

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Luka Pnjak

**VIŠEGODIŠNJE OSOBITOSTI
KLINIČKE SLIKE I BILJEZI TKIVNOG
OŠTEĆENJA KOD MIGRENSKE
GLAVOBOLJE**

Završni rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Luka Pnjak

**VIŠEGODIŠNJE OSOBITOSTI
KLINIČKE SLIKE I BILJEZI TKIVNOG
OŠTEĆENJA KOD MIGRENSKE
GLAVOBOLJE**

Završni rad

Osijek, 2016.

Rad je ostvaren u: Laboratorij za analizu DNA Katedre za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Goran Ćurić, dr. med.

Rad ima 22 lista, 1 sliku i 3 tablice.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Migrena	1
1.1.1. Povijest migrena	2
1.1.2. Okidači migrenskog napada	2
1.1.3. Vrste glavobolja	4
1.1.4. Dijagnostika migrene	5
1.1.5. Liječenje migrene	5
1.2. Biljezi tkivnog oštećenja	6
1.2.1. S100B	6
1.2.2. Neuron specifična enolaza – NSE	7
2. Ciljevi	8
3. Materijali i metode	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Skupina ispitanika	9
3.1.2. Kontrolna skupina	9
3.2. Kemikalije Reagensi za početnu obradu krvi su slijedeći:	10
3.3. Metode.....	10
3.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi čovjeka metodom gradijenta gustoće.....	10
3.3.2. ELISA (eng. enzyme-linked immunosorbent assay).....	10
4. Rezultati	12
6. Zaključak	14
7. Sažetak	15
8. Summary	16
9. Literatura	17
10. Životopis	19

1. Uvod

1.1. Migrena

Migrena je vrsta jake glavobolje, kroničnog, no epizodičnog karaktera, obilježena bolovima u glavi koji traju satima i često su popraćeni mučninom, svjetoplahoću (prekomjerna osjetljivost na normalnu razinu svjetla - fotofobija) i drugim simptomima. Premda je tenzijska glavobolja najviše zastupljena u općoj populaciji, migrena je druga po učestalosti među primarnim glavoboljama te ta dva tipa glavobolje predstavljaju 90% svih glavobolja. Klinička slika migrene dijeli se na migrenu bez aure, migrenu s aurom te ostale rjeđe oblike. Migrena se javlja u oko 18% žena i 6% muškaraca, no velik broj slučajeva ni biva dijagnosticiran (dijagnosticirana u svega 41% žena i 29% muškaraca), a shodno time nije niti primjereno liječen.

Procjenjuje se da u Europi od migrene boluje oko 65 milijuna ljudi te ona značajno utječe na društveni i ekonomski život pojedinca, ali i populacije. Migrena je skupa bolest, direktni troškovi uključuju posjete obiteljskom liječniku, službi hitne pomoći, troškove eventualne hospitalizacije te lijekove. Indirektni troškovi čine 2/3 ukupnih troškova, a u njih se ubrajaju troškovi uzrokovani izostancima s posla i troškovi nastali zbog smanjene učinkovitosti na poslu.

Učestalost migrena ovisi o različitim čimbenicima, među kojim su klimatski uvjeti, rasa, dob, spol te životne navike. Vrlo je značajan genetički doprinos; smatra se kako 70 do 80% rizika za pojavu migrena otpada na djelovanje niza genetičkih čimbenika, 50-60% oboljelih ima roditelja s migrenom. U ruralnim područjima učestalost je manja, no postoji mogućnost da se zbog udaljenosti od liječnika pacijenti rjeđe javljaju na pregled. Kod žena se migrena javlja 2 do 3 puta češće nego kod muškaraca. Većina istraživanja češću pojavnost u žena objašnjava povezanošću djelovanja hormona i pojave napada migrene, naime migrenski se napad najčešće javlja u svezi s menstruacijom, bilo na početku, u sredini ili na kraju ciklusa. Prije se mislilo da migrene nastaju u pubertetu i prestaju u menopauzi kod žena, no to nije slučaj. Migrene se javljaju i kod djece, a mogu trajati i do sedamdesete godine života, ni ipak se najčešće javljaju u srednjoj dobi. Tipično se migrena javlja u dvadesetim godinama života, s vrškom pojavnosti u tridesetim, dok pojavnost pada prema kasnijoj životnoj dobi. Migrena je češća među osobama iz nižim socio-ekonomskih skupinama te oko pet puta češća u pretilih osoba. Stres je važan faktor u nastajanju migrenskog napada, a često se opisuje i

migrena za vrijeme vikenda, kada bi se osoba mogla opustiti, a nekim si podsvjesnim mehanizmima to ne dopušta.

Migrena je primarna glavobolja, što znači da nije simptom nekog drugog stanja ili bolesti, odnosno, predstavlja zasebnu bolest. Temelj dijagnoze migrene je klinička slika i povijest bolesti te ne postoje standardni laboratorijski testovi niti specifična dijagnostička metoda kojom bi se potvrdila ili isključila migrena. Patofiziologija migrene je djelomice objašnjena. Isprva se migrenska bol pripisivala kontrakciji i dilataciji krvnih žila u mozgu, što su ciljali i prvi lijekovi za migrene, no takvim promjenama moždanog protoka se nisu mogli objasniti migrenski napadi kod svih osoba. Danas prevladavaju tri glavne teorije nastanka migrenskog napada; vaskularna teorija, neurovaskularna teorija i teorija širenja depolarizacije u moždanoj kori (engl. *cortical spreading depression*) (1, 2, 3).

1.1.1. Povijest migrena

Migrena je najduže poznata glavobolja, a prvi opisi migrene kao povremeno pojavljujućeg sindroma se nalaze u prvim pisanim tragovima čovječanstva - 3000 godine prije Krista, u staroj Mezopotamiji. U jednoj pjesmi se tako migrena opisuje kako bol u glavi uzrokuje zli duh Tiu; koji je poput vjetra u pustinji, blještav poput jakog svjetla i sa svih strana obuhvaća žrtvu koja mu se odupire. Nadalje, Hipokrat, otac moderne medicine, opisuje migrenu slično kasnijim modernim opisima; kao poremećaj vida i bol u jednoj strani glave popraćena povraćanjem. Isto tako, Celzijus, oko 30. godine poslije Krista, i Aretej iz Kapadokije, opisuju migrenu kao bol za cijeli život. Tek je Galen opisom jasno razlikovao prirodu migrena od ostalih vrsta glavobolja te je spominjao izraz *hemikranija* (bol u jednoj polovici glave), iz kojeg je na kraju proizašao naziv za ovu vrstu glavobolje – migrena (2).

1.1.2. Okidači migrenskog napada

Razvoj tehnologija i medicine su omogućili djelomičan uvid u etiopatogenezu migrene. Veći broj teorija o nastanku migrene ukazuje na činjenicu da još uvijek nije rasvijetljena etiopatogeneza migrene, nego smo tek otkrili neke dijelove slagalice.

Okidač migrenskog napada je definiran kao bilo koji čimbenik „koji svojom prisutnošću ili odsutnošću vodi razvoju akutne migrenske glavobolje“ (2). Kod većine autora nalazimo povezanost nastanka migrena s tipom osoba. Smatra se da inteligentne, ambiciozne i

temperamentne osobe imaju veću sklonost migrenama zbog toga što žive brže, s više stresa te, na primjer, imaju sklonost učiniti što više stvari u jednom danu, što je potencijalni izvor stresa.

Nadalje, vrlo važan faktor čine i klimatski uvjeti. Vremenske prilike, poput tlaka zraka i vlažnosti, samo su neke od klimatskih pojava koje imaju velik učinak na glavobolje. Utvrđeno je kako i samo izlaganje jakom Suncu ili jakoj hladnoći kod nekih osoba može izazvati jake glavobolje. Već spomenuta hormonalna neravnoteža kod žena za vrijeme menstruacije dovodi do pojava migrenskih glavobolja. Važno je spomenuti i neke vrste hrane kao okidače migrenskog napada; čokolada, kava i crno vino samo su neke od uobičajenih namirnica koje mogu izazvati glavobolju. S obzirom na svjetske trendove, mnoge osobe su danas na dijetama, koje također imaju utjecaja na pojavu migrene, naime, poznato je da je odgađanje i preskakanje obroka jedan od okidača migrenskog napada.

Migrene mogu uzrokovati i jaki svjetlosni podražaji, neugodni zvukovi, pušenje (Tablica 1). Svi navedeni uzroci ne utječu isto na sve osobe niti će kod svih izazvati glavobolju. Uzroka ima jako puno te kod nekih osoba mogu djelovati u kombinaciji.

Tablica 1. Prikaz najčešćih okidača migrenskog napada (2)

POTENCIJALNI OKIDAČI MIGRENSKIH GLAVOBOLJA	
BIHEVIORALNI	<ul style="list-style-type: none"> • Gladovanje • Stres • Osjećaji • Nepravilnosti sna • Fizička aktivnost
OKOLIŠNI	<ul style="list-style-type: none"> • Jako svjetlo • Mirisi • Vremenske promjene • Dim cigarete
INFEKTIVNI	<ul style="list-style-type: none"> • Infekcije gornjeg dišnog trakta
PREHRAMBENI	<ul style="list-style-type: none"> • Pića s kofeinom • Alkoholna pića • Sir • Čokolada • Sladoled
HORMONSKI	<ul style="list-style-type: none"> • Menstruacija
KEMIJSKI	<ul style="list-style-type: none"> • Tiramin • Nitrati • Aspartam

--	--

1.1.3 Vrste glavobolja

Pododbor za klasifikaciju migrena Međunarodnoga društva za glavobolje objavilo dijagnostičke kriterije za klasifikaciju migrena i glavobolja koji bi se trebali primjenjivati u cijelom svijetu. Ta klasifikacija navodi nekoliko vrsta migrena: migrene bez aure (prije zvane obične migrene), migrene s aurom (ili klasične migrene), glavobolje tenzijskog tipa i komplicirane migrene, kao što su oftalmoplegična migrena, bazilarna migrena te neke druge, rjeđe oblike migrene.

Kod migrena bez aure napadaj traje od 4 do 72 sata ako se ne liječe. Bol je pulsirajuća i javlja se samo u jednoj strani glave te je s njom teško obavljati uobičajene dnevne zadatke. Često počinje ujutro i pojačava pri hodu ili bilo kakvoj fizičkoj aktivnosti. Uz glavobolju se obično javljaju i mučnina i/ili povraćanje, preosjetljivost na svjetlo i zvuk. Napadaji ove vrste glavobolje nisu periodički stoga osoba može provesti i duže vrijeme bez glavobolja i liječenja.

Migrenama s aurom prethodi takozvana aura, koja se očituje kao smetnje vida, u vidu mrlja u vidnom polju ili zamućenje, no i kao drugim neurološkim simptomima, kao što su utrnulost i slabost u ruci i nozi, utrnulost jedne strane lica, smetnje govora, promjene raspoloženja, vrtoglavice i nelagode u prsima. Aura obično traje do sat vremena i nakon nje mogu početi glavobolja, mučnina i osjetljivost na svjetlo i/ili zvuk. Glavobolja, ako počne, traje od 8 do 24 sata i češće se javlja jednostrano. Napadaji mogu završiti po završetku aure, a po završetku napada bolesnici osjećaju opću slabost i razdražljivost, imaju izražene podočnjake te su često blijede kože.

Glavobolja tenzijskog tipa je glavobolja koja nastaje zbog kontrakcije mišića. Naziva se još i psihomiogena i neurotična ili stresna glavobolja. Bol može trajati od pola sata do tjedan dana. U ovom slučaju, bol je opisana kao obruč koji steže glavu i najčešće se javlja u predjelu čela, a može se javiti i u zatiljku. Katkada bol može biti blaga, čak i jedva primjetna, a tek ponekad se javlja i mučnina, no povraćanje i osjetljivost na svjetlo ili zvuk, nisu dio kliničke slike ovog tipa glavobolje.

Kod migrena s komplikacijama, odnosno s produženom aurom, simptomi u auri mogu biti i vrlo izraženi, u vidu 'pravih' neuroloških ispada, kao što su oduzetost jedne strane tijela, poremećaji svijesti i drugo.

1.1.4. Dijagnostika migrene

Dijagnoza migrene se, temelji na anamnezi i kliničkoj slici. Ne postoji dijagnostička metoda kojom bi se potvrdila migrena. Neuroradiološka i neurofiziološka obrada je indicirana kada se diferencijalno dijagnostički postavlja sumnja na postojanje patomorfološkog supstrata – uzroka glavobolje. Takva obrada je neophodna kada se na temelju anamneze i kliničke slike sumnja da su migrenski napadaji (migrena s aurom, retinalna migrena, komplikacije migrene) uzrokovani nekim drugim stanjem, npr. krvožilnom malformacijom, tumorom ili moždanim udarom. Klasična slika obične migrene ili migrene s aurom ne zahtijeva posebnu dijagnostičku obradu. Najvažnija dijagnostička “metoda” je vođenje dnevnika glavobolja u koji pacijenti unose podatke o učestalosti, trajanju i intenzitetu napada glavobolje, lokalizaciji i karakteru boli, popratnim tegobama (mučnina, foto- i fonofobija). Vrijednost vođenja dnevnika je u tome što se prema navedenim podacima lakše može odrediti o kojoj se vrsti glavobolje radi (migrena, tenzijska) i koja je njihova stvarna učestalost. Na taj se način lakše može preporučiti najprimjerenija terapija (akutna i profilaktična).

Sve vrste glavobolje zahtijevaju temeljnu dijagnostičku obradu, koja započinje uzimanjem detaljne anamneze. Neophodno je učiniti laboratorijske pretrage krvi, a preporučuje se učiniti ultrazvučni pregled (Doppler-sonografija) krvnih žila glave i vrata, zbog procjene moždane cirkulacije, te snimanje električnih potencijala mozga (elektroencefalogram, EEG). Prilikom opsežnije obrade pacijenata potrebno je učiniti CT (eng. *computer tomography*) i MR (magnetna rezonanca) mozga. Sve to mogu upotpuniti i radiološke pretrage. Nažalost, još uvijek nije moguće dijagnosticirati migrenu niti jednim dijagnostičkim testom izvan napada.

1.1.5. Liječenje migrene

Za migrene nema pravog lijeka. Lijekovi za migrene obično djeluju samo na bol te je cilj sprečavanje pojave migrenske boli. Prvi korak je izbjegavanje okidača i rizičnih čimbenika. Preporuča se prakticiranje „uravnoteženog života“, koji uključuje zdravu prehranu, prestanak pušenja, izbjegavanje konzumacije alkoholnih pića i svakodnevnu tjelovježbu.

Ako migrene nisu prestale treba se posavjetovati sa svojim liječnikom o lijekovima koji bi mogli pomoći pri svladavanju boli. Ako su napadaji rijetki, liječe se sami napadaji, ali ako su česti, terapija se primjenjuje svakodnevno. Najčešći primjenjivani lijekovi su acetilsalicilna kiselina, ibuprofen i ketoprofen. Nadalje, rabe se neki 'ozbiljniji' lijekovi, a kod teških napadaja migrene moguća je i hospitalizacija te liječenje s beta blokatorima, antidepresivima i slično.

1.2. Biljezi tkivnog oštećenja

Biomarkeri su biljezi tkivnog oštećenja, tvari koje su normalno prisutne u našem tijelu, no u nekim stanjima dosežu karakteristične koncentracije pomoću kojih možemo dokazati određene bolesti i stanja. Biomarkeri su najčešće proteini, koji su pokazatelji oštećenje određenog tipa stanica ili tkiva. Smatra se da prilikom migrenskog napada dolazi do oštećenja krvno-moždane barijere, pri čemu se u krv otpušta tkivni biljeg-protein S100B, ali da dolazi i do oštećenja neurona. Tkivni biljeg koji nam dokazuje oštećenje neurona je neuron specifična enolaza (NSE).

1.2.1. S100B

Kalcij vezujući peptid, mase atoma 21 kDa, je peptid koji pripada u skupinu S100 proteina. Najviše ga luče astrociti, stanice u mozgu za koje se smatra da luče neurotransmitere i održavaju krvno-moždanu barijeru te utječu na neurone i glija stanice. S100B je najčešće proučavan biomarker oštećenje mozga. U nanomolarnoj koncentraciji se smatra da ima zaštitnu ulogu, no studije pokazuju da je u višim koncentracijama neurotoksičan i smrtonosan za astrocite. U 'normalnim' uvjetima S100B protein ne može prijeći krvno-moždanu barijeru. Zbog sumnje na poremećaj krvno-moždane barijere kod migrenskih glavobolja, kada bi S100B mogao 'iscuriti' u krv, njegova koncentracija ce biti mjerena u serumu. Na Slici 1 prikazana je građa proteina S100B (7).



Slika 1. Prikaz građe proteina S100B (12)

1.2.2. Neuron specifična enolaza – NSE

Neuron specifična enolaza pripada porodici enolaza; enzima koji kataliziraju pretvorbu 2-fosfoglicerata u fosfoenolpiruvat. Enolaze postoje u nekoliko tkivno specifičnih izoformi, a NSE je, kako joj ime kaže, specifična za mozak (8).

Ovaj enzim ima masu atoma 78 kDa i, osim u neuronima i neuroendokrinim tkivima, može ga se naći u maloj količini u eritrocitima. Upravo zbog tkivne specifičnosti, neuron specifična enolaza se dokazuje u serumu ili likvoru kada se sumnja na ozljedu središnjeg živčanog sustavu i/ili krvno-moždane barijere. NSE ipak nije dovoljno specifičan marker za potvrdu dijagnoze neke neurodegenerativne bolesti ili promjene, no koristan je dodatni marker u diferencijalno-dijagnostičkoj obradi. Do porasta koncentracije neuron specifične enolaze u serumu nerijetko može doći kod nekih malignih bolesti, poput karcinoma pluća malih stanica i neuroblastoma.

2. Ciljevi

- Utvrditi ekspresiju biljega oštećenja krvno-moždane barijere (S100B proteina) i biljega oštećenja neurona (neuron specifična enolaza).
- Ispitati povezanost razine ekspresije tih biljega s višegodišnjim osobitostima kliničke slike pacijenata s migrenskom glavoboljom.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Materijale u ovoj studiji čine uzorci venske krvi uzeti od osoba koje imaju dijagnosticiranu migrensku glavobolju i oni čine ispitivanu skupinu, te uzorci venske krvi izuzeti od dobnog i spolno odgovarajućih zdravih osoba, koje čine kontrolnu skupinu. Krv će biti izvađena u vakumiziranu epruvetu s ljubičastim čepom u kojoj se nalazi heparin. Osobama koje su u skupini ispitanika, krv mora biti izvađena unutar dva sata od početka napada, te u trenutku nakon razdoblja od minimalno sedam dana bez migrenske boli (eng. *pain free*), dok će se osobama u kontrolnoj skupini krv vaditi u trenutku „punog zdravlja“, odnosno bez bolova po tipu glavobolje. Iz uzoraka će se tada metodom gradijenta gustoće odvajati mononuklearne stanice iz periferne krvi čovjeka (eng. *peripheral blood mononuclear cells*).

3.1.1. Skupina ispitanika

Uključivanje osoba u skupinu ispitanika temelji se na zadovoljenju postavljenih kriterija. Osobe moraju imati dijagnozu migrenske glavobolje (s ili bez aure) prema Međunarodnoj klasifikaciji glavobolja (ICHD-3), koja se pojavila prije dvije ili više godina. Dobna granica kako za skupinu ispitanika, tako i za kontrolnu skupinu, je četrdeset godina.

Ključno je za studiju uzorkovanje krvi unutar dva sata od početka napada. Kriteriji za isključivanje iz skupine ispitanika su organska podloga glavobolje, životna dob iznad četrdeset godina, psihijatrijske bolesti (izuzev depresije), druge organske bolesti kao što su kardiovaskularne bolest, bolesti bubrega, pluća i žlijezda s unutrašnjim izlučivanjem.

3.1.2. Kontrolna skupina

Ispitanike u kontrolnoj skupini čine dobnog i spolno odgovarajuće, zdrave osobe koje moraju zadovoljiti ove kriterije za uključivanje: odsustvo dijagnoze bilo kojeg tipa glavobolje, dob manja od četrdeset godina, uzorkovanje krvi u trenutku „punog zdravlja“.

Kriteriji za isključivanje iz kontrolne skupine su slijedeći: životna dob iznad četrdeset godina, trudnoća, akutna bolest (npr. prehlada, simptomi poremećene funkcije probavnog sustava, i drugo), psihijatrijske bolesti (izuzev depresije), te druge organske bolesti.

3.2. Kemikalije

Reagensi za početnu obradu krvi su slijedeći:

- Hystopaque 1077, polisukroza i natrij diatriozat, otopina gustoće 1,077 g/mL, Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- Hystopaque 1119, polisukroza i natrij diatriozat, otopina gustoće 1.119 g/mL, Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

3.3. Metode

3.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi čovjeka metodom gradijenta gustoće

Mononuklearne stanice periferne krvi izolirane su iz epruvete s ljubičastim čepom, odnosno epruvete s dodatkom antikoagulansa (EDTA).

Puna krv se razrjeđuje s fosfatnim puferom (PBS, od eng. *phosphate buffered saline*) u omjeru 1:1/2. Nakon toga, u čistu epruvetu se dodaje Histopaque 1119 na kojeg se nadslojava Histopaque 1077 i na to pažljivo dodajemo otopinu krvi i PBS-a u omjeru 1:1:2. Kada smo sve navedeno dodali u epruvetu, centrifugiramo 30 minuta pri 700xg i sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja razdvojilo se šest slojeva. Plastičnom pipetom odvojimo bijelo-mliječni sloj u kojemu se nalaze PBMC (eng. *peripheral blood mononuclear cells*). Stanice se ispiru u PBS-u te se njihov talog pohranjuje na -80°C do daljnje obrade (9).

3.3.2. ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELISA je heterogena imunokemijska metoda pri kojoj je jedan od reaktanata vezan za čvrstu fazu (npr. stjenku epruvete), a glasnik, odnosno tvorac signala, je enzim. Koristi se za detekciju i kvantifikaciju tvari kao što su peptidi, proteini, antitijela i hormoni (10).

Kako bi ELISA bila uspješna, moramo u epruvetu, na čiju je stjenku vezano antitijelo, dodati antigen te ostaviti neko vrijeme kako bi se dogodila reakcija vezanja. Nakon toga, ispiramo konjugat puferom kako bi odstranili sve ono što se nije vezalo za antitijelo. Po tom dodajemo drugo antitijelo koje je obilježeno enzimom. Nastaje tzv. *sandwich* kompleks s ranije stvorenim kompleksom antigena i antitijela. Ponovno ispiramo puferom te dodajemo supstrat za enzim. Kada se supstrat vezao za enzim, određujemo njegovu aktivnost koja je obrnuto proporcionalna koncentraciji antigena. ELISA-om možemo određivati i antitijela, no tada je na čvrstu fazu vezan antigen, a drugi je reagens antitijelo koje je obilježeno enzimom.

Danas ELISA ima široku primjenu kako u medicini tako i u prehrambenoj industriji i biologiji.

4. Rezultati

Biljezi S100B i NSE istraživani su u serumu osoba iz skupine ispitanika i kontrolne skupine. Skupinu ispitanika činile su osobe s dijagnosticiranom migrenom i krv im je bila izuzimana za vrijeme napada i u razdoblju bez bolova, dok je osobama u kontrolnoj skupini krv vađena u razdoblju „punog zdravlja“ (Tablica 2).

Tablica 2. Demografija skupina ispitanika s migrenom i kontrolne skupine.

	Ispitanici s migrenom (N=20)	Kontrolna skupina (N=20)
Godine	32,4 ± 5,3	28,35 ± 10,12
Spol (žensko/muško)	17/3	12/8
Trajanje bolesti (godine)	7,2 ± 3,8	-
Učestalost napada (dani/mjeseci)	3,5 ± 2,2	-

Nakon obrade ELISA-om dobiveni su sljedeći rezultati:

- Uzorci dobiveni od osoba s migrenom u iktalnom periodu pokazuju značajan porast oba markera ($P < 0.05$, za oba) u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 3).
- Uzorci koji su dobiveni za vrijeme perioda bez boli (interiktalni period) pokazuju značajan porast samo S100B markera u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 3).

Tablica 3. Koncentracije serumskih S100B i NSE u iktalnom i interiktalnom periodu uspoređene s kontrolnom skupinom.

	Ispitanici s migrenom		Kontrolna skupina
	Iktalni period	Interiktalni period	
S100B ($\mu\text{g/L}$)	0,126 ± 0,215*	0,122 ± 0,231*	0,045 ± 0,021
NSE (ng/mL)	11,16 ± 10,61*	11,31 ± 13,05	7,31 ± 2,82

* $P < 0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

5. Rasprava

Migrena je velik javnozdravstveni problem; zauzima visoko treće mjesto po učestalosti u svijetu. Među uzrocima bolovanja i nemogućnosti obavljanja svakodnevnih poslova, migrena zauzima šesto mjesto u cijelom svijetu. Očito je da je migrena važan „generator“ izgubljene dobiti i ekonomskih gubitaka. Jedan od razloga takvog tereta migrene je neprimjerena terapija, koja je pak, među ostalim, posljedica relativno velikog udjela nedijagnosticiranih slučajeva migrene. Ovim radom pokušavamo doprinijeti rasvjetljavanju etiopatogeze migrene i razvoju objektivnih laboratorijskih pokazatelja koji bi bili korisni u dijagnostici migrene. U radu smo analizirali dva proteinska biljega u krvi: S100B (biljeg oštećenja krvno moždane barijere) i NSE (biljeg oštećenja neurona).

S obzirom da je uzorak izbora za ovo istraživanje bila venska krv, najvažnija je bila predanalitička faza. Najviše vremena u laboratorijskom radu (57,3 %) (11) oduzima upravo ona i zato je jako bitno da greške svedemo na minimum. Tako je kod uzorkovanja krvi bila važna, u prvom redu, identifikacija osobe i provjera svih kriterija za skupinu ispitanika ili kontrolnu skupinu, a kasnije i boja čepa epruvete i sam način uzorkovanja.

Kako je S100B biljeg oštećenja krvno moždane barijere, a NSE oštećenja neurona, dobiveni rezultati upućuju upravo na to; porast oba markera za vrijeme migrenskog napada govori kako dolazi do stvarnih oštećenja, kako glija stanica i neurona, tako u dužem periodu, i krvno - moždane barijere. Povišene koncentracije S100B proteina u migrenaša u razdoblju bez boli upućuju na diskretno, ali i kronično oštećenje krvno-moždane barijere.

Neke studije pokazuju da S100B može biti otpušten zbog staničnog oštećenja i aktivacije glija stanica i nakon toga dospjeti u krvotok ili iz međustaničnog prostora zbog oštećene krvno-moždane barijere ili iz likvora (12). Iako dosadašnje studije visoku koncentraciju S100B proteina pripisuju aktivaciji glija stanica (13), povišena koncentracija istog, u migrenskih bolesnika, upućuje i oštećenje glija stanica. NSE je pokazatelj oštećenja neurona i porast koncentracije u serumu ne može biti objašnjen staničnom aktivacijom kao što je to u slučaju S100B, no može zajedničkim oštećenjem i neurona i krvno moždane barijere. Porast koncentracije neuron specifične enolaze, mjerena u iktalnom periodu, upućuje na pojavnost oštećenja neurona kod migrenskih bolesnika. Iako se NSE većinom luči u mozgu, moguća je pojava visoke koncentracije u serumu i kod karcinoma malih stanica, neuroblastoma, melanoma i sl. No, svi ovi slučajevi su isključeni kod stvaranja grupa.

6. Zaključak

Marker oštećenja krvno-moždane barijere (S100B) povišen je i za vrijeme napada migrene i u periodu kada migrenski bolesnici ne osjećaju bol.

Marker oštećenja neurona (NSE) povišen je samo za vrijeme napada migrene.

7. Sažetak

Uvod: Migrene predstavljaju jednu od vodećih bolesti današnjice. Najveći problem, upravo je dijagnostika migrena. Ispitujemo povezanost dva biljega oštećenja moždanog tkiva (S100B i NSE) s migrenom.

Ciljevi istraživanja: Utvrditi ekspresiju navedenih biljega i povezanost njihove ekspresije s višegodišnjim osobitostima kliničke slike pacijenata s migrenskom glavoboljom.

Materijali i metode: Uzorke venske krvi uzorkovani su od osoba koje smo podijelili u dvije skupine - skupinu ispitanika i kontrolnu skupinu. Uključni kriteriji za skupinu ispitanika: višegodišnja dijagnoza migrenske glavobolje, manje od četrdeset godina te krv uzorkovana u roku dva sata od početka napada. Kriterij za isključenje je dob iznad 40 godina te postojanje drugih organskih i psihijatrijskih bolesti, izuzev depresije. Kontrolnu skupinu čine ispitanici bez glavobolje niti bilo kakve druge ozbiljne bolesti, a uzorci im se izuzimaju u trenutku potpunog zdravlja. Nakon uzimanja, uzorci moraju biti obrađeni u roku od dva sata. Prvo se razrjeđuju s 1xPBSom u omjeru 1:1. Nakon toga dodajemo otopinu u epruvetu u koju smo već dodali Histopaque 1119 i Histopaque 1077 i to u omjeru 1:1:2. Nakon centrifugiranja 30 minuta pri 700xg i sobnoj temperaturi, odvojimo bijelo-mliječni sloj u kojem se nalaze mononuklearne stanice. ELISA je imunokemijska metoda pomoću koje vršimo detekciju i kvantifikaciju tvari od interesa. Jedan od reaktanata je uvijek vezan na čvrstu fazu gdje dolazi do vezanja, a tvorac signala, koji kasnije očitavamo, je enzim.

Rezultati: ELISA provedena na uzorcima u ovom radu pokazala je da su razine i S100B proteina i neuron specifične enolaze podjednako povišene kod migrenaša i to za vrijeme napada migrene. Nadalje pokazuju i povišene koncentracije S100B proteina i u razdoblju bez boli.

Zaključak: U ovom radu dokazana je povezanost biljega S100B i NSE s migrenom.

Ključne riječi: migrena, S100B, NSE, metoda gradijenta gustoće, ELISA

8. Summary

Introduction: Migraines are one of the leading diseases of our time. The biggest problem is the diagnosis of migraines. We examine the connection between the two markers of damaged brain tissue with migraine.

Objectives: Our aim is to determine the expression of these two markers and their correlation with years of peculiarities of the clinical picture of patients with migraine headache.

Materials and methods: The samples of venous blood were taken from people who were separated in two groups- the examinee group and control group. Criteria for examinee group were: history of presentation of migraine headaches, age under 40 years and sampled blood in between two hours of the beginning of the attack. Exclusion criteria were: age over 40 years and other organic and psychiatric diseases (excluding depression). Only healthy people can be in the control group. This means that they don't have migraines or any other diseases. Their samples are taken in the moment of „full health“. Samples have to be processed in between two hours of sampling. They are then diluted with 1xPBS. After that we add solution on top of the Histopaque 1119 and Histopaque 1077. Test tube then goes into the centrifuge. It is centrifugated 30 minutes on 700xg and room temperature. The solution is now divided in layers and the PBMCs are found in white layer. ELISA is immunochemical method by which we can identify and quantify substances of interest. One of the reactants is always bind to the solid phase. Enzym makes detectable signal when reaction is successful.

Results: ELISA has shown us significantly higher concentrations of both markers in time of migraine attack. Also, concentration of protein S100B was significantly higher in „pain free“ period.

Conclusion: In this paper we established the connection between these markers and migraine.

Key words: migraine, S100B, NSE, density gradient method, ELISA

9. Literatura

1. Palm-Meinders IH, Koppen H, Terwindt GM et al. Structural brain changes in migraine. JAMA. 2012; 308(18):1889-96
2. Demarin V, Bošnjak M. Migrena. Klinika za neurologiju KB "Sestre Milosrdnice". Cybermed 06.01.2016. Dostupno na adresi: <http://www.cybermed.hr/clanci/migrena>. Datum pristupa: 08.08.2016.
3. Rist PM, Kurth T. Migraine and cognitive decline: a topical review. Headache: The Journal of Head and Face Pain. 2013; 53:589-598.
4. Cucchiara B, Wolf RL, Nagae L et al. Migraine with Aura Is Associated with an Incomplete Circle of Willis: Results of a Prospective Observational Study. PloS one. 2013; 8(7):e71007.
5. Meen S Madhur, David S Madhur. Hypertension. Dec 2003;42(6):1206-52
Dostupno na adresi: <http://misc.medscape.com/pi/iphone/medscapeapp/html/A241381-business.html> Datum pristupa: 10.08.2016.
6. About migraine. Dostupno na adresi: <https://migraineresearchfoundation.org/about-migraine/> Datum pristupa: 21.08.2016
7. Schulte S, Podlog LW, Hamson-Utley JJ, Strathmann FG, Strüder HK. A Systematic Review of the Biomarker S100B: Implications for Sport-Related Concussion Management. Journal of Athletic Training. 2014;49(6):830-850. doi:10.4085/1062-6050-49.3.33.
8. Thelin EP, Jeppsson E, Frostell A, et al. Utility of neuron-specific enolase in traumatic brain injury; relations to S100B levels, outcome, and extracranial injury severity. Critical Care. 2016;20(1):285. doi:10.1186/s13054-016-1450-y.

9. Cvetko Krajinović L. (2014) Rane imunoreakcije u mononuklearnim stanicama periferne krvi uzrokovane virusom puumala. Doktorski rad, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, biološki odsjek.

10. What is ELISA? Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Dostupno na adresi: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction>
Datum pristupa: 01.09.2016.

11. Štraus B. Medicinska biokemija. Medicinska naklada. Zagreb, 2009.

12. Raabe A, Kopetsch O, Woszczyk A et al (2003) Serum S100B protein as a molecular marker in severe traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci* 2003; PMID: 14530578; 21:159–169

13. Papandreou O, Soldatou A, Tsitsika A et al. Serum S100b protein in children with acute recurrent headache: a potentially useful marker for migraine. *Headache The Journal of Head and Face Pain* 2005; DOI: 10.1111/j.1526-4610.2005.00263.x 45(10):1313–1316

14. Demarin V ,Rundek T ,Podobnik Šarkanji S, Lovrenčić Huzjan A. A correlation of 5-hydroxytryptamine and cerebral vasoreactivity in patients with migraine. *Funct Neurol.* 1994 Sep-Oct; PMID: 7750807; 9(5):235-45.

15. <https://en.wikipedia.org/wiki/S100B>

10. Životopis

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Luka Pnjak
Datum i mjesto rođenja: 4. rujna 1994., Slavonski Brod
Adresa stanovanja: Ivana Lucića 21, Slavonski Brod
E-mail: luka.pnjak@mefos.hr

OBRAZOVANJE

2000. - 2009. - osnovno obrazovanje

2009. - 2013. – Prirodoslovno-matematička gimnazija „Matija Mesić“, Slavonski Brod

2013. - 2016. - Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike