

МАТЕМАТИЧКИ МОДЕЛИ АЛБУМИНА КАО ДИЈАГНОСТИЧКИ ПОКАЗАТЕЉИ СТАЊА КРВНО-МОЖДАНЕ БАРИЈЕРЕ

Мирић Д.¹, Катанић Р.², Божовић Б.¹, Поповић Н.², Драгојевић И.¹

¹Институт за биохемију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Клиника за инфективне болести, КБЦ Приштина, Грачаница

THE MATHEMATICAL MODELS OF ALBUMIN AS DIAGNOSTIC PARAMETERS OF BLOOD-BRAIN BARRIER STATUS

Мирић Д.¹, Катанић Р.², Божовић Б.¹, Поповић Н.², Драгојевић И.¹

¹Institute of Biochemistry, Medical faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

²Clinic for Infective Diseases, Clinical Center Pristina, Gracanica

SUMMARY

The increased protein concentration in cerebrospinal fluid is among most prominent biochemical parameter of intensified passage of macromolecules through blood-brain barrier. It is often found in cases of meningeal inflammation, neurodegeneration, neoplastic and traumatic processes developed on brain or spinal cord structures. Protein concentration in cerebrospinal fluid is often determined, but determination of albumin concentrations as well as mathematical models utilizing albumin are more reflective to the pathologic processes on the brain and spinal cord. Our study was limited to the determination of referent values for our laboratory for cerebrospinal fluid albumin concentrations, albumin quotient, as well as albumin transudat and exudat in the function of the age of probands. The results of the study show great agreement with previously published data.

Key words: Cerebrospinal fluid, Brain barrier permeability, Albumin, Albumin quotient, Transudat, Exudat.

САЖЕТАК

Повећење концентрације протеина у ликвору један је од биохемијских показатеља стања појачане пропустљивости крвно-мождане баријере за макромолекуле. Среће се у склопу инфламаторних, дегенеративних, неопластичних или трауматских реакција централног нервног система и кичмене мождине. Иако се протеинорахија рутински одређује код сумње на постојање наведених процеса, одређивање концентрације албумина у ликвору, као и модели у којима се овај протеин користи за верификацију стања пропустљивости можданих баријера, има далеко већи клинички значај. У нашој студији смо се ограничили на одређивање референтних вредности наше лабораторије за албумин, албумински коефицијент, трансудат и ексудат албумина у зависности од узраста испитаника. Добијене вредности наведених биохемијских маркера пропустљивости можданих баријера у складу су са наводима из литературе.

Кључне речи: Цереброспинални ликвор, Пропустљивост можданих баријера, Албумин, Албумински коефицијент, Трансудат, Ексудат.

УВОД

Своје бројне функције мождане ћелије остварују само у условима добро избалансираних услова средине, због чега одржавање церебралне хомеостазе захтева стриктну контролу екстраваскуларног проласка ћелија и макромолекула из крви у цереброспинални ликвор (CSL) и паренхим мозга. У физиолошким условима ову рестрикцију врше како епителне ћелије које се простиру изнад крвних судова хориоидног плексуса, чинећи крвно-ликворску баријеру, тако и практично непропустљив ендотел церебралних капилара који се протеже у мождани паренхим и чини крвно-мождану баријеру.

У ликвору се налази мала количина протеина, углавном албумина, који у ликвору доспевају механиз-

мом активног транспорта на нивоу ендотела можданих капилара. Као макромолекулски маркер најчешће се одређује албумински коефицијент, с обзиром да је албумин протеин који се синтетише само у јетри и његово присуство у ликвору је искључиво хематогено.

У условима инфламације долази до делимичног или потпуног губитка баријерне функције па макромолекули дифундују у субарахноидни простор, због чега се уз трансудирани молекуле у ликвору појављују и молекули ексудата. Појачана пропустљивост крвно-мождане баријере за макромолекуле један је од дијагностички важних показатеља у току настанка и еволуције инфламаторног процеса на менингами (1, 2).

Осим тога, висока концентрација овог протеина у серуму и његова релативно мала молекулска маса доприносе да албумин врши снажан трансендотелни притисак на нивоу можданих баријера. Мождане баријере, базиране на постојању тесних веза на нивоу капилара показују незрелост на рођењу, због чега су концентрације укупних протеина у CSL новорођенчади високе (до 1.20 g/L) и то утолико веће, уколико је гестациона зрелост мања (3). Сазревањем, односно правилним формирањем молекулских асоцијација тесних веза смањује се количина протеина присутних у физиолошким условима у ликвору.

Циљ рада је одређивање сопствених референтних вредности лабораторије за албумински коефицијент, албумински трансудат и ексудат у зависности од узраста, с обзиром на широке дијагностичке могућности коју ови параметри имају.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Испитаници

У раду су коришћени узорци серума и цереброспиналног ликвора 54 особе старости од 15 дана до 62 године примљених на Клинику за дечије болести КБЦ Приштина као и Клинику за инфективне болести КБЦ Приштина, код којих је на основу мишљења лекара примарне здравствене заштите постојала сумња на менингеалну болест. Критеријуми за укључивање узорака у студију су били: нормалан налаз хелијских елемената ликвора, нормалан налаз гликемије и гликорахије и налаз протеинорахије у референтним вредностима добне групе. С обзиром да анализирани узорци представљају остатак узорака након рутинских испитивања ликвора, нисмо тражили сагласност пацијената или њихових пратилаца за одређивање додатних биохемијских параметара у узорцима.

Биохемијске аналитичке методе

Концентрација протеина у ликвору одређивана је колориметријском методом по Lowry-у (4,5) са хуманим серум албумином концентрације 1.0 g/L као стандардом. Концентрација албумина су серуму и ликвору одређивана је методом ласерске нефелометрије (6) са комерцијалним антисерумом против хуманог албумина, на ласерском нефелометру (фирме Behring, Marburg, Немачка) по упутству произвођача. Албумински коефицијент израчунаван је по методи Reiber-а (7) Рачуна се по формули:

$$\text{Албумински коеф.} = \frac{\text{Албумин серума (g/L)}}{\text{Албумин ликвора (g/L)}} * 10^3$$

Фактор 103 је уведен ради лакшег праћења резултата и избегавања великог броја места иза децималног зареза.

Трансудат албумина одређиван је по методи Tourelotte и Ма-а рачунским путем (8, 9) на основу концентрације албумина у серуму, као и на основу раније наведених кинетичких мерења (10) по формули:

$$\text{Албумин-трансудат} = \frac{\text{Албумин серума (g/L)}}{230}$$

Количина ексудата албумина у ликвору представља разлику концентрације албумина ликвора и концентрације трансудата албумина у ликвору:

$$\text{Албумин-ексудат} = \text{Албумин ликвора (g/L)} - \text{Албумин-трансудат (g/L)}$$

Статистичке методе

У раду су коришћене методе параметријске статистике с обзиром да су узорци серума и цереброспиналног ликвора показивали нормалну Гаусову дистрибуцију фреквенце.

РЕЗУЛТАТИ РАДА

Наши резултати показују да се нормална баријерна функција за макромолекуле успоставља после трећег месеца живота, што је у складу са наводима из литературе (3, 10). У односу на остале добне групе, испитаници до 3. месеца живота (Табела 1) имају значајно веће количине протеина у ликвору ($p < 0.05$).

Табела 1. - Концентрација протеина ликвора (g/L) у контролној групи у зависности од узраста.

Добне групе	X ± СД	распон
0-3 месеца	0.97 ± 0.25*	0.65-1.37
4-12 месеци	0.40 ± 0.11	0.25-0.50
1-2 године	0.31 ± 0.03	0.15-0.40
3-15 година	0.33 ± 0.08	0.22-0.40
16-55 година	0.34 ± 0.04	0.30-0.46
Преко 51 године	0.43 ± 0.09	0.36-0.51

Концентрација албумина у ликвору испитаника такође варира у зависности од узраста (Табела 2) а статистички значајна разлика у односу на све остале групе добијена је једино у групи узраста до 3. месеца живота ($p < 0.05$).

Табела 2. - Концентрација албумина у ликвору (g/L) у контролној групи у зависности од узраста.

Добне групе	X ± СД	распон
0-3 месеца	0.68 ± 0.15*	0.45-1.04
4-12 месеци	0.30 ± 0.17	0.22-0.44
1-2 године	0.25 ± 0.05	0.16-0.40
3-15 година	0.29 ± 0.14	0.21-0.40
16-55 година	0.25 ± 0.04	0.17-0.39
Преко 51 године	0.29 ± 0.11	0.19-0.39

Албумински коефицијент ликвора деце до 3. месеца живота је највећи (Табела 3) и статистички се значајно разликује од вредности осталих група ($p < 0.01$).

У ликвору деце до 3. месеца живота, међутим и поред високог албуминског коефицијента, преовладава трансудат албумина (Табела 4), чиме се ова група не разликује од свих осталих група испитаника ($p > 0.10$).

Табела 3. - Албумински коефицијент (*10³) контролне групе у зависности од узраста

Добне групе	X ± СД	распон
0-3 месеца	7.17 ± 1.45**	4.7-10.8
4-12 месеци	5.04 ± 0.91	3.5-7.3
1-2 године	5.15 ± 0.65	3.3-7.0
3-15 година	4.51 ± 0.68	2.0-6.9
16-55 година	4.97 ± 0.96	2.0-7.0
Преко 51 године	5.30 ± 1.15	2.9-7.5

Табела 4. - Процентуални удео трансудата и ексудата албумина (X ± СД) церебростиналног ликвора у зависности од узраста.

Добне групе	Албумин трансудат	Албумин ексудат
0-3 месеца	82.3 ± 7.1	17.7-5.0
4-12 месеци	89.1 ± 4.1	14.7-5.4
1-2 године	84.4 ± 9.0	15.3-3.1
3-15 година	83.2 ± 4.2	16.2-3.9
16-55 година	85.2 ± 3.7	15.9-4.3
Преко 51 године	81.6 ± 3.9	18.6-5.2

ДИСКУСИЈА

Одржавање церебралне хомеостазе захтева ригорозну контролу екстраваскуларног промета ћелија и макромолекула који из циркулације пролазе у ликвор и мождани паренхим. У физиолошким условима овај задатак обављају у синергистичком дејству, епителне ћелије хориоидног плексуса и скоро непропустиве ендотелне ћелије можданих капилара који продиру у мождани паренхим и представљају елементе крвно-мождане баријере.

У условима појачаног стварања медијатора инфламације, тумор некрозис фактора α (TNF-α), интерлеукина-1 (IL-1) и других медијатора (11, 12) долази до деструкције хистолошко-анатомских структура крвно-мождане и крвно-ликворске баријере (13, 14) појачава се транзит макромолекула и ћелија из циркулације у ликвор. Извор новопридошних молекула у ликвору је серумски компартман а фракција која на бази појачане васкуларне пропустљивости улази у ликвор је ексудат.

Математички извод Tourtellotte и Ма-а (8) представља вишезначно третирање актуелног стања протеинског профила ликвора у односу на актуелну концентрацију појединих протеина у серуму, као и у односу на физичко-хемијске карактеристике сваког протеина. У њему доминирају два појма везана за сваки протеин: трансудат протеина и ексудат. Трансудат сваког протеина означава ону количину протеина која под физиолошким околностима пролази кроз мождане баријере у ликвор. У физичком смислу, то је максимално претпостављена количина појединачног протеина која се може наћи у ликвору на основу трансендотелног притиска који зависи од концентрације у серуму и хидродинамског радијуса протеинског молекула. Кинетичка проучавања су показала да од 230 молекула албумина серума само један молекул прође у физиолошким условима у субарахноидни простор (9), сходно функцији можданих баријера да делују као протеинско сито.

Албумински коефицијент ликвора је дијагностички показатељ стања пропустљивости можданих баријера уведен из потребе да се избегне утицај концентрације одређеног протеина серума на протеински профил ликвора. Овај коефицијент представља математички однос концентрације албумина серума и албумина ликвора, због чега се одређује само након истовременог узимања узорак (10).

Наши резултати показују да су у погледу дистрибуције фревенце наведени биохемијски показатељи равномерно дистрибуирани по Гаусовом типу расподеле, иако у оквиру сваког постоји биолошка варијација. С обзиром на релативну незрелост структура тесних веза новорођенчади и деце узраста до 3. месеца сматрамо да је код интерпретације добијене протеинорације од изузетног значаја истовремено одређивање албуминског коефицијента, као и концентрације албуминског ексудата.

Инфламаторни процес значајно мења карактеристике крвно-можданих баријера. Тада се у ликвору повећава концентрација албумина (11, 15) као и вредности албуминског индекса. Концентрације трансудираних албумина су повећане, али се уз њих повећавају и концентрације албумин ексудата (16). У инфламаторним болестима менинга однос албумин трансудата и албумин ексудата је инверзан у односу на вредности контролне групе, због чега представља важан дијагностички показатељ стања можданих баријера. Осим у инфекцији централног нервног система наведени биохемијски параметри су корисни у дијагнози изоловане баријерне дисфункције која прати полирадикуллопатије типа Gullain Barre (17), стенозе спиналног канала, нормотензивног хидроцефалуса (18), као и тумора централног нервног система (19).

ЛИТЕРАТУРА

- Ronquist G, Callered T, Niklasson F, Friman G. (1985) Studies of biochemical markers in cerebrospinal fluid in patients with meningoencephalitis.
- Felgenhauer K, Ackermann R, Schilep G. (1980) The process dynamics of viral and bacterial diseases of the central nervous system. *J Neurol Sci* 47: 21-34.
- Reiber H (2001). Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 310: 173-186.
- Lowry OH., Rosebrough NJ. (1951) Faar AL. and Randall RJ.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-270.
- Reider HP (1966) Eine neue Modifikation der Cu-Folin-Methode zur Bestimmung des Totalproteins im Liquor cerebrospinalis. *Klin Wschr* 44; 1036-1039.
- Seiber A.(1977): Plasmaproteinbestimmung durch Laser-Nephelometrie: Laborpraxis. *Laboratoriumsblätter* 27; 109-118.
- Reiber H. (1980): The Discrimination Between Different Blood-CSF Barrier Dysfunctions and Inflammatory Reactions of the CNS by a Recent Evaluation Graph for the Protein Profile of Cerebrospinal Fluid. *J Neurol* 224: 89-93.
- Tourtellotte WW, Ma BI (1978) Multiple sclerosis: The blood-brain barrier and the measurement of de novo central nervous system IgG synthesis. *Neurology* 28:76-83.
- Felgenhauer K. (1984) Protein size and cerebrospinal fluid composition. *Klin Wschr* 36: 66-71.

10. Neuwelt E, Abbott NJ, Abreu L. et al. (2008) Strategies to advance translational research to blood-brain barrier. *Lancet Neurol* 7(1): 84-96.
11. Perry V.H. Anthony D.C. Bolton S.J. Brown H.C. (1997) The blood-brain barrier and the inflammatory response. *Mol. Med. Today* 3:335-341.
12. Abbott NJ (2000) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol* 20(2): 131-140.
13. Pfister LA, Tureen HJ, Shaw S. et al. (2000) Endothelin inhibition improves cerebral blood flow and is neuroprotective in pneumococcal meningitis. *Ann Neurol* 47: 329-335.
14. Kettritz R, Choi M, Rolle S, Wellner M, Luft CF. (2004) Intergins and cytokines activate nuclear transcription factor- β in human neutrophils. *J Biol Chem* 279(4): 2657-2665.
15. Weber RJ, Toumanen IE (2007) Cellular damage in bacterial meningitis: An interplay of bacterial and host driven toxicity. *J Neuroimmunol* 184: 45-52.
16. Gray LD, Fedorko DP (1992) Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 5: 130-145.
17. Terryberry JW, Schoenfeld Y, Gilburd B et al. (1995) Myelin- and microbe-specific antibodies in Guillain-Barre Syndrome. *J Clin Lab Anal* 9: 308-319.
18. Brettschneider J, Claus A, Kassubek J, Tumani H. (2005) Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J Neurol* 252: 1067-1073.
19. Jacobi C, Reiber H, Hunnemann DH, Hanfeld F (1986) The clinical relevance of locally produced carcinoembryonic antigen in cerebrospinal fluid. *J Neurol* 233: 358-361.