rezultata. Nosni sekret, također, može sadržavati povišenu koncentraciju glukoze, zbog raznih razloga npr. kod intubiranih pacijenata, hiperglikemičnih pacijenata (pacijenti s dijabetesom) ili kod pacijenata s virusnim rinitisom, što može rezultirati lažno pozitivnim rezultatima. Trenutni zlatni standard za laboratorijsku biokemijsku potvrdu likvoreje u uzorku jest određivanje asijalotransferina, dok se nedavno i prostaglandin-D-sintetaza (*beta trace protein*) pokazala kao potencijalna alternativa (Torabi i sur., 2024).

### 1.5.2.3. Asijalotransferin

Prema Warnecke i sur. (2004) asijalotransferin (beta-2-transferin) je desijalirana izoforma transferina, koja ne sadrži ni jednu molekulu sijalinske kiseline. Može biti odvojen od ostalih izoformi koje sadrže od 1 do 7 sijalinskih kiseline te prikazan kao jedinstvena vrpca nakon npr. izoelektričnog fokusiranja s transferin-specifičnim imunofiksiranjem.

Dva N-glikozilacijska mjesta nalaze se na C-terminalnoj domeni na Asn 413 i Asn 611. Dva N-vezana kompleksa oligosaharidnih lanaca strukturno se očituju kao mono-, bi-, tri- ili tetra-antene. Svaka antena obično ima sijalinsku kiselinu vezanu na svojem kraju (Paterlini i sur., 2019).

Za razliku od serumskog transferina, koji postoji isključivo u sijaliranim glikoformama, transferin koji se nalazi u likvoru mješavina je sijalo- i asijaloglikoformi. Čini se da

asijalotransferin u likvoru potječe od serumskog transferina koji prolazi krvno-moždanu barijeru, dok je asijalotransferin sintetiziran lokalno u SŽS-u i ulazi u cirkulaciju likvora. Određivanje prisutnosti asijalotransferina u krvi može biti korisno i u dijagnostici sindroma glikoproteina deficitarnog ugljikohidratima, koji je često povezan sa zlouporabom alkohola. Važno je napomenuti da nedostatak asijalotransferina u likvoru abnormalan, što je već dokazano kod pacijenata s bolesti nestanka bijele tvari (*Vanishing White Matter Disease*), tipa leukodistrofije, kojeg karakterizira gubitak bijele tvari u mozgu (Brown i sur., 2012).

Najčešće metode kvalitativnog dokazivanja asijalotransferina su elektroforeza (npr. SDS-PAGE), izoelektrično fokusiranje i imunofiksacija. (Oakley i sur., 2016).

Uz svaku elektroforezu važno je da su uzorci seruma analizirani paralelno s uzorcima sekreta kako bi se osiguralo da se u slučaju kontaminacije sekreta sa serumom pacijenta prepozna sistemska elevacija asijalotransferina kod pacijenata s alkoholnom ili nealkoholnom cirozom jetre (Warnecke i sur., 2004).

Prema Dastych i sur. (2010) asijalotransferin moguće je u uzorku odrediti i HPLC-om (*High-performance liquid chromatography*), u kojoj se prisutnost asijalotransferina može odrediti mnogo brže u odnosu na elektroforetske metode (traje nekoliko minuta u usporedbi s nekoliko sati za elektroforetske metode), međutim ističu problem nedostatka komercijalno dostupnog kontrolnog materijala za provjeru preciznosti.

Za negativan rezultat asijalotransferina postoji mala vjerojatnost od istjecanja likvora. Testiranje na glukozu u rinoreji radilo se češće u prošlosti, no imalo je lošiju osjetljivost i specifičnost u usporedbi s beta-transferinom. Ako je test na beta-2 transferin pozitivan ili postoji sumnja na istjecanje likvora, slikovne tehnike su indicirane da se lokalizira mjesto istjecanja (Chan i sur., 2004).

#### **1.2.5.4. Prostaglandin D sintaza**

Prostaglandin D sintaza ili  $\beta$ -trace protein je još jedan od proteina koji se sintetiziraju lokalno u likvoru, a nalazimo ga i u drugim strukturama SŽS-a kao što su koroidni pleksus, leptomeninge i oligodendroglija (Tumani i sur., 1998).

Prisutan je u krvi i u CSF-u, no u različitim koncentracijama (Oakley i sur., 2016).

Zbog svoje visoke specifičnosti predstavlja pogodan alat za dijagnozu otolikovreje i rinolikvovreje. Može se određivati radijalnom imunodifuzijom, imunofluorometrijski te imunonefelometrijski (Tumani i sur., 1998).

Ispitivanje prostaglandnin D sintaze pokazao se osjetljivijim i jeftinijim od ispitivanja na asijalotransferin, također imunonefelometrijska metoda zahtjeva samo 15 minuta, što ju čini mnogo bržom, no važno je napomenuti da renalna insuficijencija ili postojanje bakterijskog meningitisa mogu utjecati na razinu ovog proteina ( Oakley i sur., 2016).

### **1.2.6. Liječenje likvovreje**

Liječenje likvovreje ovisi o uzroku, veličini i mjestu rupture dure. Ako se radi o malom istjecanju, može se razriješiti samo od sebe, dok veća istjecanja mogu zahtijevati kiruršku intervenciju. Drugi tretmani za istjecanje likvora mogu biti nazalno pakiranje, endoskopski i kirurški popravak (ncbi.nlm.nih.gov).

Konzervativno liječenje istjecanja likvora može uključivati mirovanje: takav odmor pomaže pri smanjivanju pritiska na pogođeno područje i omogućava istjecanju da se izliječi. OTC ( *over the counter* ) anestetici protiv bolova kao što su ibuprofen ili acetaminofen mogu se preporučiti za olakšanje glavobolja i boli u vratu. Konzumiranje mnogo tekućine pomaže kako bi se održale adekvatne razine tekućine u tijelu i smanjili simptomi. Korisno je i ograničiti uzimanje kofeina jer može pogoršati simptome i treba se izbjegavati ili ograničiti. Izbjegavanje aktivnosti koje povećavaju pritisak na ugroženo područje, kao što su kašljanje, kihanje ili naprezanje, može pomoći reduciranju simptoma ( Ramakrishnan i sur., 2022).

U slučajevima kraniofacijalne traume, postavljeno je da bi trebali biti odabrani konzervativno liječenje i promatranje jer se određen broj ovakvih slučajeva razriješi bez intervencije. Usprkos tome, rizik od meningitisa kod ovih pacijenata i dalje postoji, pa je ovakvo liječenje potrebno pažljivo odabrati (Bernal-Sprekelsen i sur., 2000).

Invazivnije terapije, kao što su kirurška intervencija, postaju potrebne u ozbiljnijim situacijama ili ako se nastave simptomi. Bliska suradnja s vještim kliničarem ključno je za izbor pravog smjera za svaki posebni slučaj. Procedura s epiduralnom krvnom zakrpom obično se koristi za likvora na razini kralježnice, a uključuje injektiranje malog volumena pacijentove vlastite krvi u epiduralni prostor, koji okružuje leđnu moždinu, kako bi se zatvorilo istjecanje i zaustavilo daljnji gubitak likvora ( Choi i sur., 2023).

Korištenje lumbalnih šantova ili ponovljenih lumbalnih punkcija kako bi se smanjio ICP, endoskopski popravak i, u slučajevima refraktornog ili posebno visokog ICP-a, ventrikuloperitonealnog šanta mogu biti efektivni, ali imaju relativno visoke stope komplikacija nakon zahvata ( Banks i sur., 2009).

EBP (*epidural blood patch*) obični se izvodi pod lokalnom anestezijom, pacijent leži na truhu. Anesteziolog utrne kožu i tkiva na donjem dijelu leđa, potom koristi iglu kako bi unio kateter u epiduralni prostor. Pacijentova krv, između 10 i 55 mL, tada se polako unosi kroz kateter, ispunjavajući epiduralni prostor, pritiskujući mjesto istjecanja kako bi se zatvorilo. Zahvat se smatra sigurnom i efektivnom pri liječenju istjecanja likvora, s visokom stopom uspjeha pri razrješavanju simptoma. Često se koristi kod pacijenata koji ne odgovaraju na konzervativno liječenje ili im se javlja rekurentno istjecanje (Signorelli i sur.,2021).

Postupak lumbalne drenaže uključuje unošenje katetera u lumbalnu regiju kralježničnog kanala, gdje se likvor akumulira. Lumbalna drenaža obično se izvodi kako bi se trenutačno smanjili simptomi i dalo vremena da se istjecanje likvora izliječi. Veličina, mjesto istjecanja, pacijentov jedinstven proces iscjeljivanja odlučujući su čimbenici koji određuju koliko dugo kateter mora ostati na apliciranom mjestu. Operativni postupak se često izvodi pod lokalnom ili općom anestezijom ( Khan i sur., 2019).

Endoskopsko nazalno pakiranje ( *endoscopic nasal packaging* ) je postupak koji uključuje stavljanje malog, apsorpcijskog materijala u nosnu šupljinu kako bi blokirao istjecanje i prevenirao gubitak cerebrospinalne tekućine. Postupak se obično izvodi pod općom anestezijom, koristi se endoskop, tanka, fleksibilna cijev s pridruženom kamerom sa svjetlom, koja vizualizira unutrašnjost nosa. Kirurg identificira mjesto istjecanja i koristi posebne instrumente kako bi stavio apsorpcijski materijal, npr. Gelofoam i/ili fibrinsko ljepilo, koji zatvara defekt u nosnoj šupljini. Materijal zatvara mjesto istjecanja i pomaže pri iscjeljivanju. Sam postupak je minimalno invazivan i ne zahtijeva veliki rez ili produljeno vrijeme oporavka, što ga čini popularnim izborom za pacijente koji žele izbjeći invazivnije kirurške opcije (CRANIAL Consortium, 2023).

U slučajevima s frakturama baze lubanje poslije operacije, endonazalni endoskopski pristup ima stopu uspjeha između 80 i 91%. Ostatak pacijenata je ponekad potrebna daljnja endoskopska revizija, gdje u manje od 10 % slučajeva zahtijeva otvorenu kiruršku reviziju (Englhard i sur., 2018).

Rizik od neuspješnih operacija češći je kod pacijenata s povišenim ICP-om ( Mirza i sur., 2005).

Vanjska ventrikularna drenaža (EVD) je neurokirurška opcija, koja uključuje postavljanje drenaže u ventrikule mozga kako bi se uklonila cerebrospinalna tekućina i smanjio tlak te omogućilo lakše iscjeljivanje područja istjecanja likvora. Tijekom postupka, mala rupica (vrsta trepanacije), napravi se 2-3 cm anteriorno od vjenčanog šava i tri centimetra od sagitalnog šava. Kateter se potom postavlja kroz rupicu u frontalni rog lateralnog ventrikula. Preferira se desna strana zbog rizika od nastanka lezija u dominantnom motornom korteksu. Cijev se zatim povezuje s eksternim drenažnim sustavom, koji se koristi za uklanjanje likvora. Količina uklonjene tekućine prati se sve dok se istjecanje potpuno ne izliječi. Postupak se izvodi pod općom anestezijom, a nakon njega slijedi period praćenja kako bi se osiguralo da se tlak uspješno snizio (Perez-Roman i sur., 2022).

U slučajevima jatrogenih ozljeda tijekom intrakranijalnih operacija, očito liječenje je popravak oštećenog mjesta, koje može zahtijevati više postupaka ili adjuvantnu terapiju. Kod pacijenata s povišenim ICP-om, smatra se da ugradnja podležećeg koštanog presatka (*underlay bone graft*) nudi dodatnu strukturalnu podršku za popravak baze lubanje kod ekstenzivnih lezija. Budući da je baza lubanje kod spontanih istjecanja likvora znatno oslabljena i može se lako slomiti, potreban je oprez pri oblikovanju i postavljanju presatka. Specifični odabrani materijal za presađivanje ovisi o veličini defekta, položaju i osobnim preferencijama kirurga (Torres-Bayona i sur., 2021).

### **1.2.7. Prognoza za pacijente s likvorejom**

Kao što je već navedeno, ukupna prognoza istjecanja likvora je vrlo povoljna, jedno istraživanje pokazuje stopu uspjeha od 90% nakon prvog pokušaja endoskopskog popravka rinoreje, dok drugo 98 % kod traumatskih, jatrogenih i kongenitalnih uzroka (Daele i sur., 2011., Banks i sur., 2009).

Pacijenti s težim abnormalnostima baze lubanje, lateralnim sfenoidalnim istjecanjima, povišenim indeksom tjelesne težine, spontanom rinolikvorejom i povišenim BMI-jem skloniji su rekurentnim istjecanjima. Takvo ponavljanje istjecanja likvora se može dogoditi i kod pacijenata u srednjim godinama, koji su pretili i imaju “empty sella” sindrom (prisutnost povećane *selle turcice*, koja sadrži preoblikovanu hipofizu pritiskom stanjenu uz stražnji i donji zid selle - proširenje subarahnoidnog prostora u samu *sellu* kao rezultat nepotpunog kontinuiteta selarne dijafragme (ncbi.nlm.nih.gov)).



Najopasnija potencijalna komplikacija likvoreje je bakterijski meningitis; čini se da je rizik od razvoja meningitisa najveći u preoperativnom periodu kod onih koji imaju potvrđenu rinolikvoreju, dok od njih su najugroženiji oni koji su doživjeli traumatsku ozljedu (30 %). Meningitis je utvrđen kod 18,2 % pacijenata s traumom i trećine pacijenata podvrgnutih operacijama sfenoidalne kosti, baze lubanje i klavarije. Međutim, rizik od razvoja meningitisa ostaje 19% za pacijente s perzistentnim istjecanjima likvora te su takvi pojedinci ugroženi sve do uspješnog operativnog zatvaranja istjecanja ( Daudia i sur., 2007).

### **1.2.8. Prevencija i edukacija pacijenata**

Jedan od načina kako prevenirati istjecanja likvora je izbjegavanje situacije ili aktivnosti koje bi mogle ozlijediti mozak ili leđnu moždinu. Ljudi s bolestima vezivnog tkiva ili povijesti operacije mozga ili leđne moždine mogu biti osjetljiviji i trebali bi biti oprezniji od ostalih. Druga važna komponenta kontrole i prevencije istjecanja likvora je edukacija pacijenata. Znakovi upozorenja i simptomi istjecanja likvora trebaju se objasniti pacijentima te je potrebno istaknuti da zatraže liječničku pomoć čim primijete iste. Pacijenti također trebaju biti svjesni značaja pridržavanja preporuka prilikom liječenja; odmor u krevetu, hidracija i izbjegavanja aktivnosti koje povisuju intrakranijalni tlak te jakog ispuhivanja nosa (ncbi.nlm.nih.gov).

### **1.2.9. Poboljšanje zdravstvenog tima za bolje ishode**

Ispitivanje istjecanja likvora zahtjeva brojne aspekte zdravstvene skrbi te funkcionira putem “interprofesionalnog tima”. Pacijent s početnom prezentacijom se može pojaviti na bilo kojoj razini zdravstvene skrbi i kod bilo kojeg člana zdravstvenog sustava, kao što su liječnici i medicinske sestre. Medicinski biokemičari interpretiraju rezultate ispitivanja uzoraka na koje se sumnja da sadrže likvor, dok radiološki tehničari sudjeluju u izvođenju slikovnih tehnika, čije rezultate interpretiraju radiolozi, a kirurzi potom nude zaključne kirurške tretmane. Efektivna komunikacija između svih članova zdravstvenog sustava od velike je važnosti kako bi se eliminirale zdravstvene pogreške i minimizirala šteta za pacijenta, upravo zato što mnogi od pacijenata često moraju produljeno ostati u bolnici (ncbi.nlm.nih.gov).

## 2. **Obrazloženje teme**

Istjecanje likvora iz SŽS-a predstavlja veliku opasnost za osobu kod koje se dogodi zbog mogućih infektivnih komplikacija kao što su intrakranijalni apsces ili bakterijski meningitis, a pravovremena i precizna dijagnoza je izuzetno važna za ispravno liječenje.

Biokemijska analiza sekreta koji istječe iz nosa, uha ili rjeđe očiju u kombinaciji sa slikovnim tehnikama omogućuje ranu i točnu dijagnostiku ovog stanja. Odabir pouzdanog biokemijskog biljega te odgovarajuće metode određivanja predstavlja izazov za medicinskog biokemičara.

Asijalotransferin je biokemijski biljeg koji se koristi za dokazivanje likvoreje jer se stvara u SŽS-u i nalazimo ga u likvoru. Za kvalitativno dokazivanje asijalotransferina se rutinski koriste različite elektroforetske metode.

Cilj ovog rada je usporediti dvije kvalitativne metode za dokazivanje asijalotransferina u uzorcima za koje se sumnja da su likvor ili da imaju primjese likvora koji istječe iz SŽS-a sa svrhom odabira najpouzdanije metode koja će se koristiti u rutinskom radu.

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Uzorci**

U Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb analizirano je 27 uzoraka za koje je postojala sumnja da se radi o istjecanju CSF-a. U svim uzorcima je u sklopu rutinske obrade izmjerena koncentracija glukoze, kalija i ukupnih proteina te u svježim uzorcima određena prisutnost asijalotransferina in-house metodom. Analiza asijalotransferina komercijalnom metodom proizvođača Sebia je napravljena na uzorcima koji su ostali nakon redovne laboratorijske obrade bolesnika te bili pohranjeni na -20 °C.

#### **3.2. Metode za dokazivanje asijalotransferina**

##### **3.2.1. In-house metoda za dokazivanje asijalotransferina**

Materijali potrebni za izvođenje in-house metode dokazivanja asijalotransferina u uzorku:

##### Oprema:

- ❖ Izvor struje visokog napona ( 500V tijekom predfokusiranja i 1700V tijekom izoelektričnog fokusiranja)
- ❖ Kada za elektroforezu s vodenim hlađenjem i elektrodama za IEF ( izoelektrično fokusiranje)
- ❖ Izvor intenzivnog hladnog gela
- ❖ Film za vezivanje poliakrilamidnog gela (nosač gela)
- ❖ Komprimirani listići celuloze za nanošenje uzoraka
- ❖ Mostovi od debelog filter papira za anodnu i katodnu otopinu

##### Reagensi:

- ❖ Akrilamid >99%
- ❖ Bis-akrilamid (N,N-metilenbisakrilamid)
- ❖ Amberlit
- ❖ Amonij-persulfat
- ❖ Riboflavin-5-fosfat
- ❖ Sintetski amfoliti za uspostavljanje pH gradijenta. Bio-Rad 3/10
- ❖ Orto-fosfatna kiselina, min w=85%

- ❖ Redestilirani glicerol
- ❖ Etilen-diamin
- ❖ Poliklonalno antitijelo na humani transferin, Abbot Laboratories
- ❖ Srebrov nitrat ( $\text{AgNO}_3$ )
- ❖ Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- ❖ Formalaldehid ( $\text{HCHO}$ ), w=37%
- ❖ Octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), w=1%
- ❖ Kalijev heksacijanoferrat(III), ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )  $\geq 99\%$
- ❖ Natrijev tiosulfat pentahidrat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ )

### **Načelo in-house metode:**

U in-house metodi proteini se izoelektričnim fokusiranjem razdvajaju na osnovi razlika u izoelektričnim točkama. Pod djelovanjem električne struje proteini putuju u poliakrilamidnom gelu s pH gradijentom i ugušćuju se u uskom pH području koje odgovara izoelektričnoj točki (pI) pojedinog proteina. Nakon razdvajanja provodi se postupak imunofiksacije s antiserumom na transferin pri čemu nastaju imunokompleksi. Iz gela se fiziološkom otopinom isperu svi nevezani proteini, a kompleksi koji ostaju u gelu oboje se srebrom. Uz uzorak sekreta sa sumnjom na likvoreju uvijek se analizira i uzorak likvora drugog pacijenta kao pozitivna kontrola te uzorak seruma kao negativna kontrola (Interni dokument, KBC Zagreb, KZLD, 2024).

### **Opis postupka:**

Predanalitička faza in-house metode uključuje

1. Pripremu potrebnih otopina: otopina bis-akrilamida, štok otopina riboflavin-5-fosfata, otopina amonij-persulfata, otopina glicerola, anodni pufer (razrijeđena otopina ortofosfatne kiseline), katodni pufer (razrijeđena otopina etilen-diamina), otopinu srebrova nitrata, otopinu octene kiseline za stopiranje boje.
2. Pripremu kalupa za izlijevanje gela
3. Pripremu otopine gela
4. Izlijevanje gela
5. Pripremu uzoraka – cerebrospinalna tekućina (pozitivna kontrola) se postavlja nativno, sekret se stavlja redom nativno, dva puta razrijeđen, pet puta razrijeđen i deset puta razrijeđen (potrebno razrjeđenje ovisi o koncentraciji ukupnih proteina), serum (negativna kontrola) se razrjeđuje s vodom ovisno o koncentraciji transferina

6. Izoelektrično fokusiranje u pH gradijentu 3-10
7. Oslobođanje gela iz kalupa (neposredno prije elektroforeze)

Analitička faza in-house metode uključuje:

1. Postavljanje poliakrilamidnog gela
2. Nanošenje uzoraka. Prije nanošenja uzorci se razrjeđuju s fiziološkom otopinom ovisno o sadržaju ukupnih proteina (najčešće u omjeru 1:2, 1:5 i 1:10)
3. Postavljanje sustava za izoelektrično fokusiranje
4. Predfokusiranje i upijanje uzoraka
5. Izoelektrično fokusiranje
6. Imunofiksaciju
7. Bojanje imunoprecipitata srebrom

### **3.2.2. Komercijalni test za dokazivanje asijalotransferina proizvođača Sebia**

Materijali potrebni za izvođenje testa:

Oprema:

- ❖ HYDRASYS System SEBIA
- ❖ Vlažna komora za pohranu
- ❖ Vodilica predloška SEBIA
- ❖ Komplet dodataka za HYDRASYS CSF SEBIA
- ❖ Pipete: 2  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L i 5 mL
- ❖ Za kvantitativnu analizu gela prema izboru: denzitometar / skener koji može skenirati ploče gela veličine 82 x 51 mm sa softverom za ravne skenere HYRYS SEBIA, GELSCAN SEBIA ili PHORESIS

Reagensi:

- ❖ Agarozni gelovi (spremni za upotrebu) – agarozna, puferna otopina pH  $8,9 \pm 0,5$
- ❖ Puferirane trake (spremne za upotrebu) – puferna otopina pH  $9,2 \pm 0,5$
- ❖ Razrjeđivač uzoraka CSF/A1AT/TRF spreman za upotrebu) – A1AT-alfa-1-antitripsin, TRF-transferin
- ❖ Zasićena otopina (spremna za upotrebu) – za zasićenje uzoraka željezom

- ❖ Rezirjeđivač antiseruma CSF/TRF (spreman za upotrebu) – puferska otopina pH  $7,0 \pm 0,5$
- ❖ A1AT/TRF otopina za ispiranje (spremna za upotrebu) – puferska otopina pH  $10,5 \pm 0,5$
- ❖ Rehidracijska otopina (spremna za upotrebu) - za rehidraciju agaroznog gela prije i poslije koraka vizualizacije na temelju peroksidaze
- ❖ TFF1/TFF2 otapalo (spremno za upotrebu) – za pripremu TTF vizualizacijske otopine
- ❖ TFF1 (gotova otopina) – za vizualizaciju proteina dobivenih imunofiksacijom pomoću peroksidazom obilježenog antiseruma
- ❖ TFF2 (gotova otopina) – za vizualizaciju proteina dobivenih imunofiksacijom pomoću peroksidazom obilježenog antiseruma
- ❖ Aplikatori (spremni za upotrebu)
- ❖ Filtar papir – tanki
- ❖ Češljasti filtar papir
- ❖ Filtar papir – debeli
- ❖ Anti-transferin antiserum – sadrži imunoglobuline sisavaca protiv humanog transferina, konjugirane peroksidazom, stabiliziran u lificiranom obliku
- ❖ Vodikov peroksid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)
- ❖ Otopina za odbojavanje – radna otopina sadrži kiselinu otopinu pH  $\approx 2$
- ❖ Otopina za pranje HYDRASYS wash solution – radna otopina za pranje sadrži pufersku otopinu pH =  $8,7 \pm 0,5$

### **Načelo Sebia testa:**

$\beta 2$  transferin desijalirani je oblik transferina. Taj desijalirani oblik prisutan je u velikim proporcijama u likvoru i perilimfi. Sijalirani oblik transferina normalna je komponenta i seruma i likvora. Djelomično do potpuno desijalirani oblici prisutni su u malim omjerima u normalnom serumu zdravih ispitanika. Prisutnost frakcije  $\beta 2$  transferina u sekretima nosa i uha pokazuje curenje CSF. Test se zasniva na elektroforetskoj separaciji različitih izooblika transferina (sijaliranih, djelomično do potpuno desijaliranih oblika), nakon čega slijedi imunofiksacija peroksidazom obilježenog antitijela anti-transferina. Antitijelo jednako reagira sa svim oblicima transferina. Upotreba tog antitijela obilježenog peroksidazom pojačava osjetljivost i omogućuje detekciju frakcije  $\beta 2$  transferina u biološkom fluidu sve do koncentracije od 1  $\mu\text{mol/L}$  do 1,25  $\mu\text{mol/L}$  (Sebia :Hydragel 6  $\beta 2$  Transferrin(e),2018).

### Opis postupka:

Predanalitička faza:

1. Priprema uzoraka – miješaju se jednaki volumen uzorka sekreta i prethodno homogenizirane zasićene otopine
2. Priprema antiseruma
3. Priprema otopine za odbojavanje
4. Priprema otopine za pranje HYDRASIS wash solution

Analitička faza:

Sustav HYDRASYS je poluautomatizirani višeparametarski instrument. Automatizirani koraci uključuju obradu HYDRAGEL agaroznih gelova sljedećim redoslijedom:

1. Nanošenje uzoraka
2. Elektroforetska migracija
3. Inkubacija s reagensom
4. Zaustavljanje enzimatske reakcije
5. Upijanje i konačno sušenje gela

Ručni koraci podrazumijevaju:

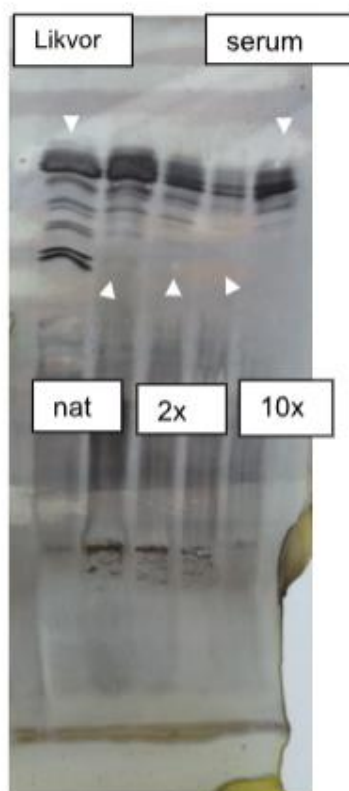
1. baratanje uzorcima i gelovima
2. nanošenje reagensa i namještanje instrumenta za rad

### **3.2.3. Interpretacija rezultata**

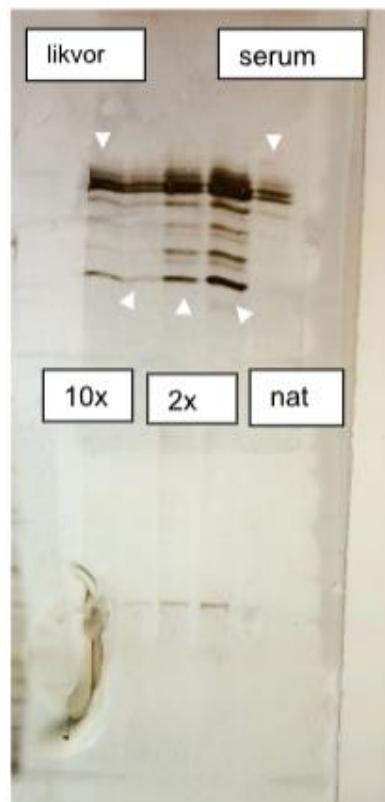
#### **3.2.3.1. Interpretacija rezultata in-house metode:**

Rezultat nalaza asijalotransferina u uzorku se uspoređuje s pozitivnom i negativnom kontrolom. Kao pozitivna kontrola koristi se slučajan uzorak likvora poznatog pacijenta, a kao negativna kontrola uzorak seruma ispitivanog pacijenta. Prisustvo obojane vrpce u uzorku u razini pozitivne kontrole ukazuje na pozitivan rezultat. Asijalotransferin je najsporija izoforma transferina jer ne sadrži sijalinske kiseline te se može vidjeti kao zadnja vrpca kao što je prikazano na Slici 3.

Asijalotransferin nije prisutan (negativan)



Asijalotransferin prisutan (pozitivan)



Slika 3. Interpretacija rezultata in-house metode

### 3.2.3.2. Interpretacija rezultata Sebia testa:

Nakon završne obrade gela, rezultati se trebaju interpretirati u što kraćem roku jer se kakvoća gela s vremenom pogoršava, ovisno o uvjetima čuvanja (uključujući svjetlo, toplinu...). Interpretacija rezultata provodi se u dva uzastopna koraka: kvalitativna analiza (vizualnim opažanjem) iza čega slijedi kvantitativna analiza denzitometrijskim skeniranjem.

#### Kvalitativna analiza

Vizualno opažanje elektroforetskog obrasca omogućuje detekciju desijalirane frakcije transferina (zване također 0-sijalo frakcija) u uzorcima sekreta. Kada se desijalirana frakcija transferina vizualizira više nego frakcija disijalotransferina, uzorak je pozitivan. Tada je moguće vizualno razdvojiti uzorke kontaminirane plazmom od uzoraka koji nisu kontaminirani.

#### Kvantitativna denzitometrijska analiza razdvojenih frakcija

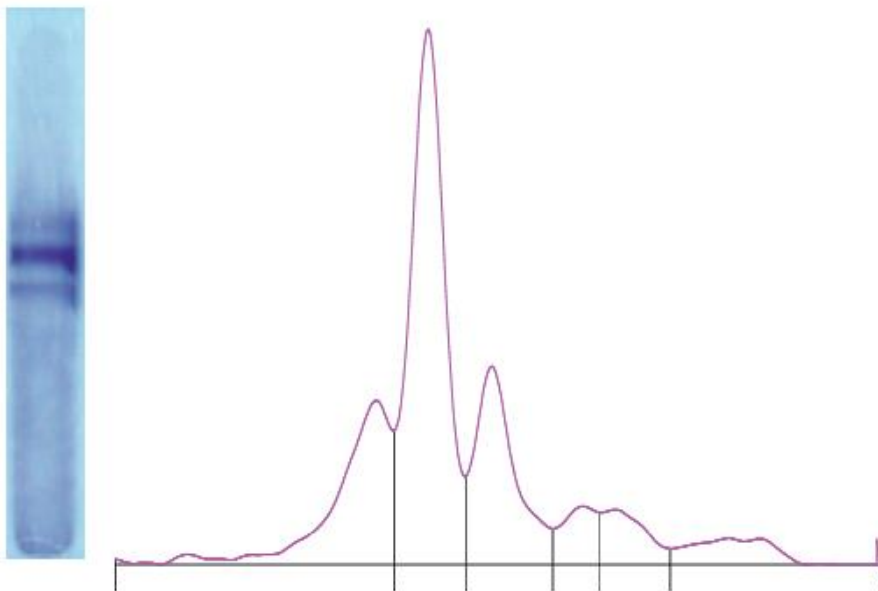


Kvantitativna analiza omogućuje određivanje relativne količine 0-sijalo frakcije i 2-sijalo frakcije u uzorku sekreta. U svim slučajevima (likvor ili obrazac seruma), uzorak je pozitivan kada je omjer 0-sijalo / 2-sijalo veći od 1. Kada je taj omjer jednak ili ispod 1, preporučuje se analizirati serum istoga bolesnika kako bi se usporedio omjer 0-sijalo / 2-sijalo s omjerom uzorka sekreta. Ako je omjer 0-sijalo / 2-sijalo dobiven iz uzorka seruma jednak ili viši od omjera uzorka sekreta, desijalirani transferin mjereno u uzorku sekreta potječe iz plazme, a rezultat analize bit će tada negativan. Ako je omjer 0-sijalo / 2-sijalo dobiven iz uzorka seruma jednak ili viši od omjera uzorka sekreta, dio desijaliranog transferina mjereno u uzorku sekreta potječe iz likvora, a rezultat analize tada će biti pozitivan.

U denzitometru digitalni skener s velikom rezolucijom snimanja uz uporabu vidljivog i UV-svjetla povezan je s osobnim računalom i omogućuje vrlo brzo preslikavanje. Kvantitativna analiza preslike čini se s pomoću odgovarajućih računalnih programa ([www.fer.unizg.hr/\\_download/repository/Ivan\\_Piljac\\_-\\_Elektroforeza.pdf](http://www.fer.unizg.hr/_download/repository/Ivan_Piljac_-_Elektroforeza.pdf)).

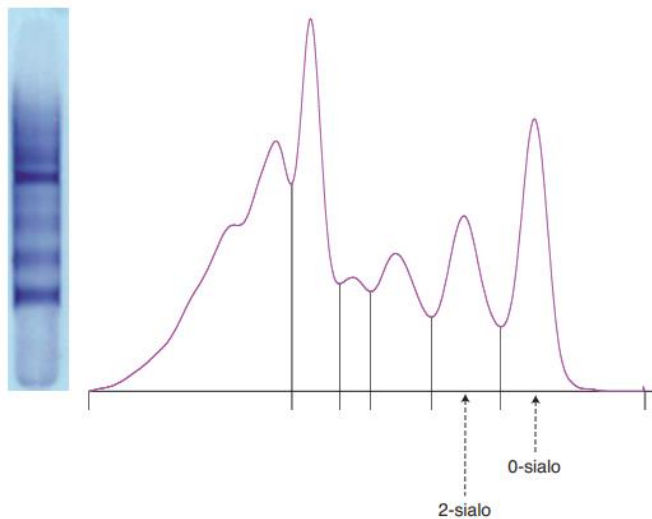
Primjeri denzitometrijske analize frakcija nakon razdvajanja metodom na Sebia sustavu

#### *Negative secretion sample*



Slika 4. Negativan rezultat uzorka sekreta

Positive secretion sample not contaminated



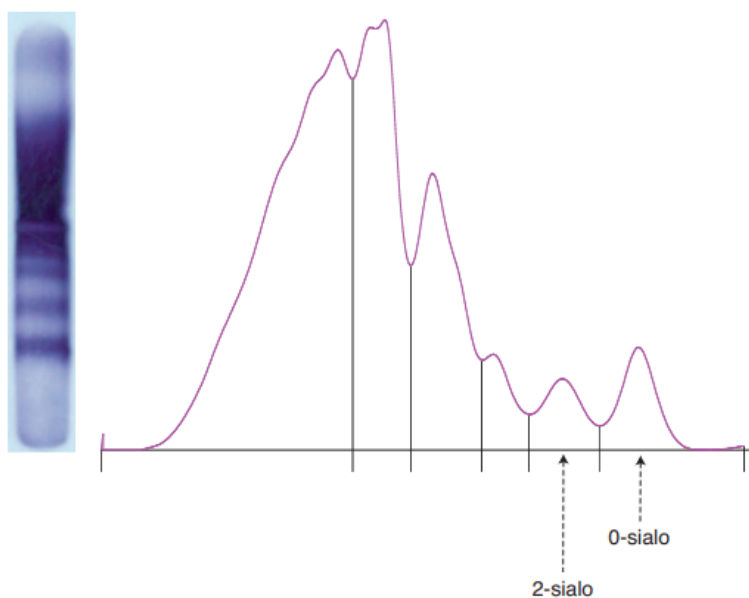
Fractions %

2-sialo 13.5  
0-sialo 16.0

$$R = \frac{0\text{-sialo}}{2\text{-sialo}} = 1.18$$

Slika 5. Pozitivan rezultat uzorka koji nije kontaminiran plazmom

Positive secretion sample contaminated with plasma



Fractions %

2-sialo 4.0  
0-sialo 5.1

$$R = \frac{0\text{-sialo}}{2\text{-sialo}} = 1.28$$

Slika 6. Pozitivan rezultat uzorka koji je kontaminiran plazmom

U Tablici 1. je prikazan način interpretacije rezultata dobivenih nakon denzitometrijskog skeniranja.

Tablica 1. Interpretacija rezultata prema omjeru 0-sijalo / 2-sijalo dobivenim nakon denzitometrijskog skeniranja

Omjer	Analizirani uzorak		Zaključak
	Uzorak sekrecije	Uzorak seruma	
0-sijalo / 2-sijalo	> 1	Analiza nije potrebna	Pozitivan
0-sijalo / 2-sijalo	≤ 1	0-sijalo / 2-sijalo iz seruma ≥ 0-sijalo / 2-sijalo iz uzorka sekreta	Negativan (kontaminacija plazmom)
		0-sijalo / 2-sijalo iz seruma < 0-sijalo / 2-sijalo iz uzorka sekreta	Pozitivan (dio 0-sijalo potječe od CSF)

### 3.3. Statističke metode

Za kliničku procjenu ove dvije metode analizirani su sljedeći parametri: osjetljivost, specifičnost, točnost, pozitivna prediktivna vrijednost (PPV), negativna prediktivna vrijednost (NPV), koji su matematički određeni i izraženi preko sljedećih formula:

$$OSJETLJIVOST = \frac{\text{broj stvarno pozitivnih}}{\text{broj stvarno pozitivnih} + \text{broj lažno negativnih}}$$

$$SPECIFIČNOST = \frac{\text{broj stvarno negativnih}}{\text{broj stvarno negativnih} + \text{broj lažno pozitivnih}}$$

$$TOČNOST = \frac{\text{broj stvarno pozitivnih} + \text{broj stvarno negativnih}}{\text{broj stvarno pozitivnih} + \text{broj stvarno negativnih} + \text{broj lažno negativnih} + \text{broj lažno pozitivnih}}$$

$$PPV = \frac{\text{broj stvarno pozitivnih}}{\text{broj stvarno pozitivnih} + \text{broj lažno pozitivnih}}$$

$$NPV = \frac{\text{broj stvarno negativnih}}{\text{broj stvarno negativnih} + \text{broj lažno negativnih}}$$

Za usporedbu ove dvije kvalitativne metode korišten je i Cohenov kapa koeficijent, koji pokazuje u kojoj će se mjeri slagati procjene dviju metoda kada one procjenjuju isti analit. Kako bi se izračunao Cohenov kapa koeficijent potrebno je napraviti kontingencijsku 2x2 tablicu koja prikazuje broj pozitivnih i negativnih rezultata za svaku metodu.

Tablica 2. Primjer kontingencijske tablice

	<b>Ocjenjivač 2</b>		
<b>Ocjenjivač 1</b>	1	0	Ukupno
1	$n_{11}$	$n_{12}$	$n_{1.}$
0	$n_{21}$	$n_{22}$	$n_{2.}$
<b>Ukupno</b>	$n_{.1}$	$n_{.2}$	<b>N</b>

Cohenov kapa koeficijent se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$\kappa = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$$

gdje su  $p_0$  ( $p$  nula) postotno slaganje, a  $p_e$  očekivano slaganja, koja se računaju na sljedeći način:

$$p_0 = \frac{n_{11} + n_{22}}{N}$$

$$p_e = \frac{n_{1.} \cdot n_{.1} + n_{2.} \cdot n_{.2}}{N^2}$$

#### 4. Rezultati

U Tablici 2. su prikazani rezultati dokazivanja asijalotransferina u uzorcima sa sumnjom na istjecanje CSF-a. Analiza je napravljena u 27 uzoraka od kojih se samo u jednom nije mogla jasno odrediti prisutnost ili odsustvo asijalotransferina, stoga uzorak tog pacijenta nije uključen u izračun osjetljivosti, specifičnosti i točnosti. Važno je napomenuti da su ovakvi uzorci specifični i nisu česti u dnevnoj rutini što objašnjava njihov ograničeni broj.

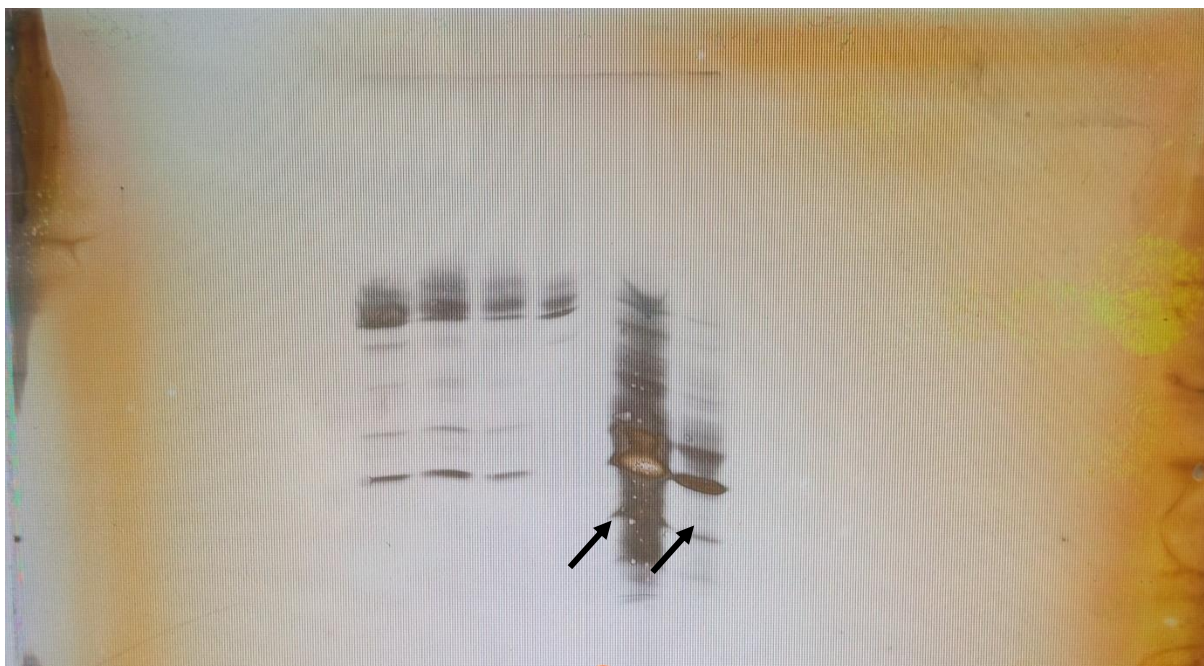
Od ukupno 26 uzoraka u kojima je bilo moguće definitivno odrediti prisutnost asijalotransferina 16 je bilo pozitivno i 10 negativno određeno in-house metodom, a 17 pozitivno te 9 negativno Sebia metodom. Vidimo da je neslaganje u analizi između dvije metode samo kod jednog uzorka pacijenta. U sljedećoj tablici prikazani su rezultati analiza i pridružene kliničke slike pacijenata.

Tablica 3. Rezultati dokazivanja asijalotransferina dvjema metodama: in-house metodom i metodom proizvođača Sebia

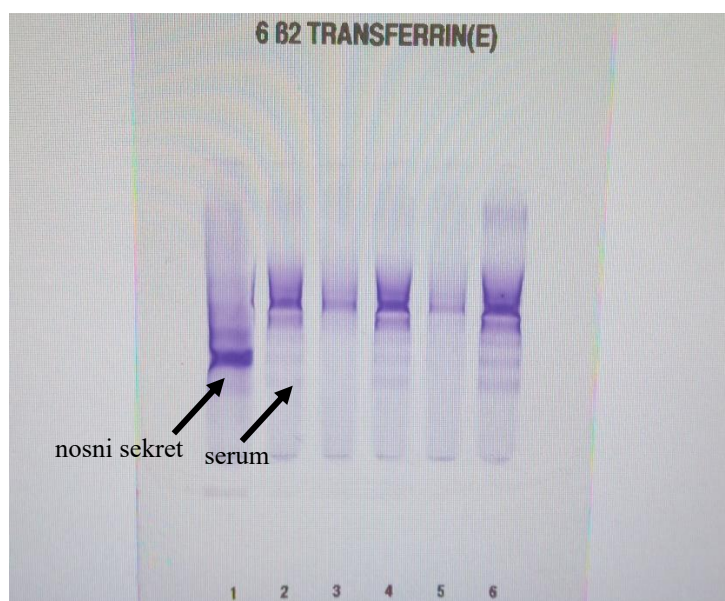
	<b>In-house</b>	<b>Sebia</b>	<b>Klinički podaci</b>
<b>E.F.</b>	1	1	nazorinolikvoreja
<b>M.N.</b>	1	1	rinolikvoreja
<b>Z.S.</b>	1	1	istjecanje iz rane nakon operacije
<b>K.M.</b>	0	0	negativan - sumnja nakon traume zbog prometne nesreće
<b>M.M.</b>	0	0	negativna - prehlada COVID
<b>E.K.</b>	1	1	rinolikvoreja nastala zbog dehiscencije lateralne koštane pregrade sfenoidnog sinusa
<b>T.M.</b>	1	1	kranionazalna fistula - nazolikvoreja
<b>S.F.</b>	1	1	prometna nesreća - fraktura baze lubanje- likvoreja
<b>K.D.</b>	0	1	otitis Pseudomonas aeurog.
<b>J.T.</b>	1	1	rinolikvoreja – vazomotorni i alergijski rinitis

<b>K.S.</b>	0,5	0,5	subarahnoidalno krvarenje
<b>S.P.</b>	0	0	negativan – Folikularni/nodularni/non- Hodgkinov limfom velikih stanica
<b>S.O.</b>	0	0	negativna - rinoreja
<b>S.S.</b>	1	1	rinolikvoreja - encefalokela
<b>M.K.</b>	0	0	negativan - rinoreja
<b>I.K.</b>	0	0	negativan - poslije operacije paranazalnih sinusa
<b>I.M.</b>	1	1	negativan - rinoreja
<b>N.G.</b>	1	1	rinolikvoreja
<b>P.L.</b>	1	1	rinolikvoreja
<b>I.J.</b>	1	1	postoperacijska rinolikvoreja
<b>A.B.</b>	0	0	kronički sinusitis
<b>N.M.</b>	1	1	rinolikvoreja - trauma glave
<b>S.O.</b>	0	0	rinoreja
<b>V.C.</b>	1	1	pozitivan - prometna nesreća, postavljena nazogastrična sonda
<b>T.T.</b>	1	1	rinolikvoreja - defekt lamine cribrose
<b>S.K.</b>	1	1	likvoreja - operacija tumora spinalnog kanala
<b>M.I.</b>	0	0	alergijski rinitis

Rezultati ocijenjeni s 1 označavaju pozitivan rezultat, oni s 0 negativan rezultat dok kod rezultat ocijenjenog s 0,5 nije bilo moguće jasno ocijeniti kao pozitivan ili negativan.

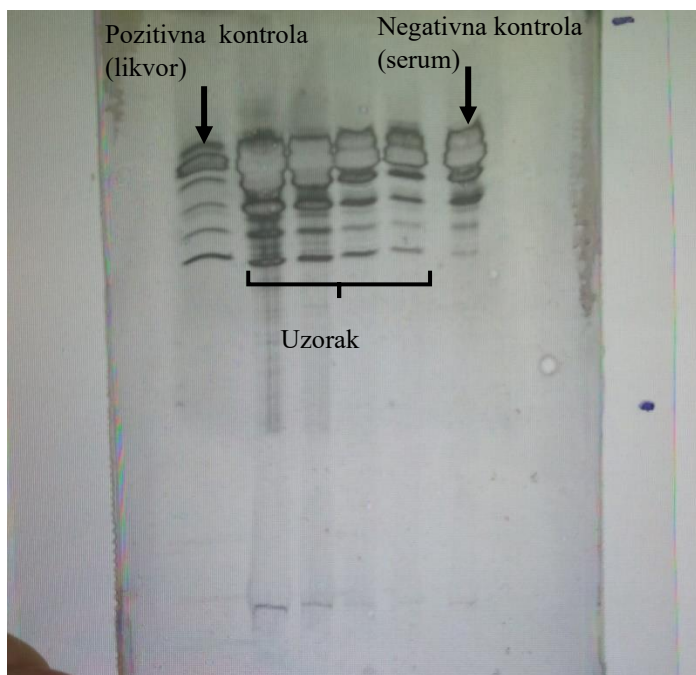


Slika 7. Primjer rezultata dobivenog in-house metodom, čiji rezultat nije jasno pozitivan ni negativan (označeno crnim strjelicama)



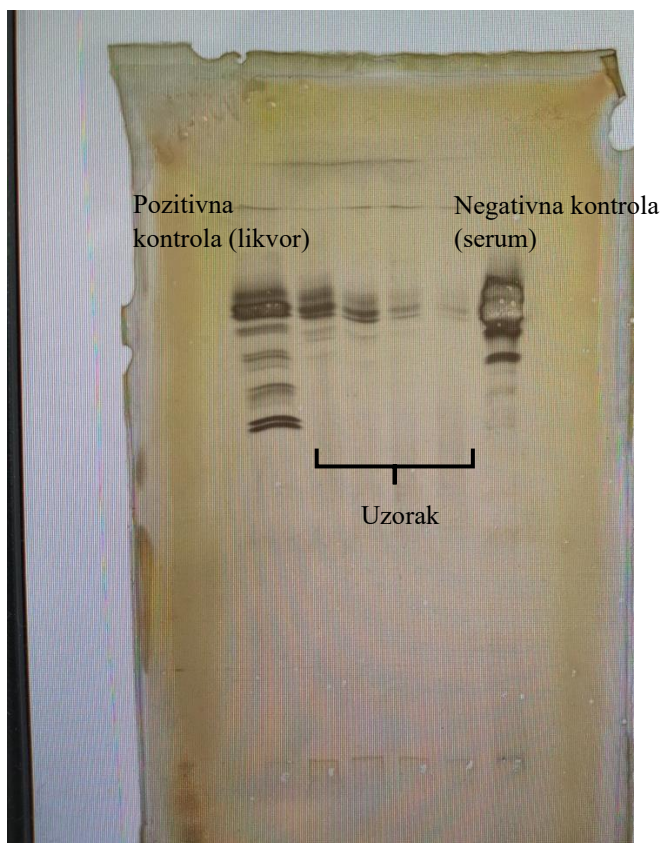
Slika 8. Primjer rezultata dobivenog Sebia komercijalnom metodom, čiji rezultat nije jasno pozitivan ni negativan (označeno crnim strjelicama)

Na Slikama 9. i 10. nalaze se primjeri pozitivnog i negativnog rezultata in-house metode dokazivanja asijalotransferina.



Slika 9 : Pozitivan nalaz asijalotransferina dobiven pomoću in-house metode



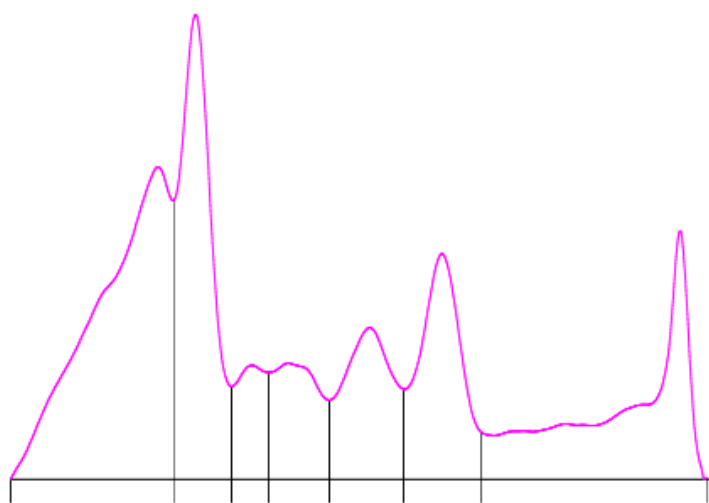


Slika 10. Negativan rezultat asijalotransferina dobiven pomoću in-house metode

Na slikama u nastavku su prikazani neki rezultati analize prisutnosti asijalotransferina u ispitivanim uzorcima Sebia metodom (vizualni pregled + denzitometrija). Na Slikama 11 i 12 je primjer pozitivnog nalaza, dok je na Slikama 13 i 14 primjer negativnog nalaza asijalotransferina.



Slika 11. Pozitivan nalaz asijalotransferina u sekretu iz nosa (uzorak označen strelicom). Vizualni pregled gela nakon elektroforetskog razdvajanja Sebia metodom



2-sialo: 9,8

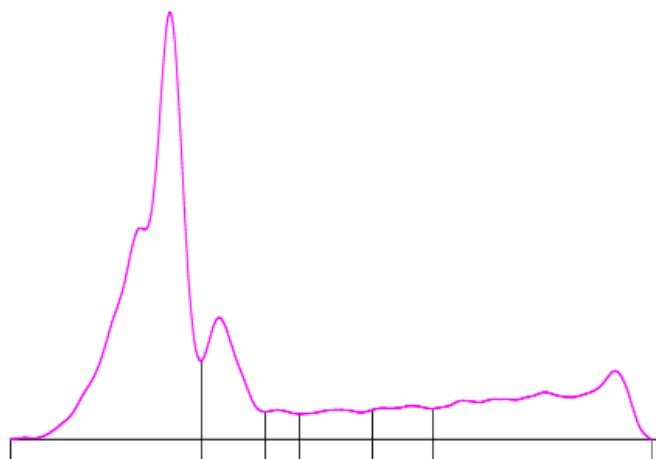
0-sialo: 12,1

$R = 0\text{-sialo}/2\text{-sialo} = 1,2$

Slika 12. Densitometrijski prikaz nalaza asijalotransferina iz sekreta nosa nakon elektroforetskog razdvajanja metodom Sebia: pozitivan nalaz



Slika 13. Negativan nalaz asijalotransferina u sekretu iz nosa (uzorak označen strelicom). Vizualni pregled gela nakon elektroforetskog razdvajanja Sebia metodom



Slika 14. Densitometrijski prikaz nalaza asijalotransferina iz sekreta nosa nakon elektroforetskog razdvajanja metodom Sebia: negativan nalaz

U Tablici 4 su prikazani rezultati analize asijalotransferina u ispitivanim uzorcima in-house metodom i komercijalnom metodom proizvođača Sebia.

Tablica 4. Usporedba rezultata dokazivanja asijalotransferina dvjema metodama

	<b>TP</b>	<b>TN</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>
<b>In-house metoda</b>	16	10	0	0
<b>Sebia</b>	16	9	1	0

TP: stvarno pozitivni; TN: stvarno negativni; FP: lažno pozitivni i FN: lažno negativni rezultati

Izračunate vrijednosti osjetljivosti, specifičnosti, točnosti, pozitivne i negativne prediktivnih vrijednosti prikazane su u Tablici 5.

Tablica 5. Izračunate vrijednosti osjetljivosti, specifičnosti, točnosti, PPV i NPV dviju metoda

	<b>osjetljivost</b>	<b>specifičnost</b>	<b>točnost</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
<b>in-house</b>	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
<b>sebia</b>	100,00%	90,00%	96,15%	94,12%	100,00%

Za usporedbu dviju kvalitativnih metoda korišten je Cohenov kappa koeficijent kojim se prikazuje u kojoj se mjeri slažu procjene ispitivača (metoda/analizatora/ispitivača) kada procjenjuju istu varijablu. Za izračun Cohenovog kappa koeficijenta napravljena je kontingencijska tablica koja prikazuje broj slaganja i neslaganja između dvije metode. Rezultati su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Kontingencijska tablica – usporedba dviju metoda

	<b>In-house pozitivan</b>	<b>In-house negativan</b>	<b>ukupno</b>
<b>Sebia pozitivan</b>	16	1	17
<b>Sebia negativan</b>	0	9	9
<b>ukupno</b>	16	10	26

Vrijednosti postotnog, očekivanog slaganja i Cohenovog koeficijenta iznose:

**$p_0 = 0,9615$ ,  $p_e = 0,5355$ ,  $\kappa = 0,917$**

## 5. Rasprava

Likvoreja predstavlja ozbiljan rizik za pacijenta kojem još nije dijagnosticirana, prvenstveno zbog potencijalnog razvoja infekcije. Čak i uz biokemijske analize sekreta u kombinaciji sa slikovnim tehnikama, potvrda likvoreje, točna i precizna lokalizacija istjecanja te odabir odgovarajućeg liječenja predstavljaju i danas izazov za zdravstveno osoblje. Razvojem novih metoda i tehnologija kliničarima se olakšava rana dijagnostika ovog stanja. Važno je pri tome točno ocijeniti performanse novih metoda u usporedbi sa starim, biti svjestan svih mogućnosti i ograničenja metode te pri tumačenju rezultata znati sve kliničke podatke o pacijentu kako ne bi došlo do pogreške.

Elektroforetske metode za kvalitativno određivanje asijalotransferina omogućavaju nam neinvazivan, siguran i pouzdan pristup prilikom utvrđivanja prisutnosti potencijalnog istjecanja likvora. Karakterizira ih visoka osjetljivost i visoka specifičnost, no laboratorijski stručnjak treba biti svjestan njihovih ograničenja i potencijalnih interferencija.

Problem koji može utjecati na interpretaciju je loše odbojavanje gela nakon elektroforeze zbog kojeg se rezultat ne može jasno protumačiti, kao što je prikazano na slici 7, ili razvoj izrazitog žutog obojenja, koje je vidljivo na slici 10.

U slučajevima lošeg odbojavanja gela (prisutnost jedne velike vrpce ili cijeli gel liči na „srebrno zrcalo“) uzrok su najčešće nečistoće na staklenoj ploči koja se koristi za izradu gela. Ako je nečistoća u obliku otisku prsta, preporuča se korištenje rukavica bez praška te da se manipulacija s gelom smanji na minimum. U slučaju žutog pozadinskog obojenja, potrebno je pripremiti novu otopinu tiosulfata (Chavallet i sur., 2006).

U ovom istraživanju uspoređene su dvije metode kvalitativnog određivanja asijalotransferina u svrhu potvrde prisutnosti istjecanja likvora; in-house metoda i metoda koja koristi komercijalno dostupan Sebia test, spreman za uporabu.

Rezultati su pokazali kako obje metode imaju istu visoku osjetljivost od 100 %. In-house metoda u ostalim kategorijama predvodi; ima bolju specifičnost, točnost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost. Vidljivo da se ta razlika, kao i razlike u točnosti, pozitivnoj i negativnoj prediktivnoj vrijednosti mogu objasniti s jedinim neslaganjem u interpretaciji kod pacijenta koji je imao otitis uzorkovan infekcijom *Pseudomonas aeruginosa*, a nije mu potvrđeno istjecanje likvora.

Moguće objašnjenje za ovakav lažno pozitivan rezultata je taj da mnoge bakterije, posebice one koje su respiratorni patogeni poput *Hemophilus influenzae*, *Streptococcus*

*pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*, sadrže neuraminidaze koje mogu cijepati sijalinske kiseline s glikokonjugata (Soong i sur., 2006).

Warnecke i sur. (2004) prijavili su u svojem radu lažno pozitivan rezultat kod pacijenta koji je imao kronični sinusitis. Uzorak je bio zelene boje te kontaminiran s bakterijama koje sadrže neuroaminidazu. Neuroaminidaza je „umjetno“ desijalirala izoforme transferina, zbog čega je dobiven lažno pozitivan rezultat. Slikovnim tehnikama je isključena likvoreja. Autori napominju kako je za izbjegavanje pogrešnog tumačenja rezultata potrebno imati jasne kliničke informacije o svakom pacijentu.

Coehenov kapa koeficijent dvije metode je visok te iznosi 0,917, što pokazuje blisko slaganje ove dvije metode kada procjenjuju istu varijablu, asijalotransferin. Kapa statistika bila bi točnija da je bilo moguće analizirati veći broj uzoraka, međutim ovakvi specifični uzorci rijetki su, te se istraživanje napravilo s najvećim mogućim brojem uzoraka koji su bili pohranjeni kroz dulji vremenski period. Ovim istraživanjem provedenim na ukupno dvadeset i sedam uzoraka nije utvrđena značajna razlika u dobivenim rezultatima između dvije ispitivane metode.

Prednost in-house metode bila bi ta što je specifičnija, točnija i ima bolju pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost, dok metoda proizvođača Sebia traje kraće, a gelovi i reagensi za elektroforetsko razdvajanje su standardizirani i odmah spremni za upotrebu. Na kraju, za ispravnu interpretaciju rezultata svake pretrage pa tako i za dokazivanje likvoreje izuzetno je važna komunikacija između medicinskog biokemičara i kliničara kako bi pacijent dobio što bolju njegu i izbjegao produljeni boravak u bolnici.

## 6. Zaključci

- Ne postoji značajna razlika između kvalitativnog dokazivanja asijalotransferina u sekretima in-house metodom i komercijalnom metodom proizvođača Sebia. Cohenov koeficijent slaganja između dvije metode iznosi 0,917.
- Obje metode imaju jednako visoku osjetljivost (100%), no in-house metoda ima bolju specifičnost, točnost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost
- Za ispravnu interpretaciju rezultata uvijek je uz dobiveni rezultat kvalitativnog određivanja asijalotransferina potrebno poznavati kliničku sliku jer su lažno negativni i lažno pozitivni rezultati mogući
- Dobra komunikacija između medicinskog biokemičara i kliničara izuzetno je važna za osiguravanje najbolje moguće njege za pacijenta



## **7. Popis kratica, oznaka i simbola**

Asn – asparagin

CSF – cerebrospinalna tekućina

CT – kompjuterizirana tomografija

CVF – centralna venozna fistula

EBP – eoiduralna krvna zakrpa

EVD – vanjska ventrikularna drenaža

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HRCT – kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije

ICP – intrakranijalni tlak

IF – intratekalni fluorescein

IIH – idiopatska intrakranijalna hipertenzija

MR – magnetska rezonanca

MRI – oslikavanje magnetskom rezonancom

OTC – over the counter

SDS-PAGE – natrij dodecilsulfat – poliakrilamid gel elektroforeza

SŽS – središnji živčani sustav

## 8. Literatura:

Banks CA, Palmer JN, Chiu AG, O'Malley BW Jr., Endoscopic closure of CSF rhinorrhea: 193 cases over 21 years. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009, 140, 826-833.

Baugnon KL, Hudgins PA. Skull base fractures and their complications. *Neuroimaging Clin N Am.* 2014, 24, 439-465.

Bernal-Sprekelsen M, Bleda-Vázquez C, Carrau RL. Ascending meningitis secondary to traumatic cerebrospinal fluid leaks. *Am J Rhinol.* 2000, 14, 257-259.

Bernal-Sprekelsen M, Rioja E, Enseñat J, Management of anterior skull base defect depending on its size and location. *Biomed Res Int.* 2014, 1-7.

Brown KJ, Vanderver A, Hoffman EP. Characterization of Transferrin Glycopeptide Structures in Human Cerebrospinal Fluid. *Int J Mass Spectrom.* 2012, 312, 97-106.

Bunevicius A, Bareikis K, Kalasauskas L Penetrating anterior skull base fracture inflicted by a cow's horn. *Journal of Neurosciences in Rural Practice* 2016, 7, 106–108.

Chan DT, Poon WS, Chiu PW. How useful is glucose detection in diagnosing cerebrospinal fluid leak? The rational use of CT and Beta-2 transferrin assay in detection of cerebrospinal fluid fistula. *Asian J Surg.* 2004, 27, 39-42.

Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2006, 1, 1852-1858.

Chiapparini L, Ciceri E, Nappini S. Headache and intracranial hypotension: neuroradiological findings. *Neurol Sci.* 2004, 25, 138-141.

Choi SY, Seong M, Kim EY, Outcome of epidural blood patch for imaging-negative spontaneous intracranial hypotension. *Cephalalgia.* 2023, 43.

CRANIAL Consortium. CSF rhinorrhoea after endonasal intervention to the skull base (CRANIAL): A multicentre prospective observational study. *Front Oncol.* 2023;12

Daele JJ, Goffart Y, Machiels S. Traumatic, iatrogenic, and spontaneous cerebrospinal fluid (CSF) leak: endoscopic repair. *B-ENT.* 2011, 7, 47-60.

D'Antona L, Jaime Merchan MA, Vassiliou A., Clinical Presentation, Investigation Findings, and Treatment Outcomes of Spontaneous Intracranial Hypotension Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2021, 78, 329-337.

Dasty M, Gottwaldova J, Pohludka M, Determination of asialotransferrin in the cerebrospinal fluid with the HPLC method. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010, 70, 87-91.

Daudia A, Biswas D, Jones NS. Risk of meningitis with cerebrospinal fluid rhinorrhea. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2007, 116, 902-905.

Dobrocky T, Nicholson P, Häni L, Spontaneous intracranial hypotension: searching for the CSF leak. *Lancet Neurol.* 2022, 21, 369-380.

Elektroforeza : [https://www.fer.unizg.hr/\\_download/repository/Ivan\\_Piljac\\_-\\_Elektroforeza.pdf](https://www.fer.unizg.hr/_download/repository/Ivan_Piljac_-_Elektroforeza.pdf), posjećeno 21.6.2024.

Englhard AS, Volgger V, Leunig A. Spontaneous nasal cerebrospinal fluid leaks: management of 24 patients over 11 years. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018, 275, 2487-2494.

Farnsworth PJ, Madhavan AA, Verdoorn JT. Spontaneous intracranial hypotension: updates from diagnosis to treatment. *Neuroradiology.* 2023, 65, 233-243.

Friedauer L, Rezny-Kasprzak B, Steinmetz H. Spinal dural leaks in patients with infratentorial superficial siderosis of the central nervous system-Refinement of a diagnostic algorithm. *Eur J Neurol.* 2022, 29, 1136-1144.

Gavin Gionanni, Chapter 30 – Cerebrospinal fluid analysis, U: Handbook of Clinical Neurology 2014 ,122, 681-702,

Gupta KK, Balai E, Darr A. Reconstruction and Cerebrospinal Fluid Leaks in Endoscopic Endonasal Approach for the Management of Clival Chordomas-A Systematic Review. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2022, 74, 4807-4815.

Hegen H, Teunissen CE, Sellebjerg F, Tumani H, Deisenhammer F. Guidelines on Cerebrospinal Fluid Analysis. In: Springer eBooks 2015, 407–428.

Hiremath SB, Gautam AA, Sasindran V. Cerebrospinal fluid rhinorrhea and otorrhea: A multimodality imaging approach. *Diagn Interv Imaging.* 2019, 100, 3-15.

Instrukcijski list Sebia :Hydragel 6  $\beta$ 2 Transferrin(e) Ref. 4853 Masque standard/ Standard mask ,2018

Interni dokument: Asijalotransferin, KBC Zagreb, KZLD, 2024.

Khan R, Sajjad M, Khan AA. Comparison Of Lumbar Drain Insertion And Conservative Management In The Treatment Of Traumatic CSF Rhinorrhoea. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2019, 31, 441-444.

Kranz PG, Gray L, Malinzak MD. Spontaneous Intracranial Hypotension: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Neuroimaging Clin N Am*. 2019, 29, 581-594.

Le C, Strong EB, Luu Q. Management of Anterior Skull Base Cerebrospinal Fluid Leaks. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2016, 77, 404-411.

Lin JP, Zhang SD, He FF. The status of diagnosis and treatment to intracranial hypotension, including SIH. *J Headache Pain*. 2017,18, 4.

Menon SK, Onyia CU. A short review on a complication of lumbar spine surgery: CSF leak. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2015,139, 248–51.

Mirza S, Thaper A, McClelland L, Jones NS. Sinonasal cerebrospinal fluid leaks: management of 97 patients over 10 years. *Laryngoscope*. 2005, 115, 1774-1777.

Oakley GM, Alt JA, Schlosser RJ,. Diagnosis of cerebrospinal fluid rhinorrhea: an evidence-based review with recommendations. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016, 6, 8-16.

Pagani-Estévez GL, Cutsforth-Gregory JK, Morris JM. Procedural predictors of epidural blood patch efficacy in spontaneous intracranial hypotension. *Reg Anesth Pain Med*. 2019, 44, 212-220.

Perez-Roman RJ, Bryant JP, Tapamo H. Use of an External Ventricular Drain for Treatment of a Thoracolumbar Cerebrospinal Fluid Leak: A Case Report and Review of Literature. *Cureus*. 2022, 14

Ramakrishnan N, Roy R, Singh S, Goyal S, Approach to Management of Cerebrospinal Fluid Rhinorrhea: Institutional Based Protocol. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022, 74, 737-744.

Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2011, 128, 309-316.

Scoffings DJ. Imaging of Acquired Skull Base Cerebrospinal Fluid Leaks. *Neuroimaging Clin N Am*. 2021, 31, 509-522.

Signorelli F, Caccavella VM, Giordano M. A systematic review and meta-analysis of factors affecting the outcome of the epidural blood patching in spontaneous intracranial hypotension. *Neurosurg Rev.* 2021, 44, 3079-3085.

Soong G, Muir A, Gomez MI. Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *J Clin Invest.* 2006, 116, 2297-2305.

Spinal leak foundation, 2024, [www.spinalcsfleak.org](http://www.spinalcsfleak.org), posjećeno 28.6.2024.

StatPearls: Cerebrospinal Fluid Leak, 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538157/>, posjećeno 24.6.2024.

Tai YC, Tai YS, Ou CH, Treatment, Outcome, and Relapse of Spontaneous and Nonspontaneous Cerebrospinal Fluid Leak. *Brain Sci.* 2022, 12, 340.

Torabi SJ, Abiri A, Chen X. Multimodal diagnosis of cerebrospinal fluid rhinorrhea: State of the art review and emerging concepts. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology* 2024, 27, 1-9.

Torres-Bayona S, Velasquez N, Nakassa. Risk Factors and Reconstruction Techniques for Persistent Cerebrospinal Fluid Leak in Patients Undergoing Endoscopic Endonasal Approach to the Posterior Fossa. *J Neurol Surg B Skull Base.* 2021, 83, 318-323.

Trbojević Čepe M, Vogrinc Ž, Cerebrospinalna tekućina. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 558-588.

Tumani H, Nau R, Felgenhauer K. Beta-trace protein in cerebrospinal fluid: a blood-CSF barrier-related evaluation in neurological diseases. *Ann Neurol.* 1998, 44, 882-889.

Wang EW, Vandergrift WA 3rd, Schlosser RJ. Spontaneous CSF Leaks. *Otolaryngol Clin North Am.* 2011, 44, 845-856.

Warnecke A, Averbeck T, Wurster U. Diagnostic relevance of beta2-transferrin for the detection of cerebrospinal fluid fistulas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004, 130, 1178-1184.

Wicklund MR, Mokri B, Drubach DA. Frontotemporal brain sagging syndrome: an SIH-like presentation mimicking FTD. *Neurology.* 2011, 76, 1377-1382.

Yamada S. Cerebrospinal fluid dynamics. *Croatian Medical Journal* 2021, 62, 399–410.

Slike:

Bunevicius A, Bareikis K, Kalasauskas L, Tamasauskas A. Penetrating anterior skull base fracture inflicted by a cow's horn. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 2016, 7, 106-108.

## 9. Sažetak/Summary

Likvoreja je stanje u kojem cerebrospinalna tekućina istječe kroz oštećenje u duri mater, vanjskoj ovojnici koja štiti središnji živčani sustav. Likvoreja može imati ozbiljne posljedice, uključujući infekcije poput meningitisa, te utječe na funkciju mozga zbog gubitka potpore. Glavni cilj rada bio je usporediti dvije metode za kvalitativno određivanje asialotransferina, biokemijskog biljega likvoreje, u uzorcima sekreta. Asialotransferin se sintetizira u SŽS-u i normalno je prisutan u likvoru, a njegovo kvalitativno određivanje u sekretu pomaže u dijagnosticiranju likvoreje.

U istraživanju su korištene in-house metoda i komercijalni test proizvođača Sebia. In-house metoda pokazala se specifičnijom i točnijom, ali Sebia metoda je brža i praktičnija. Obje metode pokazale su visoku osjetljivost (100%), dok je in-house metoda imala bolju specifičnost i točnost. Istraživanje je također ukazalo na mogućnost lažno pozitivnih rezultata zbog prisutnosti bakterija koje mogu cijepati sijalinske kiseline te tako interferirati s testom.

Rezultati istraživanja su dokazali da nema značajne razlike u osjetljivosti između dvije metode, stoga se obje metode mogu istovremeno koristiti u rutinskom laboratorijskom radu.

Cerebrospinal fluid (CSF) leakage represents a condition where cerebrospinal fluid escapes through a tear in the dura mater, the outer membrane that protects the central nervous system. CSF leakage can have serious consequences, including infections like meningitis, and it can affect brain function due to the loss of support. The main aim of the thesis was to compare two methods for the qualitative determination of asialotransferrin, a biochemical marker of CSF, in fluid samples. Asialotransferrin is specific to cerebrospinal fluid, and its detection aids in diagnosing CSF leakage.

The study utilized an in-house method and a commercial test from the manufacturer Sebia. The in-house method proved to be more specific and accurate, while the Sebia method was faster and more practical. Both methods demonstrated high sensitivity (100%), but the in-house method had better specificity and accuracy. The research also highlighted the potential for false-positive results due to the presence of bacteria that can interfere with the test.

It was concluded that there is no significant difference in sensitivity between the two methods, though the in-house method is more precise. The authors emphasize the importance of using the patient's clinical picture for accurate interpretation of results, as well as the need for imaging techniques to localize the site of leakage and enable timely treatment.



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Likvoreja: usporedba dvije metode kvalitativnog određivanja asijalotransferina

Marko Iličković

#### SAŽETAK

Likvoreja je stanje u kojem cerebrospinalna tekućina istječe kroz oštećenje u duri mater, vanjskoj ovojnici koja štiti središnji živčani sustav. Likvoreja može imati ozbiljne posljedice, uključujući infekcije poput meningitisa, te utječe na funkciju mozga zbog gubitka potpore. Glavni cilj rada bio je usporediti dvije metode za kvalitativno određivanje asijalotransferina, biokemijskog biljega likvora, u uzorcima sekreta. Asijalotransferin je specifičan za cerebrospinalnu tekućinu, a njegovo kvalitativno određivanje pomaže u dijagnosticiranju likvoreje. U istraživanju su korištene in-house metoda i komercijalni test proizvođača Sebia. In-house metoda pokazala se specifičnijom i točnijom, ali Sebia metoda je brža i praktičnija. Obje metode pokazale su visoku osjetljivost (100%), dok je in-house metoda imala bolju specifičnost i točnost. Istraživanje je također ukazalo na mogućnost lažno pozitivnih rezultata zbog prisutnosti bakterija koje mogu interferirati s testom.

Zaključeno je da nema značajne razlike u osjetljivosti između dvije metode, ali je in-house metoda preciznija. Autori naglašavaju važnost korištenja kliničke slike pacijenta za točnu interpretaciju rezultata, kao i potrebu za slikovnim tehnikama kako bi se lokaliziralo mjesto istjecanja te omogućilo pravovremeno liječenje.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 46 stranica, 14 grafičkih prikaza, 6 tablica i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Likvoreja, asijalotransferin, nazolikvoreja, bakterijski meningitis, elektroforeza

Mentor: **Dr. sc. Željka Vogrinc**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vogrinc**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana Kozmar** *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Désirée Coen Herak**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: listopad 2024. .

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Haematology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Cerebrospinal fluid leak: comparison of two qualitative methods determining asialo-transferrin

Marko Iličković

#### SUMMARY

Cerebrospinal fluid (CSF) leakage represents a condition where cerebrospinal fluid escapes through a tear in the dura mater, the outer membrane that protects the central nervous system. CSF leakage can have serious consequences, including infections like meningitis, and it can affect brain function due to the loss of support. The main aim of the thesis was to compare two methods for the qualitative determination of asialotransferrin, a biochemical marker of CSF, in fluid samples. Asialotransferrin is specific to cerebrospinal fluid, and its detection aids in diagnosing CSF leakage. The study utilized an in-house method and a commercial test from the manufacturer Sebia. The in-house method proved to be more specific and accurate, while the Sebia method was faster and more practical. Both methods demonstrated high sensitivity (100%), but the in-house method had better specificity and accuracy. The research also highlighted the potential for false-positive results due to the presence of bacteria that can interfere with the test.

It was concluded that there is no significant difference in sensitivity between the two methods, though the in-house method is more precise. The authors emphasize the importance of using the patient's clinical picture for accurate interpretation of results, as well as the need for imaging techniques to localize the site of leakage and enable timely treatment.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 46 pages, 14 figures, 6 tables and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: CSF leak, asialo-transferrin, CSF rhinorrhea, bacterial meningitis, electrophoresis

Mentor: **Željka Vogrinc, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vogrinc, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Kozmar, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Désirée Coen Herak, PhD.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: October 2024.