

# Utjecaj vanjske lumbalne drenaže na tlak i volumen cerebrospinalne tekućine, koncentracije amiloida beta i tau proteina i na klinički status bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom

---

**Brgić Mandić, Klara**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:187641>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine  
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Klara Brgić Mandić**

**Utjecaj vanjske lumbalne drenaže na  
tlak i volumen cerebrospinalne  
tekućine, koncentracije amiloida beta  
i tau proteina i na klinički status  
bolesnika s idiopatskim  
normotenzivnim hidrocefalusom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2024.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Klara Brgić Mandić**

**Utjecaj vanjske lumbalne drenaže na  
tlak i volumen cerebrospinalne  
tekućine, koncentracije amiloida beta  
i tau proteina i na klinički status  
bolesnika s idiopatskim  
normotenzivnim hidrocefalusom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2024.

**Disertacija je izrađena u Klinici za neurokirurgiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.**

**Mentor: prof.dr.sc. Marijan Klarica**

**Komentor: prof.dr.sc. Goran Mrak**

## ZAHVALA

Posebne zahvale upućujem svojem mentoru prof.dr.sc. Marijanu Klarici koji je svojim stručnim i konstruktivnim savjetima, angažmanom i izdvojenim vremenom značajno pridonio izradi ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se i svojem komentoru i učitelju prof.dr.sc. Goranu Mraku koji je imao značajan doprinos u mojem neurokirurškom putu, te bio podrška i stručni korektiv kad je to bilo potrebno. Zahvaljujem se svim kolegama te medicinskim sestrama i tehničarima, posebno Jedinici postintezivnog liječenja, koji su svojim zalaganjem pridonijeli tehničkom dijelu ovog istraživanja. Posebna zahvala kolegi dr.sc. Hrvoju Bariću za pomoć pri statističkoj obradi podataka. Zahvaljujem cijeloj svojoj obitelji, posebno roditeljima i suprugu koji su mi uvijek bili podrška u svim mojim profesionalnim postignućima.

## SADRŽAJ

<b>1. Uvod i svrha rada .....</b>	<b>1</b>
1.1. Anatomija i fiziologija cerebrospinalne tekućine .....	1
1.2. Klasična hipoteza o fiziologiji cerebrospinalne tekućine .....	2
1.2.1. Sekrecija cerebrospinalne tekućine .....	3
1.2.2. Cirkulacija cerebrospinalne tekućine .....	4
1.2.3. Apsorpcija cerebrospinalne tekućine .....	4
1.3. Nova hipoteza o fiziologiji cerebrospinalne tekućine .....	5
1.4. Hidrocefalus .....	7
1.4.1. Normotenzivni hidrocefalus .....	8
1.5. Drenažni sustavi u liječenju normotenzivnog hidrocefalusa .....	12
1.6. Biomarkeri u cerebrospinalnoj tekućini .....	16
1.6.1. Amiloid beta .....	16
1.6.2. Tau proteini .....	17
1.6.3. Ostali biomarkeri u pacijenata s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom .....	18
1.7. Volumetrija cerebrospinalne tekućine .....	19
1.7.1. Segmentacija .....	19
1.7.1.1. Manualna/ poluautomatska segmentacija .....	20
1.7.1.2. Automatska segmentacija .....	21
<b>2. Hipoteza.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Ciljevi rada.....</b>	<b>24</b>
3.1. Opći cilj .....	24
3.2. Specifični ciljevi.....	24
<b>4. Materijali i metode .....</b>	<b>25</b>
4.1. Ispitanici .....	25
4.2. Postavljanje vanjske lumbalne drenaže, drenaža cerebrospinalne tekućine i mjerenje lumbalnog/ intrakranijskog tlaka .....	27
4.3. MR snimanje .....	28
4.4. Volumetrijska analiza .....	30
4.5. Kvantifikacija biomarkera u cerebrospinalnoj tekućini.....	34
4.5.1. ELISA.....	34

4.6. Statistička analiza .....	35
<b>5. Rezultati .....</b>	<b>36</b>
5.1. Ispitanici: sociodemografski i klinički podaci.....	36
5.2. Promjene volumena cerebrospinalne tekućine prije i nakon vanjske lumbalne drenaže.....	38
5.3. Promjene tlakova cerebrospinalne tekućine tijekom drenaže .....	46
5.4. Koncentracije biomarkera u cerebrospinalnoj tekućini tijekom drenaže .....	51
5.5. Korelacije između sociodemografskih i kliničkih parametara s promjenama volumena cerebrospinalne tekućine .....	56
<b>6. Rasprava .....</b>	<b>58</b>
6.1. Značenje volumetrije kranijalnog i spinalnog prostora za bolesnike s NPH-om.....	59
6.2. Promjene tlakova cerebrospinalne tekućine tijekom dijagnostičke procedure.....	62
6.3. Povezanost promjena volumena i tlakova CST-a s promjenama koncentracije biomarkera.....	63
<b>7. Zaključci.....</b>	<b>66</b>
<b>8. Sažetak.....</b>	<b>67</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>68</b>
<b>10. Literatura .....</b>	<b>70</b>
<b>11. Životopis .....</b>	<b>85</b>

## POPIS KRATICA I OZNAKA

CST	cerebrospinalna tekućina
SŽS	središnji živčani sustav
ml/ dan	mililitar na dan
ml	mililitar
g	gram
Na <sup>+</sup>	natrijev ion
ml/ min	mililitar u minuti
mm Hg	milimetar stupca žive
IST	intersticijska tekućina
KMB	krvno-moždana barijera
HT <sub>k</sub>	hidrostatski kapilarni tlak
HT <sub>i</sub>	hidrostatski intersticijski tlak
OT <sub>k</sub>	osmotski kapilarni tlak
OT <sub>i</sub>	osmotski intersticijski tlak
iNPH	<i>engl. idiopathic normal pressure hydrocephalus</i> - idiopatski normotenzivni hidrocefalus
sNPH	<i>engl. secondary normal pressure hydrocephalus</i> - sekundarni normotenzivni hidrocefalus
DESH	<i>engl. disproportionately enlarged subarachnoid-space hydrocephalus</i> - hidrocefalus s neproporcionalno proširenim subarahnoidnim prostorima
cm	centimetar
EI	Evansov indeks
MP-RAGE	<i>engl. magnetization-prepared rapid gradient-echo</i> - T1 sekvenca magnetske rezonance
z-EI	koronarni Evansov indeks
z-os	koronarna os
x-os	aksijalna os
ELD	<i>engl. external lumbar drainage</i> - vanjska lumbalna drenaža
cm H <sub>2</sub> O	centimetar stupca vode
VP	ventrikuloperitonealna drenaža



LP	lumboperitonealna drenaža
Rtg	rentgen
QRT	<i>engl. quick reference table-</i> brza referentna tablica
SINPHONI	<i>engl. Study of Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus on Neurological Improvement-</i> Japanska studija o idiopatskom normotenzivnom hidrocefalusu i neurološkom poboljšanju
AD	Alzheimerova demencija
A $\beta$	amiloid beta
t-tau	<i>engl. total tau protein-</i> ukupni tau protein
p-tau	<i>engl. phosphorylated tau protein-</i> fosforilirani tau protein
APP	amiloidni prekursorski protein
Thr	treonin
Ser	serin
NFT	<i>engl. neurofibrillary tangles-</i> neurofibrilarni snopići
IL	interleukini
TGF $\beta$	<i>engl. tumour growth factor <math>\beta</math>-</i> tumorski faktor rasta $\beta$
CT	kompjuterizirana tomografija
MR	magnetska rezonanca
2D	dvodimenzionalno
3D	trodimenzionalno
ICC	<i>engl. intracranial cavity -</i> intrakranijska šupljina
WM	<i>engl. white matter-</i> bijela tvar
GM	<i>engl. grey matter-</i> siva tvar
CSF	<i>engl. cerebrospinal fluid -</i> cerebrospinalna tekućina
mm <sup>3</sup>	kubični milimetar
NICE	<i>engl. Non-local Intracranial Cavity Extraction-</i> ne-lokalno izdvajanje intrakranijske šupljine
h	sat
MMSE	<i>engl. Mini- mental state examination-</i> mini-mental test
JNPHS	<i>engl. Japanese normal pressure hydrocephalus score-</i> Japanska NPH ljestvica
G	<i>engl. gauge-</i> veličina promjera igle
LIV, LV, SI	četvrti lumbalni, peti lumbalni i prvi spinalni kralježak
IAC	<i>engl. internal auditory canal-</i> unutarjni slušni hodnik
T	Tesla- mjerna jedinica magnetske indukcije (gustoće magnetskoga toka)

3D SPACE	<i>engl. Sampling Perfection with Application optimized Contrast using different flip angle Evolution-</i> 3D sekvenca koju je razvio Siemens
CTh	cervikotorakalni segment
ThLS	torakolumbosakralni segment
NIfTI	<i>engl. The Neuroimaging Informatics Technology Initiative-</i> otvoreni format datoteka za pohranu MR slika
MRICron	platforma za prikaz slika u NIfTI formatu
ROI	<i>engl. region of interest-</i> regija interesa
min	minuta
g	gram
ELISA	<i>engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-</i> enzimski povezani imunosorbentni test
SPSS	<i>engl. Statistical Package for the Social Sciences-</i> softverski statistički program
ml	mililitar
rho ( $r_s$ )	rho ( $\rho$ )- Spearmanov koeficijent

## 1. UVOD I SVRHA RADA

Novija ispitivanja na eksperimentalnim životinjama, modelima te bolesnicima s normotenzivnim hidrocefalusom ukazuju da se tlak cerebrospinalne tekućine ponaša u skladu sa zakonom o mehanici fluida i da bi se prema novoj hipotezi o hidrodinamici cerebrospinalne tekućine, na temelju izmjerenih vrijednosti tlakova u lumbalnom prostoru u horizontalnom i uspravnom položaju tijela, te izmjerenih anatomskih dimenzija kranijaskog i spinalnog prostora, moglo zaključivati o visini intrakranijaskog tlaka u fiziološkom, uspravnom položaju što predstavlja revoluciju u razumijevanju regulacije intrakranijaskog tlaka te u dijagnostici i liječenju bolesnika s hidrocefalusom i drugim bolestima povezanim s cerebrospinalnom tekućinom. Svrha ovog rada je ispitati dolazi li do značajnog kliničkog poboljšanja u bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom nakon lumbalne drenaže i evakuacije cerebrospinalne tekućine, dominantno promjenom spinalnog volumena CST-a te postoji li značajna promjena koncentracije biomarkera tijekom višednevne lumbalne drenaže (to bi ukazivalo na značajnu patofiziološku ulogu spinalnog prostora kao kompenzacijskog prostora i na „ispiranje“ toksičnih metabolita kao mogućeg terapijskog mehanizma kod vanjske drenaže CST-a).

Ispitanici su bolesnici s kliničkim i neuroradiološkim znakovima normotenzivnog hidrocefalusa kod kojih bi se višednevnom evakuacijom CST-a putem lumbalne drenaže monitorirao intrakranijaski tlak, koncentracija biomarkera u CST-u te promjene u volumetriji cerebrospinalne tekućine intrakranijaskog i spinalnog prostora. Stoga ćemo u uvodnom dijelu navesti ključne podatke o anatomiji i fiziologiji cerebrospinalne tekućine, dosadašnje spoznaje o regulaciji tlaka cerebrospinalne tekućine tj. intrakranijaskog tlaka, patofiziologiji hidrocefalusa, vrstama drenažnih sustava u liječenje hidrocefalusa, biomarkerima u cerebrospinalnoj tekućini te tehnikama volumetrije cerebrospinalne tekućine i tkiva središnjeg živčanog sustava.

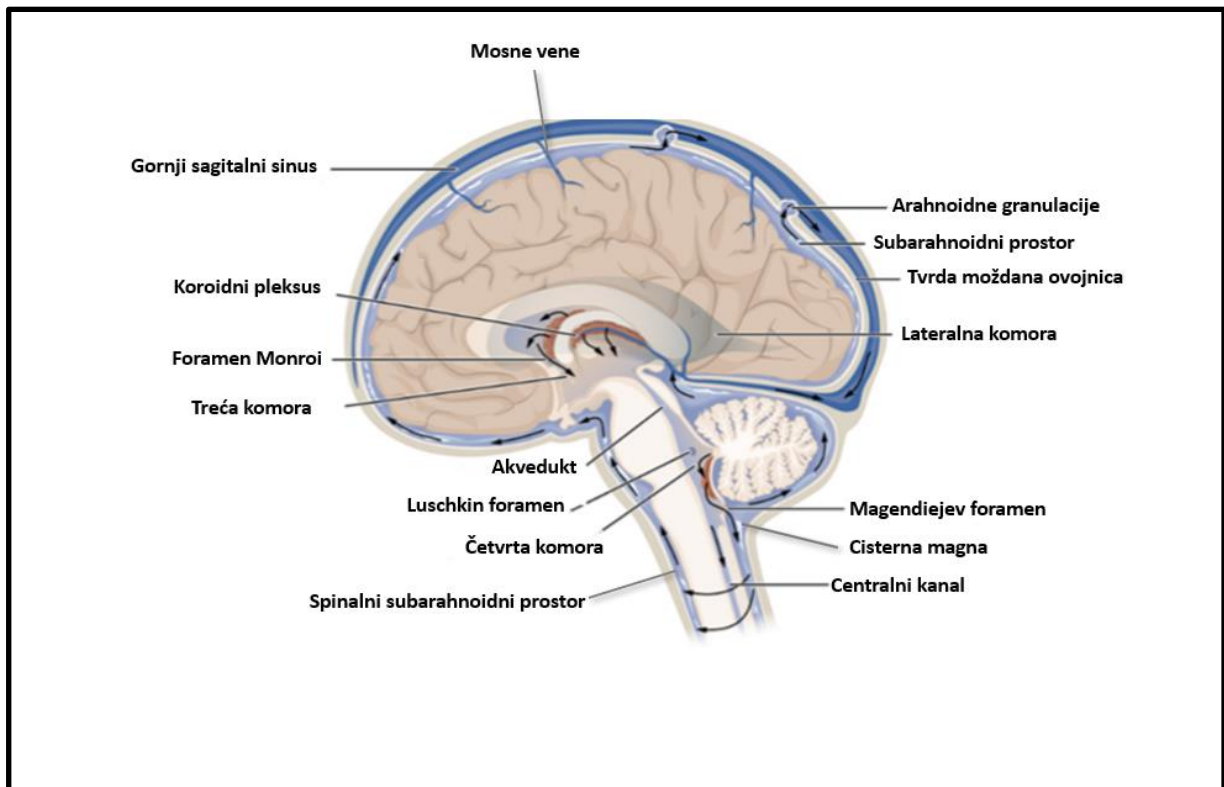
### 1.1. Anatomija i fiziologija cerebrospinalne tekućine

Cerebrospinalna tekućina je bistra prozirna tekućina koja ispunjava komore, intrakranijasko i spinalno subarahnoidno prostora te perivaskularne prostora u središnjem živčanom sustavu (SŽS-u). Cerebrospinalna tekućina je mješavina vode (99% volumena CST-

a čini voda), proteina u niskoj koncentraciji, iona, neurotransmitera te glukoze, a obnavlja se tri do četiri puta dnevno (1-3). Produkcija cerebrospinalne tekućine iznosi oko 500 ml/dan te se procijenjuje da ukupno u tijelu u svakom trenutku ima 125-150 ml CST-a (4). Međutim, novija volumetrijska ispitivanja pokazuju da je volumen cerebrospinalne tekućine u normalnoj populaciji i veći od procijenjenog te iznosi oko 250 ml (5). Cerebrospinalna tekućina ima nekoliko važnih uloga u zaštiti SŽS-a kao što su mehanička zaštita, osiguravanje nutritivnih tvari te uklanjanje štetnih tvari. Osim što djeluje kao mehanička zaštita u vidu apsorpiranja udaraca mozga o lubanju, smanjuje i efektivnu masu mozga s 1500 g na manje od 50 g time smanjujući utjecaj vanjskih sila na moždani parenhim, smanjuje inerciju moždane mase te istežanje krvnih žila. Cerebrospinalna tekućina održava hemostazu intersticijske tekućine u mozgu što omogućava normalnu funkciju neurona, a važna je i u uklanjanju štetnih tvari kao što su produkti peroksidacije, glikozilirani proteini, neurotransmiteri te ostalih produkata moždanog metabolizma (1,3,4).

## **1.2. Klasična hipoteza o fiziologiji cerebrospinalne tekućine**

Prema klasičnoj hipotezi o fiziologiji cerebrospinalne tekućine, ona se aktivno stvara unutar ventrikularnog sustava i to većim dijelom iz koroidnih pleksusa, a manjim dijelom iz ependima (6,7). Cirkulacija cerebrospinalne tekućine je prema klasičnoj hipotezi jednosmjerna iz ventrikularnog sustava prema subarahnoidnom prostoru (iz lateralnih i treće komore cirkulira kroz akvedukt u četvrtu komoru, a potom iz četvrte komore kroz Luschkine i Magendijev otvor ulazi u cisternu magnu te spinalni subarahnoidni prostor). Vjeruje se kako se veći dio vraća natrag iz cisterne magne u intrakranijski supratentorijski subarahnoidni prostor gdje se zbog gradijenta tlaka odvija pasivna apsorpcija u duralne venske sinuse preko arahnoidnih granulacija (4).



*Slika 1.1. Strelice prikazuju cirkulaciju cerebrospinalne tekućine unutar kraniospinalnog prostora prema klasičnoj hipotezi. CST se nakon stvaranja unutar komora jednosmjerno giba iz lateralnih i treće komore kroz akvedukt u četvrtu moždanu komoru, a potom kroz središnji i lateralne foramene četvrte komore u cisternu magnu i u spinalni subarahnoidni prostor. Veći dio CST-a se potom vraća natrag u intrakranijski subarahnoidni prostor gdje se zbog gradijenta tlaka odvija pasivna apsorpcija u duralne venske sinuse kroz arahnoidne granulacije (modificirano prema <https://cnx.org/contents/FPtK1zmh@8.25:fE13C8Ot@10/Preface>).*

### 1.2.1. Sekrecija cerebrospinalne tekućine

Prema klasičnoj hipotezi cerebrospinalna se tekućina aktivno stvara isključivo unutar sustava moždanih komora i to većim dijelom u koroidnim pleksusima (70-80%), a manjim dijelom iz endotelijalnih stanica koje oblažu moždane komore (20-30%) (6,7). Koroidni pleksus se sastoji od složene kapilarne mreže, obložene specijaliziranim stanicama. Inicijalni korak u stvaranju cerebrospinalne tekućine je pasivna ultrafiltracija plazme iz fenestrirane kapilarne mreže u intersticijsko tkivo koroidnog pleksusa, a potom slijedi aktivna faza sekrecije koja uključuje brojne ionske kanale kako na bazalnoj tako i na apikalnoj površini epitela koroidnog pleksusa. Transportirani natrijevi ioni ( $\text{Na}^+$ ) unutar ventrikula stvaraju osmotski gradijent koji potom navlači vodu (8). Veličina sekrecije cerebrospinalne tekućine pokušavala se kroz povijest odrediti različitim metodama, počevši od životinjskih modela Dandyja, međutim,

ventrikulo-cisternalna perfuzija se donedavno smatrala jedinom znanstveno prihvatljivom metodom za određivanje brzine sekrecije CST-a. Metodom ventrikulo-cisternalne perfuzije određena je brzina sekrecije od 0,35 ml/min što znači da se tijekom dana stvori oko 500 ml CST-a (9).

### **1.2.2. Cirkulacija cerebrospinalne tekućine**

Cirkulacija cerebrospinalne tekućine je prema klasičnoj hipotezi jednosmjerna i to iz lateralnih komora (ventrikula) u treću kroz interventikularne otvore (foramina Monroi), a potom kroz cerebralni akvedukt (aqueductus Sylvii) u četvrtu komoru. CST napušta infratentorijski ventrikularni sustav kroz medijalni otvor (foramen Magendie) te lateralne otvore (foramina Luschke) gdje ulazi u cisternalni sustav i dalje napreduje u subarahnoidni prostor. U intrakranijskom subarahnoidnom prostoru CST cirkulira rostralno prema mjestu apsorpcije ili kaudalno u spinalni subarahnoidni prostor (4). Nije poznato koliki dio novostvorenog likvora iz cisterne magne se giba prema spinalnom, a koliki (prepostavlja se veći dio) odlazi u kortikalni subarahnoidni prostor. Jednosmjerna klasična teorija cirkulacije temelji se na pokusima u kojima su obilježene velike molekule (boja, proteini, radioaktivno označene velike molekule i sl.) aplicirane u komorni sustav, te se uočila njihova distribucija u subarahnoidni prostor (10).

### **1.2.3. Apsorpcija cerebrospinalne tekućine**

Prema klasičnoj hipotezi o fiziologiji cerebrospinalne tekućine, smatra se kako su arahnoidne granulacije i arahnoidne resice (protruzije vanjskog sloja arahnoidne ovojnice kroz duru mater u duralne venske sinuse) glavno mjesto apsorpcije CST-a u venski sustav (11). Ta pasivna apsorpcija kroz arahnoidne granulacije primarno se odvija pod gradijentom tlakova između subarahnoidnog prostora i duralnih venskih sinusa (12,13), a potreban gradijent za odvijanje apsorpcije iznosi 3-5 mmHg (14). U novije vrijeme smatra se kako se mali dio likvora može apsorbirati preko ovojnica spinalnih živaca, te kroz laminu cribriforme etmoidne kosti (4). Naime, istraživanja na životinjama pokazala su zanimljiv put drenaže cerebrospinalne tekućine preko arahnoidne ovojnice olfaktornog živca te nosne submukoze u cervikalne limfne čvorove (15-17).

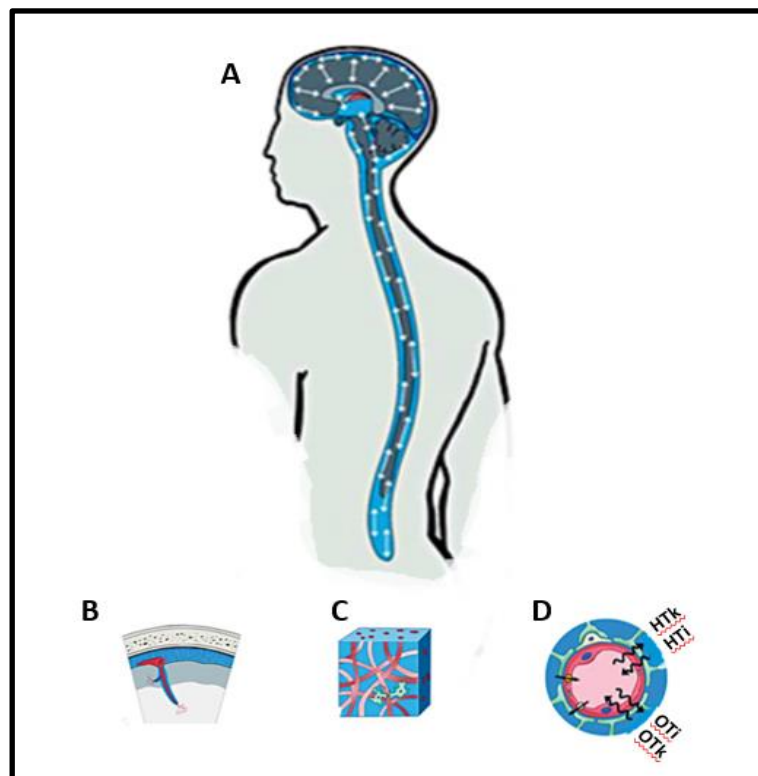
### 1.3. Nova hipoteza o fiziologiji cerebrospinalne tekućine

Brojna klinička zapažanja se ne mogu objasniti klasičnom (Weed-Dandy-Cushing) hipotezom, koja se temelji na Dandyjevom eksperimentu iz 1919. kad je nakon unilateralne koagulacije koroidnog pleksusa i opstrukcije oba foramina Monroi u psa, dobio kolabirani ventrikul na strani pleksektomije te unilateralnu dilataciju ventrikula koji je sadržavao koroidni pleksus (18). Vođen rezultatima eksperimenta, Dandy je prezentirao koroidni pleksus kao biološku pumpu te glavno mjesto proizvodnje CST-a. Weed i Cushing su pretpostavili da stalna aktivna intraventrikularna sekrecija potiče cirkulaciju cerebrospinalne tekućine do mjesta apsorpcije (13). Međutim, Dandyjev eksperiment koji je jedan od ključnih postulata na kojima se temelji klasična teorija o fiziologiji CST-a proveden je na jednom jedinom psu te je vjerojatno riječ o eksperimentalnom artefaktu (19-21). To opažanje je tih godina po prvi put ukazalo kako bi uzrok hidrocefalusa mogla biti opstrukcija likvorskih puteva između mjesta sekrecije i mjesta apsorpcije cerebrospinalne tekućine. Takvo klasično shvaćanje patofiziologije hidrocefalusa nije preispitivano dugi niz godina, te je koagulacija koroidnih pleksusa dugo korištena kao jedna od kirurških metoda liječenja hidrocefalusa s varijabilnim ishodima.

Pokusi na životinjama nakon uklanjanja koroidnih pleksusa pokazali su da stopa sekrecije cerebrospinalne tekućine iznosi 70% sekrecije u kontrolnih životinja (22). Prema Milhoratu produkcija cerebrospinalne tekućine se, u pleksektomiranih bolesnika, u petogodišnjem intervalu normalizira te je usporediva s produkcijom CST-a u osoba bez hidrocefalusa (23). Studija na pedijatrijskim bolesnicima kod kojih je najprije učinjena endoskopska koagulacija pleksusa (24) pokazala je da je u 48% bolesnika nakon pleksektomije bila nužna dodatna drenažna operacija radi razvoja hidrocefalusa. Svi ovi rezultati pokazuju kako je uloga koroidnog pleksusa u patofiziologiji hidrocefalusa i samoj sekreciji cerebrospinalne tekućine i dalje nejasna.

Prema novoj (Bulat-Klarica-Orešković) hipotezi, koju potkrepljuju brojni eksperimentalni rezultati, koroidni pleksus nije glavno mjesto produkcije cerebrospinalne tekućine, sama CST ne cirkulira, a apsorpcija je moguća posvuda kroz kapilarnu mrežu SŽS-a (25). Obzirom da je 99% cerebrospinalne tekućine voda, prema novoj hipotezi intersticijska tekućina (IST) kao i cerebrospinalna tekućina nastaju posljedično filtraciji vode duž cijelog SŽS-a kroz arterijski kapilarni zid (25-27). Brza kontinuirana izmjena vode između plazme i IST/CST funkcionalne jedinice ovisi o fiziološkim te patofiziološkim procesima koji uzrokuju promjene hidrostatskih i osmotskih tlakova između navedenih odjeljaka, uzrokujući time

promjene volumena cerebrospinalne tekućine. Stoga, ne postoji samo mjesto aktivne sekrecije te pasivne apsorpcije već je cijeli SŽS mjesto stvaranja i apsorpcije CST-a (21,26,28,29). Rezultati eksperimenta nakon aplikacije radioaktivno obilježene vode u krv i različite likvorske odjeljke (26,27,30,31,32) pokazuju brzo i ravnomjerno raspoređivanje iste kroz cijeli SŽS te likvorski sustav tijekom kojeg volumen ostaje isti. U stanjima lokalno povišenog osmolariteta dolazi do brže filtracije vode u CST, što pak dovodi do povećanog volumena CST-a te tlaka i posljedično dilatacije ventrikularnog sustava (31,33,34). Prema novoj hipotezi ne postoji niti jednosmjerni tok cerebrospinalne tekućine, već je gibanje cerebrospinalne tekućine pulzatilno u oba smjera kraniospinalno (vidi sliku 1.2.). Pulzacije likvora su posljedica pulzacija krvnih žila, najizraženije u području baze lubanje, interhemisferički te u sulkusima (35,36,37). U spinalnom dijelu izraženiji je i utjecaj gravitacije na redistribuciju CST-a prilikom različitih položaja tijela.



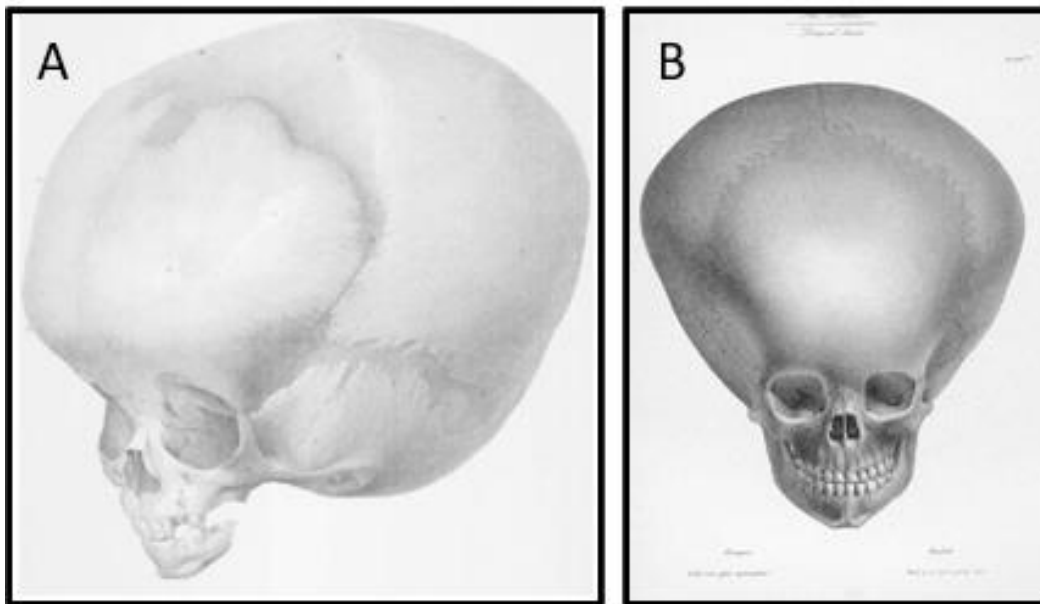
**Slika 1.2.** Shema novog koncepta fiziologije cerebrospinalne tekućine A) pulzatilni bidirekcijski tok cerebrospinalne tekućine označen je strelicama (najintenzivnije pulzacije se događaju u interhemisferičnoj, bazalnoj i spinalnoj regiji). B) prikaz krvnih žila u mozgu- veće molekule prolaze u moždano tkivo nakon aplikacije u CST kroz perivaskularne prostore da bi dospjele do brojne kapilarne mreže, no kako je eliminacija takvih tvari iz intersticijske tekućine i cerebrospinalne tekućine spora, moguća je njihova ravnomjerna distribucija kroz moždano tkivo i likvorski sustav. Međutim, male molekule poput vode jako brzo se mogu ukloniti putem kapilarne mreže iz intersticijske tekućine. C) kapilarna mreža mozga predstavlja veliku površinu koja je 5000x veća od površine kapilara koroidnog plesusa. D) prikaz krvno- moždane barijere koju čine endotelne stanice, periciti, neuroni, astrocitne nožice i bazalna membrana. Liposolubilne molekule prolaze KMB pasivnom difuzijom, regulirane koncentracijskim gradijentom. Izmjena vode ovisi o hidrostatskim gradijentima tlaka (HTk- hidrostatski kapilarni tlak i HTi- hidrostatski intersticijski tlak), osmotskom kapilarnom tlaku (OTk) i osmotskom intesticijskom tlaku (OTi). Hidrofilne i veće molekule prolaze između krvi i intersticija različitim transportnim sustavima (modificirano prema referenci broj 25).



Temeljem navedenog, klasična teorija o patofiziologiji nastanka hidrocefalusa je jasno dovedena u pitanje.

#### 1.4. Hidrocefalus

Hidrocefalus je stanje obilježeno proširenjem ventrikularnog sustava posljedično nakupljanju cerebrospinalne tekućine. Naziv hidrocefalus ima svoju etiologiju u grčkom jeziku, a nastao je sklapanjem grčkih riječi ὕδωρ, *hydōr* što znači "voda" i κεφαλή, *kephalē* što znači "glava" - u prijevodu „vodena glava“. Prvi poznati zapisi o „vodi“ oko mozga u makrocefalične djece potječu od Hipokrata, dok se termin „hidrocefalus“ prvi put koristi u zapisima Celzusa iz razdoblja između 25. godine prije Krista i 50. godine nakon Krista (38,39).



**Slika 1.3.** A) Prikaz tipične lubanje djeteta s hidrocefalusom kod kojeg nije došlo do zatvaranja lubanjskih šavova (sutura). B) Prikaz lubanje djeteta s hidrocefalusom u dobi od 5 godina kod kojeg su zatvoreni lubanjski šavovi (izvor: javno dostupne slike - Vimont, Engelmann/ National Library of Medicine i 'Tête d'hydrocéphale' (Lebaudy, c.1836), Jubilothèque (UPMC Paris)).

Wernicke je 1881. izveo sterilnu ventrikularnu punkciju te vanjsku drenažu likvora, dok je prvu trajnu ventrikulo-subarahnoidno-subgalealnu drenažu izveo Mikulicz 1893. godine (39).

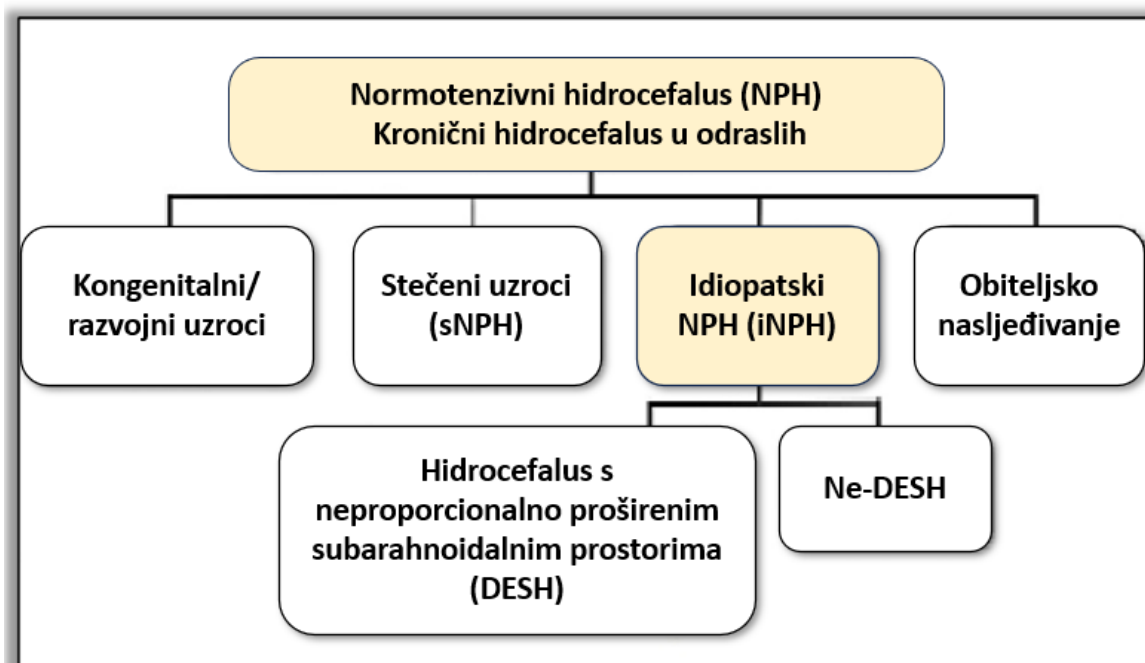
Prevalenciju hidrocefalusa je teško utvrditi, obzirom da može nastati i u starijoj dobi, no smatra se da incidencija u djece iznosi 1- 2/1000 novorođenih. Simptomi hidrocefalusa se

razlikuju ovisno o dobi pacijenta te brzini nastanka hidrocefalusa. U dojenačkoj dobi, osim povećanja opsega glave te izbočenosti fontanela, kod akutnog povišenja intrakranijskog tlaka dolazi do povraćanja, pospanosti, pogleda zalazećeg sunca, te epileptičkih napadaja. Simptomi u starije djece i odraslih uključuju glavobolju, smetnje vida, smetnje ravnoteže i hoda, urinarnu inkontinenciju, te kognitivne smetnje i promjene ponašanja.

Uzroci hidrocefalusa su najvjerojatnije multifaktorijalni, a prema klasičnoj hipotezi mogu biti uzrokovani opstrukcijom protoka, poremećajima produkcije ili apsorpcije cerebrospinalne tekućine. Postoje četiri vrste hidrocefalusa: komunicirajući, nekomunicirajući (opstruktivni), ex vacuo i normotenzivni hidrocefalus (11). Smatra se da je komunicirajući hidrocefalus uzrokovan poremećajem apsorpcije na razini subarahnoidnog prostora, a mogući uzroci su subarahnoidno krvarenje, infekcije, kongenitalni nedostatak arahnoidnih granulacija. Nekomunicirajući ili opstruktivni hidrocefalus nastaje kao posljedica opstrukcije protoka cerebrospinalne tekućine, a posljedično kongenitalnim ili stečenim stanjima kao što su Chiari malformacija, Dandy-Walker malformacija, akveduktalna stenoza/ atrezija, tumorski procesi, upalni procesi, krvarenja. Druge dvije vrste hidrocefalusa „ex vacuo“, te normotenzivni hidrocefalus kako im i sam naziv govori nisu povezani s povišenim intrakranijskim tlakom. Hidrocefalus „ex vacuo“ označava kompenzatorno proširenje komora te subarahnoidnog prostora posljedično atrofiji mozgovine u sklopu demencije, posttraumatske ozljede mozga, krvarenja i sl.

#### **1.4.1. Normotenzivni hidrocefalus**

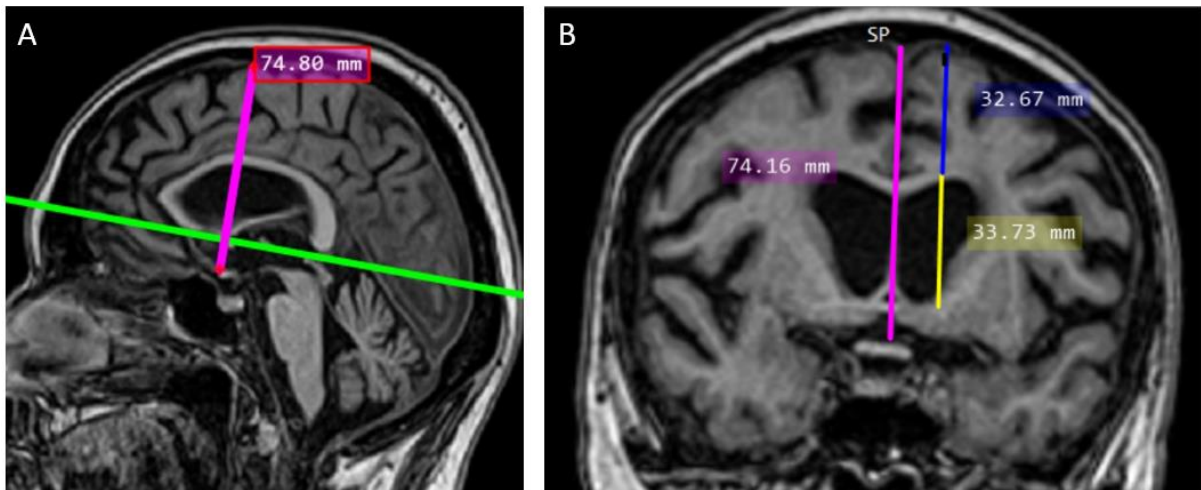
Normotenzivni hidrocefalus je kliničko stanje karakterizirano trijasom simptoma koji uključuju smetnje hoda, urinarnu inkontinenciju, te kognitivne smetnje (40-42). Hakim i Adams su 1965. prvi put opisali navedeno kliničko stanje povezano s proširenim ventrikularnim sustavom uz normalne vrijednosti intrakranijskog tlaka (40). Klasifikacija normotenzivnog hidrocefalusa obuhvaća idiopatski normotenzivni hidrocefalus (iNPH), te stečene oblike normotenzivnog hidrocefalusa u koji spadaju kongenitalni, sekundarno stečeni te obiteljski nasljeđeni oblici (Slika 1.4.). Idiopatski normotenzivni hidrocefalus ili kako se konceptualno nazivao „oblikom izlječive demencije“ teško je razlikovati od drugih neurodegenerativnih bolesti obzirom da su neuroradiološki pokazatelji i klinička slika slični, a sam razvoj sporo progresivan.



**Slika 1.4.** Shematski prikaz klasifikacije normotenzivnog hidrocefalusa. *iNPH*- idiopatski normotenzivni hidrocefalus, *sNPH*- sekundarni normotenzivni hidrocefalus, *DESH*: disproportionately enlarged subarachnoid space hydrocephalus- hidrocefalus s disproportionalno proširenim subarahnoidalnim prostorima)

Studije s velikom kohortom bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom su pokazale da je početak bolesti u većine pacijenata oko 75. godine života (43,44). Prevalencija idiopatskog normotenzivnog hidrocefalusa iznosi prema retrospektivnim populacijski baziranim studijama iz Švedske 3,7% (44,45), dok prema Japanskim studijama iznosi 1,6% što je značajno niže (46-49). Smetnje hoda su prisutne u gotovo svih bolesnika i javljaju se tipično kao prvi simptom, a smatra se da su uzrokovane pritiskom proširenih komora na vlakna kortikospinalnog puta (50). Karakterističan je hod na širokoj osnovi, sitnim koracima, a bolesnici imaju osjećaj da “ne mogu odignuti noge od poda“, uz često prisutnu retropulziju (51-56). Kognitivne smetnje su prisutne u 78–98% bolesnika, dok su smetnje kontinencije u vidu urinarne urgencije i progresivne urinarne inkontinencije prisutne u 60–92% bolesnika prilikom dijagnoze. Najznačajnije kognitivne promjene u pacijenata s *iNPH*-om jesu psihomotorna usporenost, smetnje pažnje i radne memorije (53,57-62), a regije koje su za to zaslužne su corpus callosum (63), medijalni frontalni režanj, prednji cingulum, te strijatum (64,65). Osim kognitivnih smetnji u bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom česte su i promjene ponašanja kao što su apatija/abulija, depresija ili pak anksioznost (66).

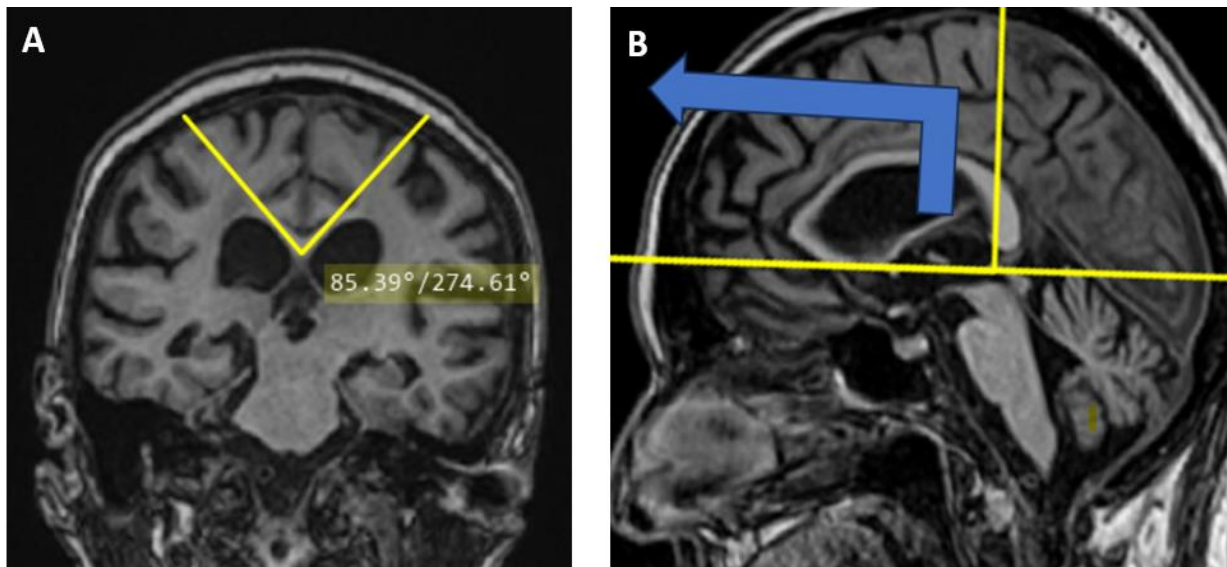
Za postavljanje dijagnoze idiopatskog normotenzivnog hidrocefalusa, osim isključivanja mogućih sekundarnih uzroka hidrocefalusa nužno je zadovoljiti i radiološke kriterije kao što su: proširenje ventrikularnog sustava (osobito frontalnih i temporalnih rogova), Evansov indeks  $>0,3$ , izbočenje korpusa kalozuma kranijalno, proširenje Silvijevih fisura, nesrazmjerno s proširenjem sulkusa na konveksitetu, te povišenje signala u T2 mjerenim sekvencama periventrikularno. Evansov indeks se definira kao omjer maksimalne širine frontalnih rogova i maksimalnog intrakranijskog promjera na istom radiološkom sloju, te kod većine pacijenata s iNPH-om iznosi  $>0,3$ . Obzirom da je proširenje ventrikularnog sustava izraženije u koronarnoj ravnini (z-os), nego u aksijalnoj (x-os), modificirani Evansov indeks (z-EI) (67), koji je definiran omjerom visine frontalnih rogova u koronarnoj ravnini i središnjim promjerom lubanje, je bolji dijagnostički kriterij od tradicionalnog Evansovog indeksa koji može biti i  $<0,3$  kod pacijenata s normotenzivnim hidrocefalusom (Slika 1.5.).



**Slika 1.5.** Prikaz MP-RAGE sekvenci jednog bolesnika. A) Modificirani Evansov indeks (zEI) se procjenjuje na koronarnom presjeku (ružičasta linija) kroz prednju komisuru, a okomito na liniju koja spaja prednju i stražnju komisuru (zelena linija). B) zEI se izračunava omjerom visine frontalnih rogova (žuta linija) u koronarnom presjeku (z os) i promjera kroz središnju liniju (ružičasta linija). Vrijednosti  $>0,42$  ukazuju na hidrocefalus. U ovom primjeru zEI iznosi 0,45.

Radiološke karakteristike koje su također značajne u dijagnozi idiopatskog normotenzivnog hidrocefalusa jesu proširenje Silvijevih fisura uz redukciju subarahnoidnih prostora konveksiteta, najizraženije u parijetalnoj regiji (68-72). Predloženo je da se hidrocefalus s takvim radiološkim karakteristikama naziva DESH (engl. disproportionately enlarged subarachnoid-space hydrocephalus) - odnosno hidrocefalus s neproporcionalno proširenim subarahnoidnim prostorima (73). Radiološke karakteristike DESH-a su prisutne u

64% bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom, imaju visoku osjetljivost i specifičnost i koriste se za razlikovanje iNPH-a od atrofije u sklopu neurodegenerativnih bolesti (npr. Alzheimerova bolest) (68,70,71). Stoga, ne može se dijagnostika temeljiti isključivo na karakteristikama DESH-a već je potrebno analizirati i druge radiološke karakteristike koje su učestalije u bolesnika s iNPH-om. Jedna od takvih je i kalozalni kut koji je mjera kuta između lijeve i desne strane korpusa kalozuma izmjenjenog na sloju kroz stražnju komisuru, a u većine pacijenata s iNPH-om iznosi  $<90^\circ$  (Slika 1.6.).



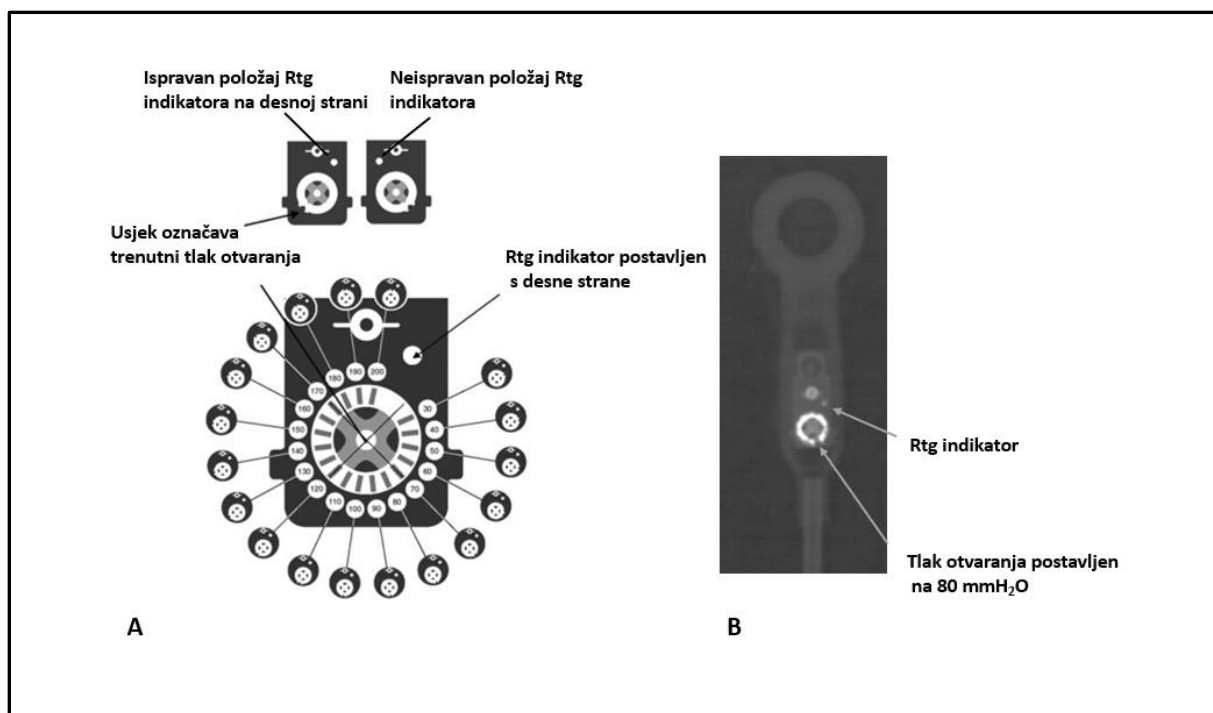
**Slika 1.6.** Prikaz MP-RAGE sekvenci jednog bolesnika. A) Kalozalni kut je kut između lijeve i desne strane korpusa kalozuma koji čine gornje omeđenje moždanih komora, a određuje se u koronarnoj ravnini. B) Kalozalni kut se određuje na koronarnom presjeku kroz stražnju komisuru, a okomito na liniju koja povezuje prednju i stražnju komisuru. U većine pacijenata s iNPH-om iznosi  $<90^\circ$ .

Ukoliko postoji klinička i radiološka sumnja na iNPH potrebno je učiniti testnu drenažu cerebrospinalne tekućine, bilo „tap-test“-om kojim se ispušta 30-50 ml likvora jednokratno ili vanjskom lumbalnom drenažom (ELD) kojom se kroz određeno vremensko razdoblje (najčešće tri dana ) odstranjuje značajna količina CSF-a, te procjenjuje klinički status. U ovom istraživanju je kao referentni tlak otvaranja prilikom lumbalne punkcije postavljena vrijednost manja od 18 mmHg, odnosno manja od 25 cm H<sub>2</sub>O. Ukoliko nakon testne drenaže bolesnici pokažu kliničko poboljšanje najprije dolazi do poboljšanja hoda, dok se značajno poboljšanje urinarne inkontinencije te kognitivno poboljšanje zamjećuje kasnije (74-76). Usprkos svemu navedenom idiopatski normotenzivni hidrocefalus s razlogom nosi prefiks idiopatski jer ni nakon više od pola stoljeća njegova etiologija, dijagnostika i liječenje nisu do kraja razjašnjeni.

## 1.5. Drenažni sustavi u liječenju normotenzivnog hidrocefalusa

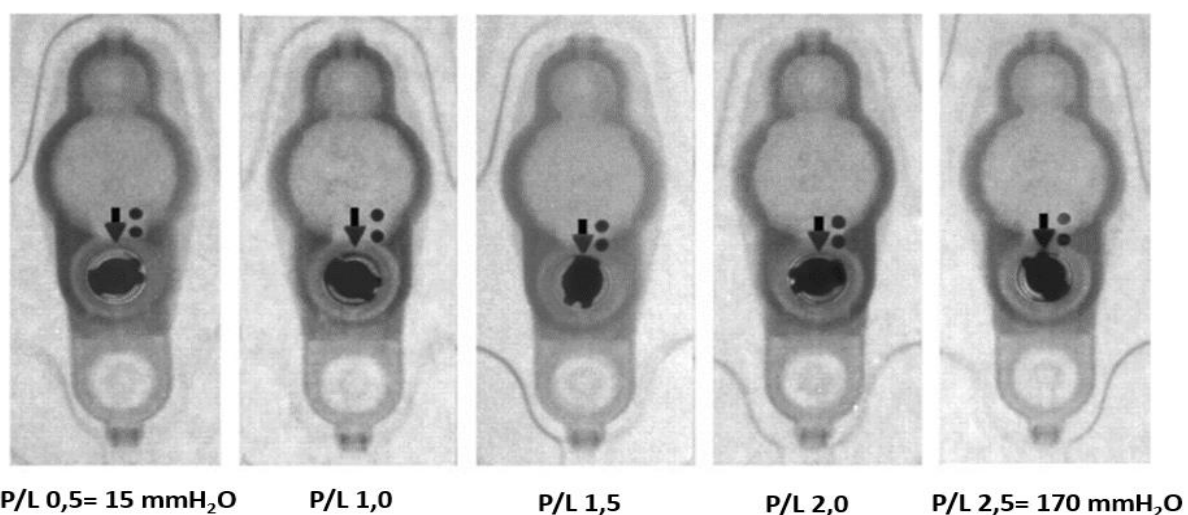
Za liječenje idiopatskog normotenzivnog hidrocefalusa najčešće se koriste drenažni sustavi s programabilnom valvulom koji se sastoje od tri komponente: proksimalnog katetera (postavlja se u ventrikularni sustav ili lumbalni subarahnoidni prostor), programabilne valvule, te distalnog katetera (najčešće se postavlja u peritonealnu šupljinu). Kao bi se spriječila pretjerana drenaža CST-a u vertikalnom položaju (zbog velikog hidrostatskog gradijenta unutar drenažnog sustava) neki od sustava s programabilnom valvulom imaju ugrađen i antisifonski uređaj. Ugradnja sustava s programabilnom valvulom omogućava individualno postavljanje željenog tlaka otvaranja prilikom ugradnje, ali i kasnije transkutanom namještanjem valvule na željeni tlak, koristeći posebne programatore s kodiranim magnetskim poljem. Najčešće korišteni sustavi s programabilnom valvulom jesu: Codman Hakim (Integra), Miethke proGAV (Aesculap), Strata (Medtronic) i Sophy i Polaris (Sophysa) (77).

Codman Hakim programabilna valvula (Integra) ima mogućnost namještanja tlaka otvaranja na vrijednosti između 30 i 200 mm H<sub>2</sub>O (Slika 1.7.), a može se koristiti zajedno sa SiphonGuard uređajem koji sprječava pretjeranu drenažu (77).



**Slika 1.7.** Codman Hakim programabilna valvula A) prikaz različitih tlakova otvaranja i pravilan položaj indikatora na Rtg snimci. B) radiografski prikaz tlaka otvaranja (modificirano prema <https://www.integralife.com/file/general/1576700745.pdf>).

Strata programabilna valvula (Medtronic) ima pet mogućih postavki od 0,5 - 2,5 (P/L) te svaka postavka odgovara točno određenom tlaku otvaranja koji iznose između 15 i 170 mm H<sub>2</sub>O (Slika 1.8.), dok Strata II ima ugrađen u antisifonski uređaj.



**Slika 1.8.** Strata Medtronic programabilna valvula- radiografski prikazi pet različitih postavki od P/L 0,5 što odgovara 15 mm H<sub>2</sub>O do P/L 2,5 što odgovara 170 mm H<sub>2</sub>O (modificirano prema javno dostupnim slikama: <https://www.medtronic.com/us-en/healthcare-professionals/products/neurological/shunts/strata-adjustable-pressure-valve.html>).

Sophy i Polaris (Sophysa) su programabilne valvule koje imaju osam ili pet mogućih pozicija (1-5) koje odgovoraju tlakovima od 30, 70, 110, 150 i 200 mm H<sub>2</sub>O, a mogu se koristiti zajedno sa Siphonx uređajem koji sprječava pretjeranu drenažu. Miethke proGAV programabilni sustav (Aesculap) se sastoji od dvije komponente povezane serijski, a to su programabilna valvula koja se može namjestiti na vrijednosti između 0 - 20 cm H<sub>2</sub>O te gravitacijska jedinica koja može imati vrijednost otvaranja od 10 - 35 cm H<sub>2</sub>O. U vertikalnom položaju, pravi tlak otvaranja je zbroj oba tlaka otvaranja, dok je u supinacijskom položaju aktivan samo tlak otvaranja programabilne valvule.

Kao što smo ranije naveli mogućnosti trajne drenaže cerebrospinalne tekućine u bolesnika s normotenzivnim hidrocefalusom su višestruke, a uključuju ventrikuloperitonealnu drenažu, lumboperitonealnu drenažu te rjeđe ventrikuloatrijsku drenažu. Meta-analize i sistemski pregledi objavljenih studija do 2019. koji uspoređuju učinkovitost drenaža te komplikacije za svaki od navedenih postupaka pokazali su da dolazi do kliničkog poboljšanja u više od 75% bolesnika neovisno o tipu trajne drenaže koja je korištena (78). U većine pacijenata (~90%) je korišten sustav programabilne valvule i to u ovim postocima: 25% Codman Hakim, 15% Miethke proGAV i < 10% Strata (78). Antisifon ili antigravitacijski uređaj je korišten u 35% pacijenata.

Određivanje inicijalnog tlaka otvaranja, kako kod VP tako i LP drenaže je individualno. Inicijalni tlak otvaranja u SINPHONI 2 studiji je određen tablično (Tablica 1.1.) iz tjelesne visine i težine pacijenta (76), a ukoliko je bilo potrebno, valvularni tlak otvaranja je korigiran za 1 - 3 cm H<sub>2</sub>O na kontrolnim pregledima (79). Druge pak studije određuju fiksni tlak otvaranja koji se potom može korigirati ukoliko je potrebno, npr. Strata programabilna valvula na P/L 1,5 (80 mm H<sub>2</sub>O) (80).



**Tablica 1.1.** Referentna tablica iz SINPHONI 2 studije za određivanje inicijalnog tlaka otvaranja programabilne valvule prema visini i težini bolesnika s normotenzivnim hidrocefalusom zasebno za žene i muškarce (modificirano prema referenci broj 79).

<b>Žene</b>																
<b>Visina(cm)</b>	<b>Težina(kg)</b>															
	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>70</b>	<b>75</b>	<b>80</b>	<b>85</b>	<b>90</b>	<b>95</b>	<b>100</b>	<b>105</b>	<b>110</b>
<b>140</b>	16	12	9	6	3											
<b>145</b>	19	16	13	10	7	4										
<b>150</b>		19	16	13	10	7	4									
<b>155</b>			20	17	14	12	9	6	3							
<b>160</b>					18	16	13	11	8	5	3					
<b>165</b>						18	16	14	12	10	8	5				
<b>170</b>							20	18	15	13	11	9	6	4		
<b>175</b>								20	18	16	14	12	10	8	5	
<b>180</b>										20	18	16	14	12	10	8
<b>Maksimalni tlak otvaranja programabilne valvule (20 cm H<sub>2</sub>O)</b>																
<b>Minimalni tlak otvaranja programabilne valvule 3 cm H<sub>2</sub>O)</b>																
<b>Muškarci</b>																
<b>Visina(cm)</b>	<b>Težina(kg)</b>															
	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>70</b>	<b>75</b>	<b>80</b>	<b>85</b>	<b>90</b>	<b>95</b>	<b>100</b>	<b>105</b>	<b>110</b>
<b>145</b>		18	15	12	9	6	3									
<b>150</b>			18	15	12	9	6	4								
<b>155</b>				19	16	14	11	8	5	3						
<b>160</b>					19	17	14	12	9	6	4					
<b>165</b>						20	18	16	14	11	8	6	4			
<b>170</b>								19	16	14	12	10	7	5		
<b>175</b>									20	18	16	14	12	10	7	5
<b>180</b>											19	17	15	13	11	9
<b>185</b>													19	18	16	15
<b>Maksimalni tlak otvaranja programabilne valvule (20 cm H<sub>2</sub>O)</b>																
<b>Minimalni tlak otvaranja programabilne valvule (3 cm H<sub>2</sub>O)</b>																

Iako su prijašnje studije ukazivale da je korištenje antisifona, odnosno antigravitacijskih uređaja u bolesnika kojima je inicijalno postavljen tlak otvaranja na niže vrijednosti, dovelo do smanjenja incidencije subduralnih efuzija i hematoma (76,81,82), usporedbom SINPHONI (programabilne valvule) i SINPHONI 2 (valvule s antigravitacijskim uređajima) studija u Japanu nije nađena razlika u učestalosti subduralnih efuzija te hematoma (76). Meta-analiza nije pokazala statistički značajnu razliku u poboljšanju simptoma, subduralnim efuzijama ili revizijama između grupe sa i bez antigravitacijskih uređaja (78).

## 1.6. Biomarkeri u cerebrospinalnoj tekućini

Biomarker je definiran kao „stanična, biokemijska ili molekularna promjena u stanicama, tkivima ili tekućinama koja se može mjeriti, a ukazuje na normalne biološke procese, patološke procese ili pokazuje farmakološki odgovor na terapijske intervencije,, (83). Općenito, biomarker se može definirati kao pokazatelj specifične bolesti ili drugog patofiziološkog stanja u organizmu. Idealni biomarker mora biti visokospecifičan, mora precizno procijeniti tijek bolesti, te reflektirati odgovor na liječenje.

Cerebrospinalna tekućina je u direktnom doticaju s izvanstaničnim prostorom te se stoga smatra kao dobar izvor potencijalnih biomarkera koji odražavaju biokemijske promjene koje se događaju u mozgu kod neurodegenerativnih bolesti. Alzheimerova demencija (AD) je najrasprostranjenija neurodegenerativna bolest današnjice, koja zahvaća oko 27 milijuna ljudi, obuhvaća 60% svih demencija (84,85), te je stoga najčešća diferencijalna dijagnoza idiopatskog normotenzivnog hidrocefalusa (86-89). Patološke analize su pokazale da se u čak 75% slučajeva mogu istovremeno pronaći karakteristike Alzheimerove demencije i idiopatskog normotenzivnog hidrocefalusa (90-94). Brojni se biomarkeri određuju ukoliko se sumnja na AD, no za tri biomarkera se smatra da imaju najbolji dijagnostički potencijal, a to su amiloid beta 42(A $\beta$ 42), ukupni tau (t-tau), te fosforilirani tau protein (p-tau). Dokazano je da je biomarkerski profil AD povišena koncentracija ukupnog i fosforiliranog tau proteina, te snižena koncentracija amiloidnog peptida (95,96).

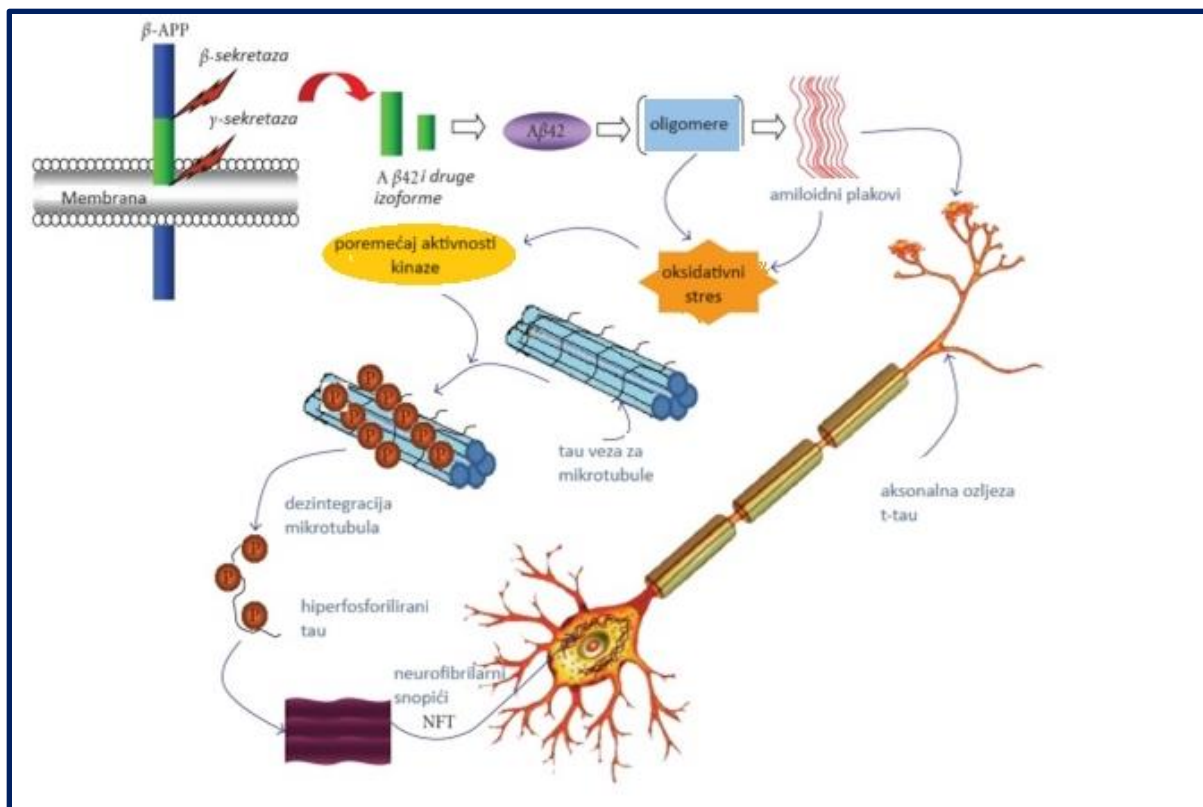
### 1.6.1. Amiloid beta

Amiloid beta nastaje proteolitičkim fragmentiranjem amiloidnog prekursorškog proteina (APP). Djelovanjem proteolitičkih enzima, najprije beta sekretaze, a potom i gama sekretaze nastaju amiloidni peptidi različitih veličina A $\beta$  (38–43), no najznačajniji su A $\beta$  1-42 te A $\beta$  1-40 (94). Izoforma amiloida (A $\beta$  1-42) je izrazito hidrofobna te formira oligomere i fibrile koji se akumuliraju u izvanstaničnim plakovima koji su karakteristični za AD (96) (Slika 1.9.). Obzirom na akumulaciju amiloida beta (A $\beta$  1-42) u plakovima, njegova koncentracija u cerebrospinalnoj tekućini je niža u oboljelih, u odnosu na zdravu populaciju (97-102). Koncentracija izoforme amiloida (A $\beta$  1-40) je nepromijenjena u pacijenata s Alzheimerovom demencijom (103). Koncentracija amiloida beta u pacijenata s idiopatskim

normotenzivnim hidrocefalusom je niža u odnosu na zdravu populaciju no ipak su vrijednosti više u komparaciji s pacijentima s AD (104).

### **1.6.2. Tau proteini**

Tau protein je unutarstanični protein koji omogućuje stabilnost mikrotubula u neuronima, a njegova funkcija je regulirana posttranslacijskim modifikacijama uključujući fosforilaciju na serinskim i treoninskim mjestima. Nekoliko studija je predložilo kao mogući patofiziološki mehanizam u kaskadi nastanka AD-a, hiperfosforilaciju te nastanak neurofibrilarnih snopića (Slika 1.9.) (105), no značajno je da gubitak normalne funkcije tau proteina i njegovo odvajanje od mikrotubula dovodi do povećane fleksibilnosti citoskeleta i gubitka funkcije aksona (106). Smatra se da zbog toga dolazi do otpuštanja tau proteina u cerebrospinalnu tekućinu te povišene vrijednosti ukupnog i fosforiliranog tau proteina govore u prilog neurodegeneraciji. Koncentracija ukupnog tau proteina u CST-u je povišena u pacijenta s Alzheimerovom demencijom, kao i u vaskularnoj demenciji, te frontotemporalnoj demenciji (107). Povišena koncentracija fosforiliranog tau proteina, odnosno njegovih epitopa [(Thr181 + Thr231), (Thr231 + Ser235), Ser199, Thr231, (Ser396 + Ser404) i Thr181] dokazana je u pacijenata s Alzheimerovom demencijom (108-110). Početkom tisućljeća Kudo i sur. su pokazali kako je u bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom značajno viša koncentracija ukupnog tau proteina u cerebrospinalnoj tekućini u usporedbi s zdravom populacijom (111), dok su Miyajima i sur. pokazali da je u bolesnika s iNPH-om viša koncentracija ukupnog tau-proteina, p-tau proteina, APP-a te njegovih fragmenta u CST-u u odnosu na zdravu populaciju te niža koncentracija istih u odnosu na bolesnike s AD-om (112).



**Slika 1.9.** Patofiziološka kaskada potencijalnih biomarkera u AD. Proteolitičkim djelovanjem sekretaza na amiloidni prekursori protein (APP) nastaju peptidi  $A\beta_{42}$  i drugi kraći fragmenti ( $A\beta_{40}$ ). Agregacijom  $A\beta_{42}$  nastaju oligomere te amiloidni fibrili koji se odlažu u senilne plakove. Toksičnost navedenih formacija može dovesti do lančane reakcije nastanka tau-hiperfosforilacije, koja je inače povezana s mikrotubulima i omogućava njihovu stabilnost. Zbog hiperfosforilacije, tau protein disocira od mikrotubula i agregira u neurofibrilarne snopiće (NFT), koji mogu uzrokovati povećanu fleksibilnost citoskeleta i neuronalnu smrt (modificirano prema referenci 113).

### 1.6.3. Ostali biomarkeri u pacijenata s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom

Neurofilament lakog lanca (NFL) je povezan s aksonalnom ozljedom ili degeneracijom i povišen je u brojnim neurološkim bolestima, pa tako i u bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom (114-118). Interleukini- IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-10, TGF- $\beta$ 1 i TGF $\beta$ -tip II receptor (TR-II) kao upalni pokazatelji su isto tako povišeni u bolesnika s iNPH-om u odnosu na zdravu populaciju. Mijelinski bazični protein koji je kako samo ime kaže sastavnica mijelinske ovojnice, pokazatelj je supkortikalnog oštećenja te je nađeno da je povišen u bolesnika s iNPH-om (115,116,119).

## 1.7. Volumetrija cerebrospinalne tekućine

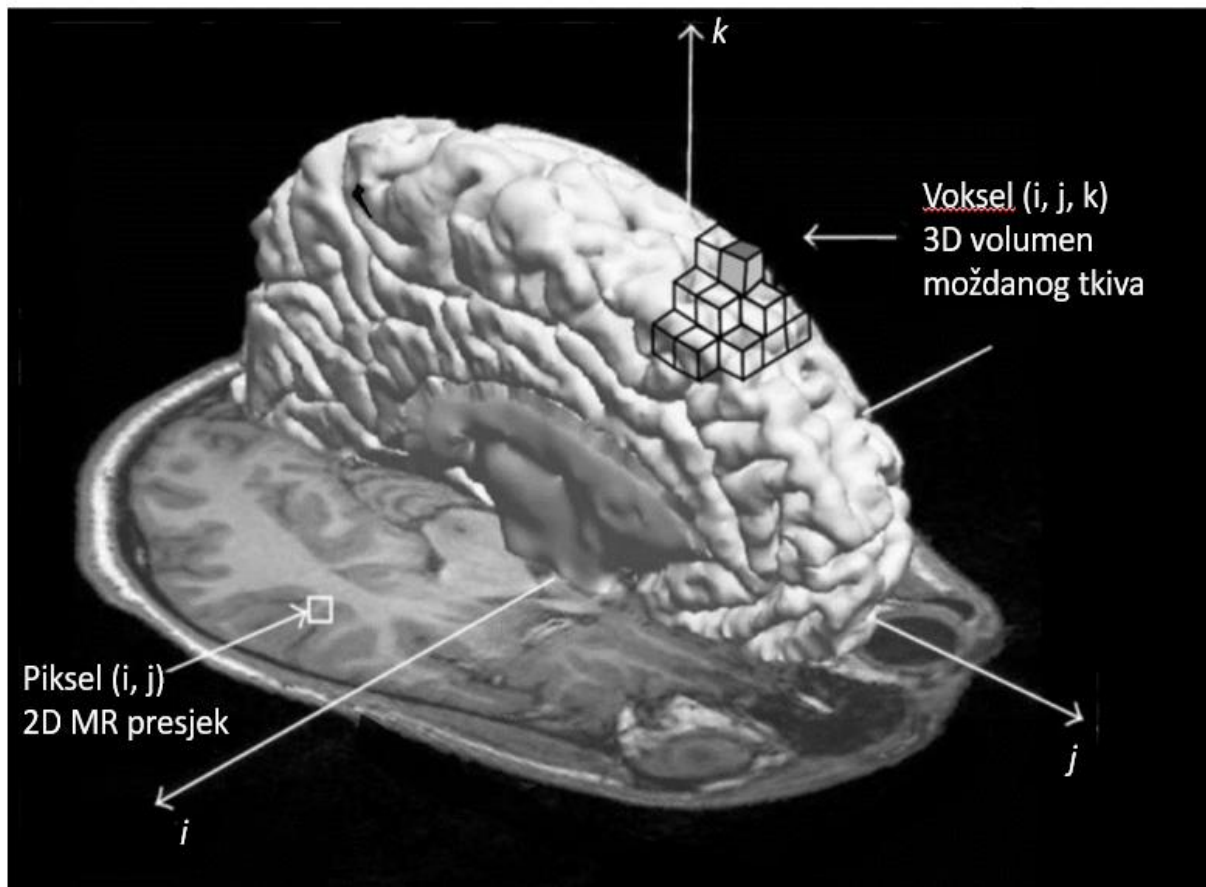
Prve opsolentne metode indirektnog mjerenja volumena cerebrospinalne tekućine bile su pneumoencefalografija te pneumomijelografija, gdje bi se prilikom punkcije (cisterne magne zatiljno ili lumbalne regije) ispuštala CST te upuhivao zrak koji je potom ispunjavao likvorski sustav i bio vidljiv na Rtg slici. Razdoblje moderne radiologije započinje 1973. kad je instaliran prvi uređaj za kompjuteriziranu tomografiju (CT) za kliničku upotrebu, koji je prvi put omogućio direktnu vizualizaciju intrakranijskog prostora, sustava moždanih komora te spinalnog prostora. Obzirom da su sve dosad navedene metode koristile štetno ionizirajuće zračenje, bilo je potrebno razviti metodu koja je sigurna i koja će omogućiti preciznije prikazivanje struktura SŽS-a, uključujući cerebrospinalnu tekućinu. Godine 1978. je dobivena prva MR snimka mozga u EMI Laboratories, pod vodstvom Ian Robert Younga i Hugh Clowa. Razvojem novih MR sekvenci, koje imaju mogućnost diferencijacije sive i bijele tvari, te cerebrospinalne tekućine na submilimetarskoj razini, omogućena je precizna volumetrijska analiza struktura (120). Uporabom raznih računalnih programa moguće je iz slikovnih MR prikaza učiniti kvantifikaciju volumena pojedinih struktura od interesa što omogućuje stvaranje normativnih podataka i olakšava usporedbu rezultata.

### 1.7.1. Segmentacija

MR slika je definirana konačnim skupom elemenata koji se nazivaju pikseli u dvodimenzionalnom ili vokseli u trodimenzionalnom prostoru, a svaki element slike je jednoznačno određen vrijednošću intenziteta i koordinatama (i, j) za piksele, te (i, j, k) za voksele (Slika 1.10.)(121). Svakom elementu slike je dodijeljena vrijednost bazirana na prosječnim MR karakteristikama prisutnim u tkivima (120).

Ukoliko su podaci definirani trodimenzionalno, segmentira se „sloj po sloj“, što kasnije zahtjeva spajanje segmentiranih 2D slojeva u 3D volumetrijsku sliku, što može dovesti do nepravilnosti. Segmentacija slike je prvi i najvažniji korak prije klasifikacije MR podataka koji dijele iste karakteristike što omogućuje identifikaciju različitih anatomskih struktura SŽS-a (120). Segmentacija je puno kompleksniji postupak zbog šuma koji nastaje uslijed preklapanja spektra intenziteta različitih tipova tkiva i tzv. parcijalnog volumnog učinka. Manualna analiza

tih kompleksnih skupova MR podataka zahtjeva puno vremena i podložna je greškama, te se stoga razvijaju računalni programi koji su brži i ne ovise o ljudskom faktoru.



*Slika 1.10. Ilustracija elemenata slike MR-a mozga. Piksel (i, j) je prikazan kvadratom u 2D MR presjeku, dok je voksel (i, j, k) prikazan kockom u 3D prostoru; (modificirano prema referenci broj 121)*

### 1.7.1.1. Manualna/ poluautomatska segmentacija

Manualna segmentacija je godinama bila metoda izbora za preciznu analizu struktura središnjeg živčanog sustava, no zbog dugotrajnosti te potrebne preciznosti zahtjevana je i nije postigla svoj puni potencijal. Program nazvan ITK-SNAP ima mogućnost manualne i poluautomatske segmentacije. Manualna segmentacija znači dodijeliti oznaku (kodiranu bojom/nazivom) svakom vokselu unutar analizirane strukture, a koristi se za ručno konturiranje sloj po sloj ili pak korekciju rezultata automatske segmentacije. U poluautomatskom modu, koristi se prethodno postavljeni algoritam za segmentaciju trodimenzionalnih anatomskih struktura, uz potrebnu korekciju postavljanjem praga (engl. „treshhold“) za analiziranu

trodimenzionalnu strukturu, u ovom slučaju cerebrospinalnu tekućinu u spinalnom segmentu uz potrebne korekcije postsegmentacijski, za koje se koristi manualna segmentacija (122).

### **1.7.1.2. Automatska segmentacija**

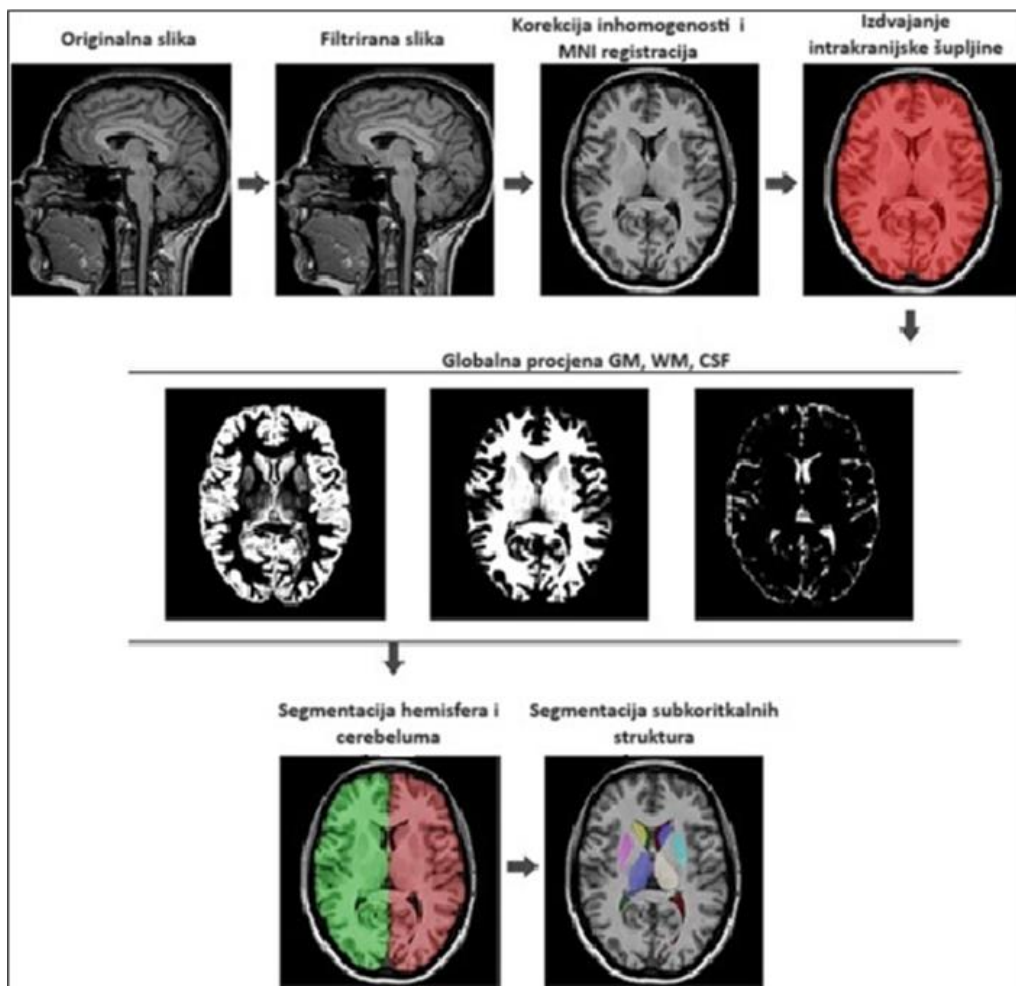
Automatska segmentacija ima ogroman potencijal kvantifikacijske analize, kako u dijagnostici tako i u praćenju brojnih neuroloških stanja. Razvoj automatske segmentacije mozga se odvijao u nekoliko etapa, najprije odvajanje moždanog tkiva od ostalih tkiva glave, takozvanog uklanjanja lubanje (engl. skull stripping) odnosno izdvajanje intrakranijske šupljine (engl. intracranial cavity extraction – ICC). Potom je slijedila segmentacija mozga na tzv. temeljne segmente- bijela tvar (WM), siva tvar (GM) i cerebrospinalna tekućina (CSF), no javila se potreba i za segmentacijom supkortikalnih struktura, kao što su bazalni gangliji i sl. (Slika 1.11.).

Brojni softveri za automatsku segmentaciju su razvijeni posljednjih godina, a u ovom istraživanju je korištena internetska platforma volBrain koja koristi zbirku manualno označenih predložaka koja je konstruirana iz javno dostupnih MR baza podataka koristeći izvorni format, a obuhvaća mozgove svih dobnih skupina te različitih intrakranijskih patologija. Platforma volBrain obuhvaća skup postupaka za procesiranje slike, koji uključuju poboljšanje kvalitete slike postavljenjem iste u specifični geometrijski prostor, te uspoređivanjem intenziteta s manualno označenim predlošcima što kasnije omogućava segmentiranje različitih intrakranijskih struktura, a postupci su:

1. uklanjanje šuma (eng. denoising) - koristeći filter za poboljšanje kvalitete slike;
2. gruba korekcija nehomogenosti;
3. registracija prostora- zbirka predložaka i subjekt koji se segmentira moraju biti u istom stereotaksijskom prostoru. Prostorna normalizacija temeljena na očuvanju paralelnih odnosa s Montreal Neurological Institute (MNI152) prostorom provedena je uz pomoć softvera ANTS, a rezultirajuće slike u MNI prostoru imaju veličinu od  $181 \times 217 \times 181$  vokseli s rezolucijom vokseli od  $1 \text{ mm}^3$ ;
4. fina korekcija nehomogenosti;
5. normalizacija intenziteta - metoda se temelji na procjeni sličnosti slike korištenjem intenziteta bijele tvari (WM), sive tvari (GM) i cerebrospinalne tekućine (CSF), a linearnim mapiranjem je određeno da WM ima prosječni intenzitet od 250, GM od 150, a CSF od 50;

6. ne-lokalno izdvajanje intrakranijske šupljine – Non-local Intracranial Cavity Extraction (NICE);
7. klasifikacija tkiva;
8. ne-lokalna segmentacija hemisfera (NABS);
9. ne-lokalna segmentacija supkortikalnih struktura.

Koraci 1-5 označavaju pretprocesiranje slika za obradu postavljanjem u isti geometrijski i intenzitetni prostor sa zbirkom predložaka, dok se koraci 6-9 usredotočuju na procjenu različitih volumena mozga na različitim razinama, od hemisfera do supkortikalnih regija.



**Slika 1.11.** VolBrain platforma. U prvom redu je prikazano pretprocesiranje nove slike, što obuhvaća filter uklanjanja šuma, korekcije nehomogenosti, registracije MNI prostora, normalizacije intenziteta te ekstrakcije sadržaja intrakranijske šupljine. U drugom redu su prikazani rezultati globalne procjene intrakranijskog tkiva (GM, WM, CSF). U trećem redu su prikazani rezultati segmentacije makrostrukture (hemisfera te cerebeluma) te supkortikalnih struktura (modificirano prema: <https://www.volbrain.net/services/volBrain>)



## **2. HIPOTEZA**

U bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom dolazi do značajnog kliničkog poboljšanja nakon lumbalne drenaže i evakuacije cerebrospinalne tekućine, dominantno promjenom spinalnog volumena cerebrospinalne tekućine, što značajno utječe na intrakranijski tlak.

### **3. CILJEVI RADA**

#### **3.1. OPĆI CILJ:**

Ispitati utjecaj evakuacije cerebrospinalne tekućine putem lumbalne drenaže u bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom na promjenu volumena likvorskih prostora neuroaksisa te posljedični učinak na kliničko stanje.

#### **3.2. SPECIFIČNI CILJEVI:**

1. Ispitati utječu li na kliničko stanje bolesnika s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom promjene volumena likvorskih prostora u kranijском i spinalnom odjeljku nakon 72-satne evakuacije cerebrospinalne tekućine.
2. Ispitati utječe li promjena lumbalnog / intrakranijskog tlaka mjenog u jednosatnim intervalima tijekom 72 h na poboljšanje kliničkog statusa.
3. Ispitati utjecaj promjene volumena na lumbalni/ intrakranijski tlak.
4. Ispitati jesu li i kako kvantitativne promjene biomarkera iz CST-a, uzorkovane prilikom postavljanja vanjske lumbalne drenaže te nakon 36 h i 72 h, povezane s promjenama kliničkog statusa bolesnika.

## 4. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno u Klinici za neurokirurgiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb u razdoblju od veljače 2018. do travnja 2023. godine. Svrha istraživanja je razjašnjena svim ispitanicima na njima jasan i razumljiv način, usmenim putem te pisanim informiranim pristankom, a dobiveni podaci su anonimizirani dodjeljivanjem brojevanih kodova prilikom unošenja u bazu podataka. Uključivanje u istraživanje je bilo dobrovoljno, a ukoliko je ispitanik bio nesposoban donositi odluke, pristanak za sve dijagnostičke i terapijske postupke je potpisao njegov skrbnik. Obzirom da je incidencija normotenzivnog hidrocefalusa niska i da prema različitim istraživanjima iznosi između 2-20 bolesnika na milijun stanovnika godišnje, nije rađena „power“ analiza već je kao realan broj ispitanika za ovo istraživanje određen broj od 20 bolesnika koji bi se u razdoblju od 4 godine mogli liječiti u KBC-u Zagreb. Istraživanje ima potvrdnu Odluku Senata Sveučilišta u Zagrebu o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija Biomedicina i zdravstvo od 22. siječnja 2019. godine (Klasa: 602-04/19-04/03; Ur.broj: 380-020/173-19-1), odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb od 02. studenog 2017. godine (Klasa:8.1-17/202-2; broj: 02/21 AG), kao i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od 24. listopada 2018. (Klasa: 641-01/23-02/01; Ur. Broj: 251-59-10106-23-111/213).

### 4.1. Ispitanici

U istraživanje su uključeni bolesnici kod kojih postoje klinički simptomi koji upućuju na normotenzivni hidrocefalus kao što su kognitivne smetnje, smetnje hoda i urinarna inkontinencija. Kako bi se kognitivne smetnje kvantificirale, korišten je Mini-Mental State Examination (MMSE), odnosno mini-mental test, dok je za kvantifikaciju drugih simptoma korišten Japanese NPH scale (JNPHS), odnosno Japanska NPH ljestvica.

MMSE odnosno Folsteinov test uveden je u kliničku upotrebu 1975. (123), a sastoji se od upitnika s maksimalnim brojem bodova 30, koji je u kliničkoj upotrebi za utvrđivanje kognitivnih smetnji (124). Zbroj bodova manji od 24 ukazuje na kognitivnu deterioraciju.

Japanska NPH ljestvica se koristi za određivanje težine kliničke slike, te svakom od mogućih simptoma trijasa (smetnje hoda, demencija i urinarna inkontinencija) pridružuje vrijednost od 0-4 ovisno o prisutnosti i težini navedenog simptoma. Vrijednost 0 se pridružuje ukoliko nema navedenog simptoma, dok bod 4 označava najteži oblik navedenog trijasa. Maksimalni broj bodova iznosi 12 (Tablica 4.1.).

**Tablica 4.1.** Japanska NPH ljestvica se koristi za određivanje težine kliničke slike, te svakom od mogućih simptoma trijasa (smetnje hoda, demencija i urinarna inkontinencija) pridružuje vrijednost od 0-4 (modificirano prema: javno dostupnoj tablici koju je 1996. izradilo Istraživačko povjerenstvo za intraktabilni hidrocefalus pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi, Japan)

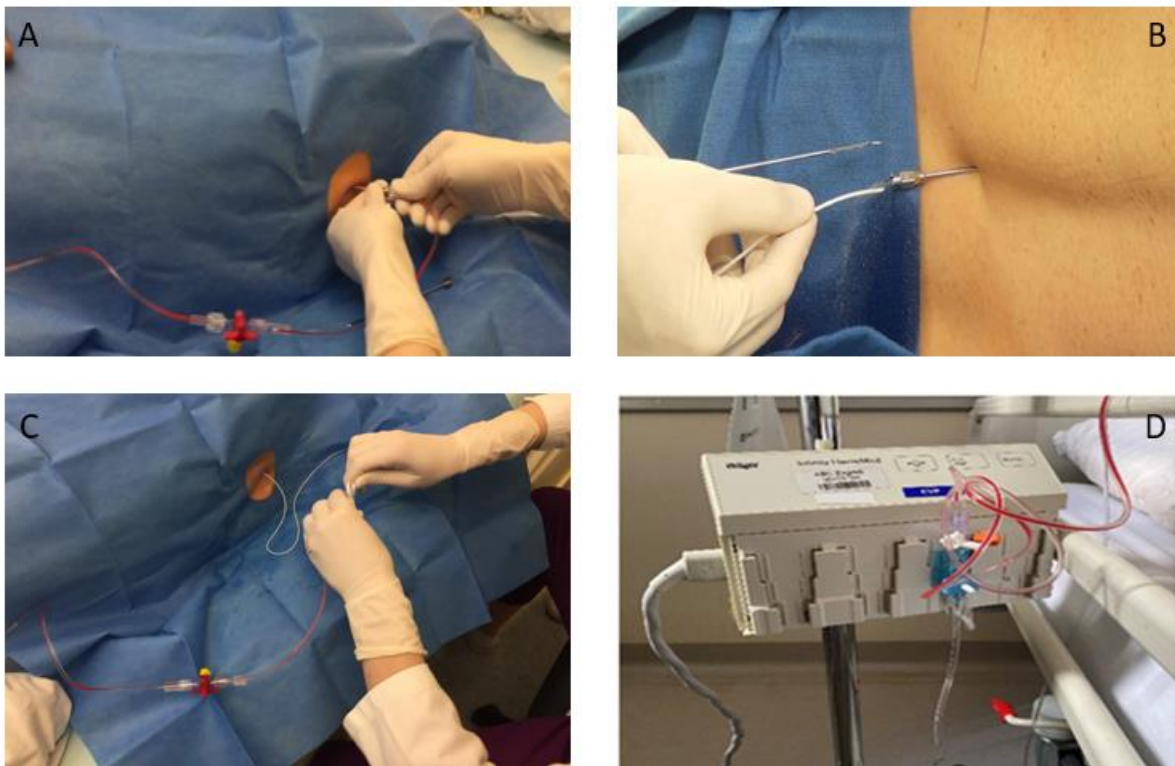
Bodovi	Smetnje hoda	Demencija	Urinarna inkontinencija
0	Normalan hod	Bez demencije	Bez urinarne inkontinencije
1	Nestabilan, ali moguć hod bez pomoći	Apatičan, bez jasne demencije	Polakisurija/urinarna urgencija
2	Hod uz pomoć štapa/štake	Socijalno ovisan, ali samostalan kod kuće	Urinarna inkontinencija noću
3	Hod uz pomoć dvije štake/ hodalice	Djelomično ovisan o drugima kod kuće	Urinarna inkontinencija tijekom dana
4	Hodanje nije moguće	U potpunosti ovisan o tuđoj pomoći	Učestala urinarna inkontinencija

Uključni kriteriji su i prisutnost neuroradioloških karakteristika normotenzivnog hidrocefalusa i to ventrikulomegalija, osobito frontalnog i temporalnog roga, Evansov indeks  $>0,3$ , izbočenje korpusa kalozuma kranijalnije, kalozalni kut  $< 90^\circ$ , znatno proširenje Silvijevih fisura, nesrazmjerno s proširenjem sulkusa konveksiteta (osobito parijetalne regije), te povišenje signala u T2 mjerenim MR sekvencama periventrikularno.

Kod pacijenata s kliničkom i radiološkom sumnjom na NPH, indicirano je standardno testiranje postavljanjem vanjske lumbalne drenaže, te dreniranje veće količine cerebrospinalne tekućine kroz razdoblje od 72 sata. Ispitanici su prije samog postavljanja lumbalne drenaže evaluirani (mini-mental test, Japanska NPH ljestvica) radi utvrđivanja težine kliničkih simptoma. Ukoliko je u bolesnika koji zadovoljavaju kriterije za testiranje prethodno učinjena operacija neuroaksisa, odnosno postoji pozitivna anamneza teže traume SŽS-a, bolesnik nije uključen u istraživanje. Svaki bolesnik je prije provođenja testiranja te postavljanja vanjske lumbalne drenaže detaljno usmeno i pismeno, putem informiranog pristanka, upoznat s procedurom, kao i s procedurom MR snimanja, prije kojeg je bilo nužno ispuniti standardni upitnik za MR snimanje koji sadrži informacije o prethodnim operacijskim zahvatima, prisutnosti metalnih tijela te eventualnim drugim zaprekama za sigurno provođenje snimanja. Ukoliko je postojala kontraindikacija za snimanje MR-a neuroaksisa, bolesnik je isključen iz daljnjeg istraživanja.

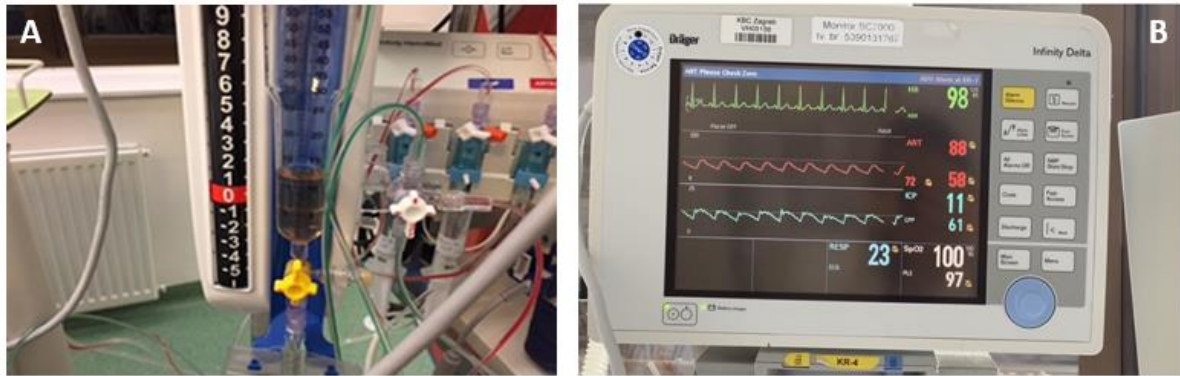
## 4.2. Postavljanje vanjske lumbalne drenaže, drenaža cerebrospinalne tekućine i mjerenje lumbalnog/ intrakranijskog tlaka

Lumbalna drenaža se postavlja u bočnom namještaju bolesnika, prilikom kojeg je glava u potpunosti horizontalno postavljena u odnosu na ostatak tijela. Razina postavljanja lumbalne vanjske drenaže je intervertebralni prostor LIV/ LV ili LV/ SI ovisno o anatomskim predispozicijama pacijenata, a određena je u odnosu na ilijačnu kristu. Nakon standardne pripreme mjesta punkcije, slijedeći mjere sterilnosti, aplicira se supkutano 5 ml lokalnog anestetika (Lidocain 2% ), a potom se Tuohy-jevom iglom, debljine 14-16 G probije stražnji longitudinalni ligament i dura, te dobije cerebrospinalna tekućina. Po uklanjanju stileta, igla se spoji s monitorom preko transduktorske cjevčice i pretvarača koji se postavi u razinu unutarnjeg slušnog hodnika (IAC) i izmjeri se prvi tlak otvaranja lumbalno (Slika 4.1.).



**Slika 4.1.** A) lumbalna punkcija u bočnom namještaju Tuohy-jevom iglom, koja se nakon uklanjanja stileta spoji preko transduktorske cjevčice i pretvarača na monitor i izmjeri se prvi tlak otvaranja lumbalno; B) kroz iglu se potom postavi lumbalni dren; C) lumbalni dren se ponovno spoji preko transduktorske cjevčice na pretvarač; D) prikaz pretvarača.

Potom se kroz iglu postavi lumbalni dren (Medtronic EDM Lumbar Drainage Kit), koji se fiksira za kožu Vicryl 2.0 šavima. Potom se preko T nastavka dren spoji ponovno s pretvaračem na monitor te na kolektor cerebrospinalne tekućine (Slika 4.2.).



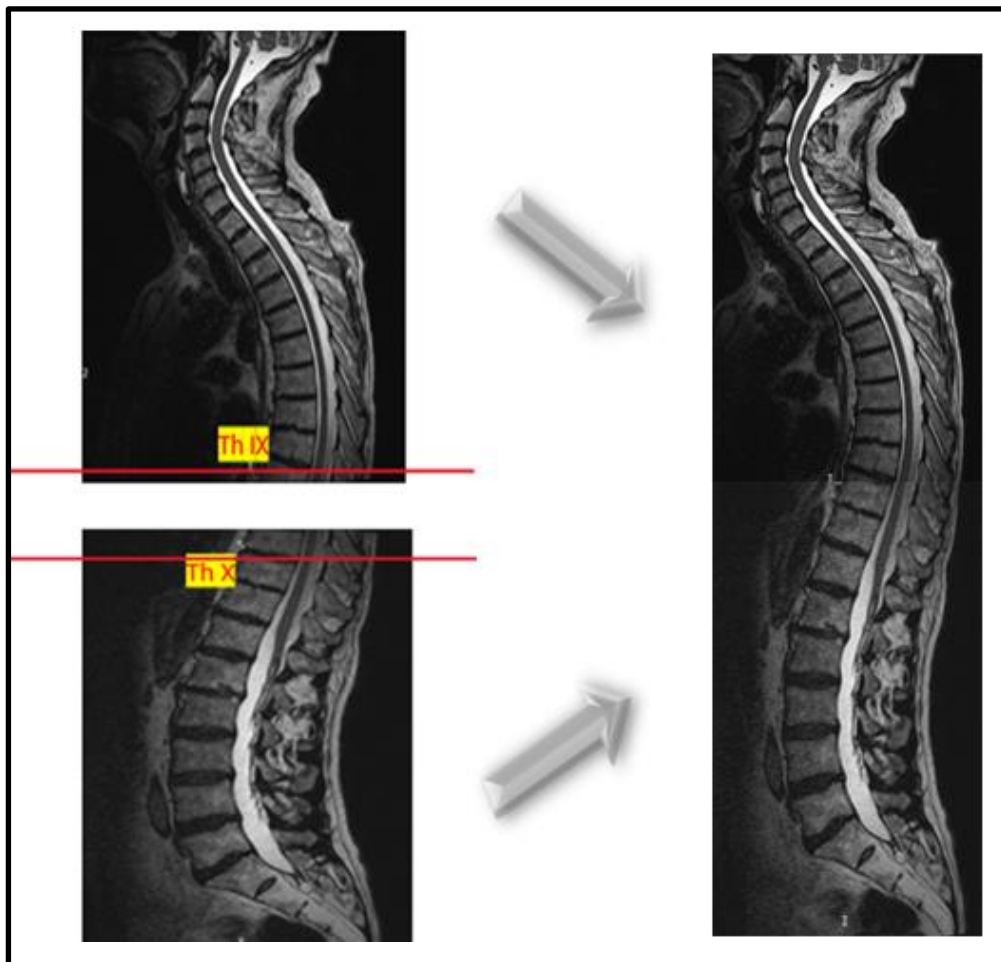
**Slika 4.2.** A) kolektor cerebrospinalne tekućine. Nužno je da pretvarač i vrijednost 0 na kolektoru budu postavljeni u razini unutarnjeg slušnog hodnika dok bolesnik leži na ravnom; B) monitor s vrijednostima intrakranijskog tlaka.

Nužno je da je tlak otvaranja unutar referentnih vrijednosti tlaka kod normotenzivnog hidrocefalusa i da iznosi  $<18$  mmHg, odnosno  $<25$  cm H<sub>2</sub>O. Kroz 72 sata se ispušta oko 200 ml cerebrospinalne tekućine dnevno kroz vanjsku lumbalnu drenažu uz satni monitoring tlaka u horizontalnom položaju, koji odgovara intrakranijskom, kad je pretvarač tlaka postavljen u razini IAC-a.

### 4.3. MR snimanje

Snimanja magnetskom rezonancom provodila su se na MR uređajima Kliničkog bolničkog centra Zagreb: Siemens Magnetom Avanto, snage magnetskog polja 1,5 T, 2012. god. (Siemens, Njemačka) i Siemens Magnetom Aera, snage magnetskog polja 1,5 T, 2019. god. (Siemens, Njemačka). MR snimanje je u svih ispitanika provedeno u ležećem položaju, korištenjem standardne visokorezolucijske sagitalne T1 sekvence za glavu (MP-RAGE- engl. Magnetization Prepared - RApid Gradient Echo ) - (veličina voksela 1x1x1 mm, SNR: 1,00, FOV: 250 mm, TR = 2000 ms; TE = 3,02 ms, vrijeme snimanja: 4,14 min), te standardne visokorezolucijske sagitalne SPACE 3D sekvence (engl. Sampling Perfection with Application optimized Contrast using different flip angle Evolution) zasebno za cervikotorakalni i

torakolumbosakralni segment kralježnice (veličina vokseli 0,5x0,5x1 mm , SNR: 1,00, FOV 260 mm, TR = 1300 ms; TE = 129 ms, duljina snimanja 4,06 min). Korištene su sekvence visoke prostorne rezolucije koje daju dobar kontrast između cerebrospinalne tekućine i okolnog tkiva SŽS-a. MR snimanje cijelog spinalnog kanala je zbog same duljine podijeljeno u dva segmenta: gornji segment koji je uključivao kraniocervikalni prijelaz, cervikalni i gornji torakalni segment kralježnice, dok je donji obuhvaćao donji torakalni i lumbosakralni segment kralježnice. Preklapajuće regije torakalno su isključene iz volumetrijskih analiza (Slika 4.3.). MR snimanje je učinjeno prije postavljanja vanjske lumbalne drenaže, te nakon 72-satne evakuacije cerebrospinalne tekućine.

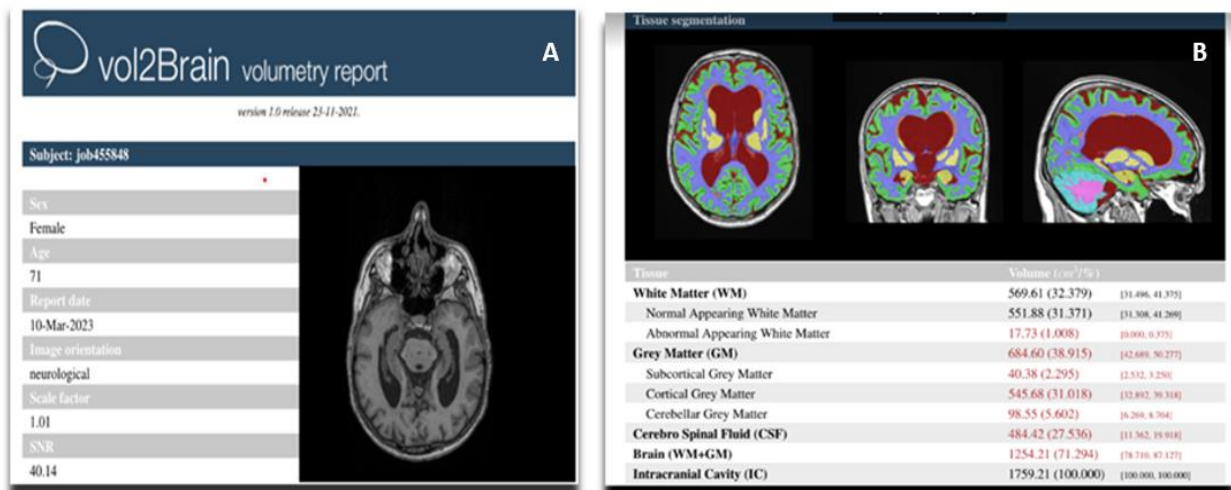


**Slika 4.3.** Na slikama lijevo MR snimke CTh i ThLS segmenta- preklapajuće regije torakalno su odvojene crvenom linijom (Th IX i Th X) i izuzmu se iz daljnje volumetrijske analize kako je prikazano na slici desno.

#### 4.4. Volumetrijska analiza

U ovom istraživanju je za volumetrijsku analizu intrakranijskog likvorskog prostora, koji uključuje CST u moždanim komorama i subarahnoidnom intrakranijskom prostoru, korištena internetska platforma volBrain verzija 1.0. (125). Za analizu su korištene visokorezolucijske MP-RAGE sagitalne sekvence, koje se najprije u DICOM formatu anonimiziraju koristeći program MicroDicom Viewer (<http://www.microdicom.com>), a potom uz pomoć programskog alata dcm2nii koji je sastavni dio besplatnog MRICRON programskog paketa (<https://www.nitrc.org/projects/mricron>) konvertiraju u NIFTI format koji se učitava u internetsku platformu. Osim slika u NIFTI formatu potrebno je u internetsku platformu volBrain učitati spol i dob pacijenta čiji se intrakranijski volumen analizira.

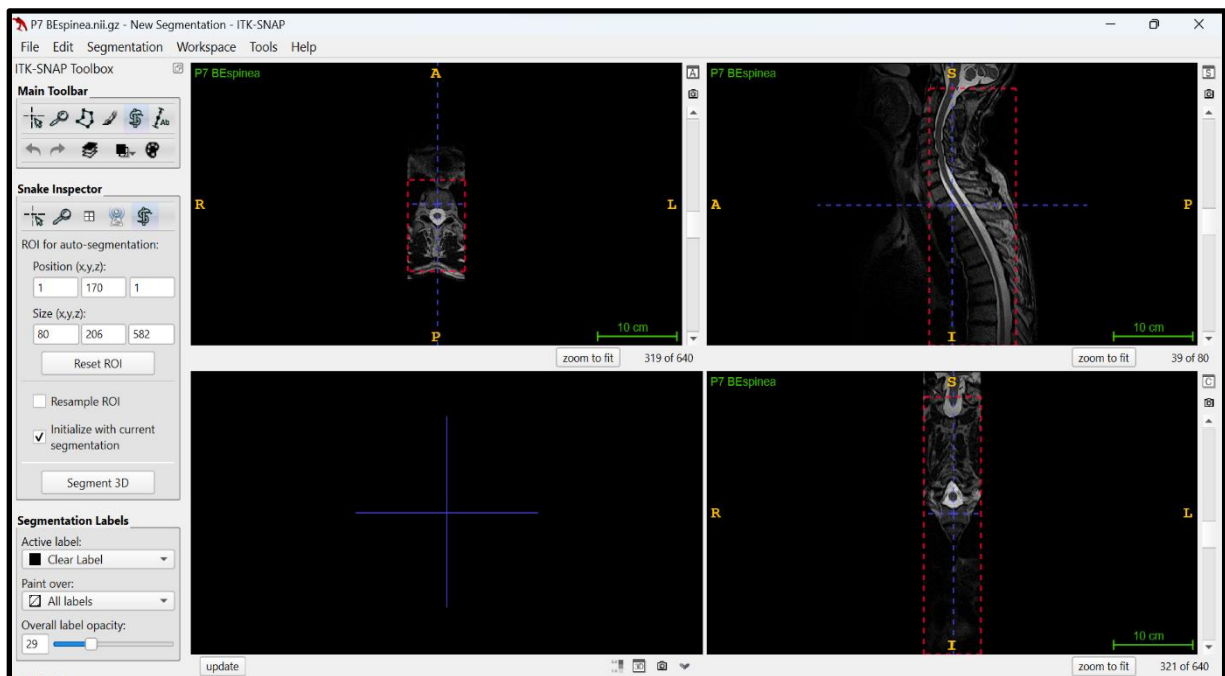
Program volBrain koristi zbirku manualno označenih predložaka T1 sekvenci MR-a. Platforma volBrain obuhvaća skup postupaka za procesiranje slike, koji uključuju poboljšanje kvalitete slike postavljenjem iste u specifični geometrijski prostor te uspoređivanjem intenziteta s manualno označenim predlošcima što kasnije omogućava segmentiranje različitih intrakranijskih struktura. Kad automatizirani proces završi, dobivaju se izvješća (csv i pdf) s volumetrijskim vrijednostima parenhima, različitih moždanih tkiva (WM, GM, CSF), supkortikalnih struktura kao i indekse asimetrije (Slika 4.4.).



**Slika 4.4.** Primjer PDF izvješća o volumetrijskim vrijednostima analiziranih tkiva. A) podaci o dobi, spolu, datumu volumetrijske obrade; B) rezultati segmentacije tkiva, volumeni u cm<sup>3</sup> za WM (bijela tvar), GM (siva tvar), CST, ukupan intrakranijski volumen.

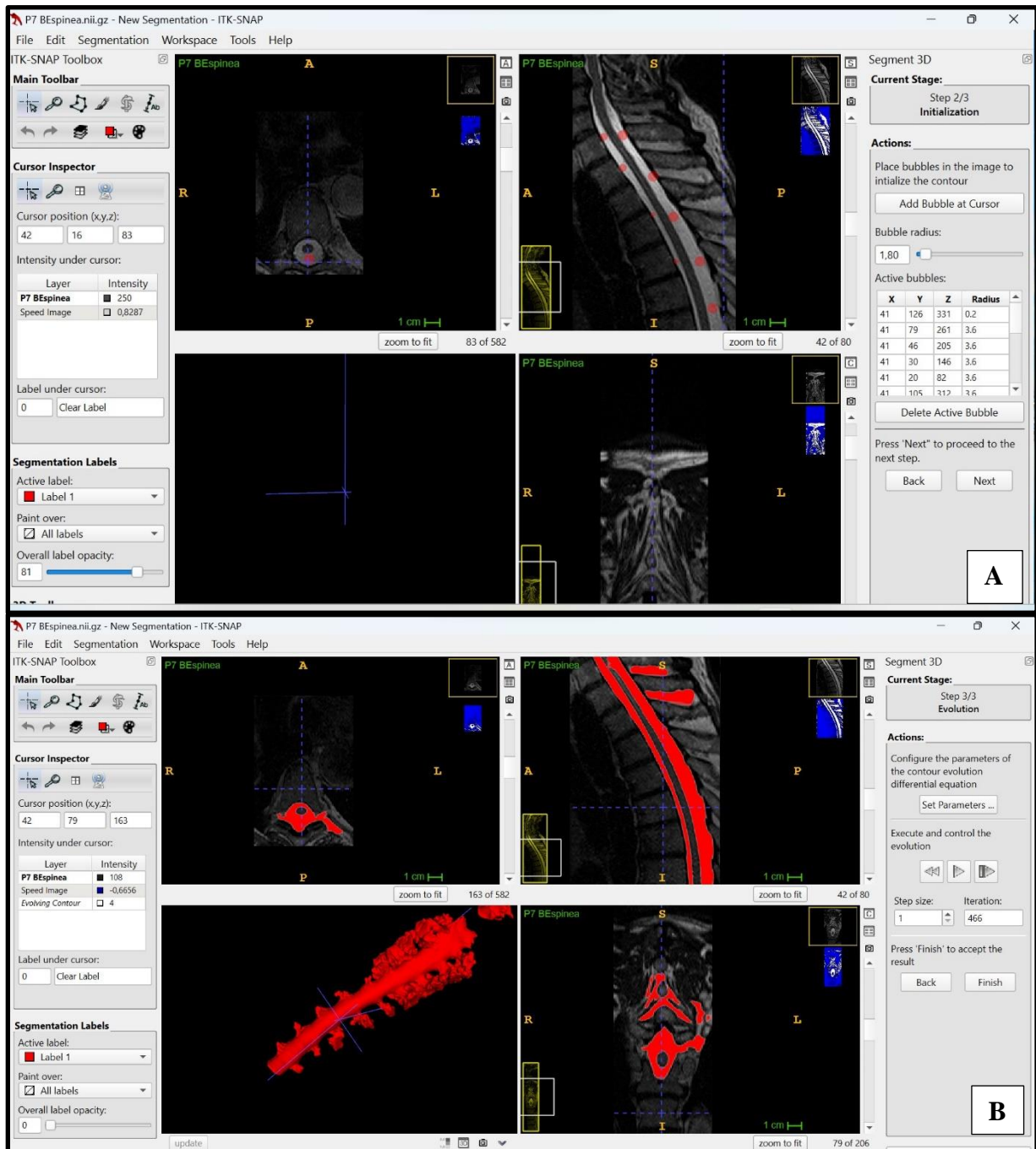


Za volumetrijsku analizu spinalnog likvorskog prostora korišten je program ITK-SNAP v4.0.0 (<http://www.itksnap.org>). Za analizu su korištene visokorezolucijske 3D SPACE sagitalne sekvence zasebno za cervikotorakalni i torakolumbosakralni segment, koje se najprije u DICOM formatu anonimiziraju koristeći program MicroDicom Viewer (<http://www.microdicom.com>), a potom uz pomoć programskog alata dcm2nii koji je sastavni dio besplatnog MRICRON programskog paketa (<https://www.nitrc.org/projects/mricron>) konvertiraju u NIFTI format koji se učitava u ITK-SNAP program. Koristeći segmentacijski mod aktivnim konturiranjem ili „zmiju“ (eng. snake) iscertava se regija interesa (engl. ROI- region of interest) za poluautomatsko segmentiranje (Slika 4.5.).



**Slika 4.5.** Prikaz ITK-SNAP programa za poluautomatsko segmentiranje - koristeći metodu aktivnog konturiranja ili „zmiju“ (eng. snake) iscertava se regija interesa (engl. ROI- region of interest), u ovom slučaju spinalni kanal- crveni iscertani pravokutnici pokazuju označenu regiju interesa (ROI).

Nakon automatskog podešavanja kontrasta snimaka u programu ITK-SNAP definira se regija interesa (engl. region of interest - ROI) te se u presegmentacijskom postupku uz mod praga (engl. threshold) učini detekcija rubova kralježničnog kanala i kralježnične moždine (Slika 4.5.).



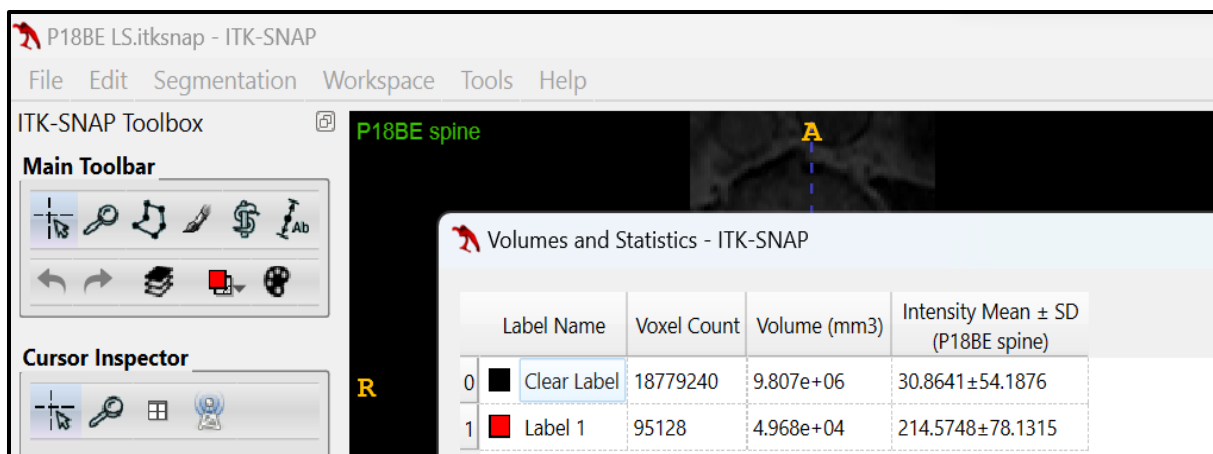
*Slika 4.6. A) postavljanje aktivnih kružića u ciljanu regiju cerebrospinalne tekućine; B) segmentacijski mod aktivnog konturiranja kojim se oboji osim ciljane regije i okolno tkivo sličnih MR karakteristika.*

Evolucijom kontura označi se poluautomatskim putem spinalni prostor koji ispunjava cerebrospinalna tekućina, no i okolno tkivo sličnih MR karakteristika (Slika 4.6.). Stoga je potrebno analizirati svaki aksijalni sloj te učiniti ručnu korekciju obojanog, nakon čega slijedi

izračun volumena (Slika 4.7., Slika 4.8.). Segmentacija se učini posebno za cervikotorakalni i torakolumbosakralni segment kralježnice imajući u vidu preklapajuće regije. U analizi podataka volumeni oba segmenta prikazani su zbirno kao jedinstveni volumen spinalne cerebrospinalne tekućine.



*Slika 4.7. Prikaz ručno korigirane segmentacije cerebrospinalne tekućine zasebno za CTh te ThLS segment uz izuzimanje preklapajućih regija.*



Slika 4.8. Volumetrijski izračun cerebrospinalne tekućine (Label 1) za jedan segment kralježnice izražen u  $\text{mm}^3$

#### 4.5. Kvantifikacija biomarkera u cerebrospinalnoj tekućini

Neposredno nakon postavljanja vanjske lumbalne drenaže uzorkovano je 1-2 mL cerebrospinalne tekućine za kvantificiranje biomarkera [ $\beta$ -amiloidni proteini ( $\text{A}\beta$ 1-42,  $\text{A}\beta$ 1-40), ukupni tau (t-tau) i fosforilirani-tau (p-tau)]. Uzorkovanje je ponovljeno nakon 36 h i 72 h. Uzorci cerebrospinalne tekućine su pohranjeni u posebnim polipropilenskim epruvetama. Nakon 10 min centrifugiranja na 2000 x g, uzorci cerebrospinalne tekućine su pohranjeni na  $-80^\circ\text{C}$  do daljnje analize.

##### 4.5.1. ELISA

Razine biomarkera u cerebrospinalnoj tekućini su određivane uz pomoć enzimski povezanog imunosorbentnog testa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA) prema protokolima proizvođača:

- $\text{A}\beta$ 1-42 (Innotest  $\beta$ -amyloid1-42, Fujirebio, Gent, Belgium);
- total tau (Innotest hTau Ag, Fujirebio, Gent, Belgium);
- p-tau<sub>181</sub> [Innotest Phospho-Tau (181P), Fujirebio, Gent, Belgium].

Mjerenja  $\text{A}\beta$  1-42, t-tau, p-tau<sub>181</sub> su provođena na pločama s 96 jažica obloženih protutijelima (indirektna metoda). Uzorci i standardi su dodani i inkubirani na pločama, nakon

čega su dodana detekcijska protutijela na isprane jažice. Za detekciju navedenih biomarkera korištena su protutijela označena biotinom u spoju sa streptavidin-HRP kompleksom.

#### **4.6. Statistička analiza**

Kontinuirane varijable zbirno su prikazane kao medijan (raspon ili interkvartilni raspon), a nominalne varijable kao apsolutna (relativna) učestalost. Medijani su uspoređivani Mann Whitney U testom. Proporcije su uspoređivane  $\chi^2$  testom. Svi testovi bili su dvostrani. Korelacije između dobi, kliničkog skora i volumena cerebrospinalne tekućine uspoređivane su Spearman-ovom korelacijom rangova. Razina statističke značajnosti postavljena je kao  $p < 0,05$ . Za statističku analizu korištena je računalna podrška Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Statistics software, inačica 25.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) i GraphPad Prism, inačica 8.4.3 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 5. REZULTATI

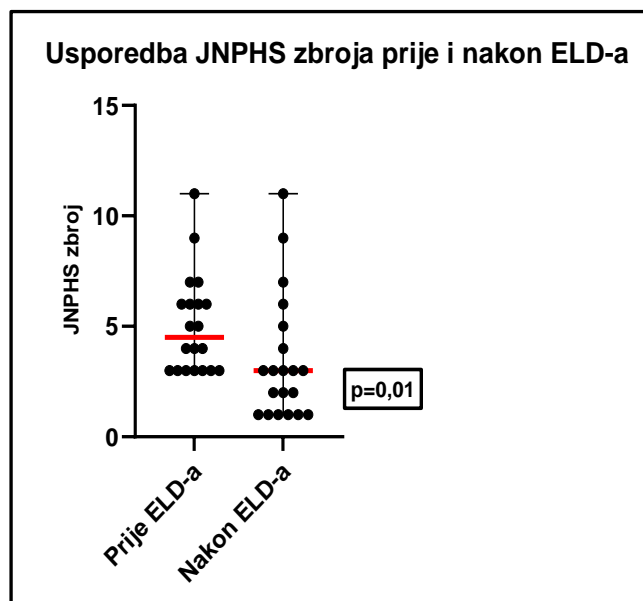
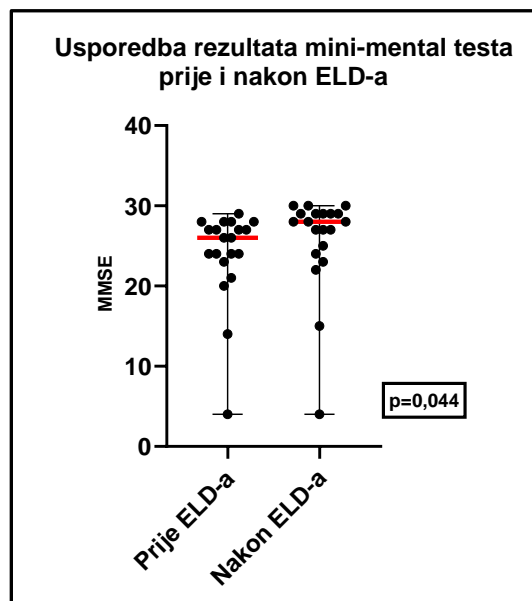
U 20 bolesnika sa sumnjom na normotenzivni hidrocefalus učinjeno je testiranje postavljanjem vanjske lumbalne drenaže te dreniranje cerebrospinalne tekućine kroz razdoblje od 72 sata. Ukoliko je postojala klinička i radiološka korelacija koja je upućivala na mogući NPH učinjeno je snimanje magnetskom rezonancom prije postavljanja testne drenaže te nakon evakuacije cerebrospinalne tekućine kroz 3 dana. Navedene MR snimke su korištene u volumetrijskoj analizi intrakranijskog i spinalnog volumena cerebrospinalne tekućine. Dodatno je još učinjena i kvantifikacija biomarkera u cerebrospinalnoj tekućini u tri vremenske točke (neposredno nakon postavljanje vanjske lumbalne drenaže, nakon 36 sati te 72 sata). Od navedenih 20 bolesnika, 10 ih je pokazalo značajno kliničko poboljšanje nakon testne drenaže što ih je uvrstilo u skupinu mogućih NPH bolesnika (engl. responders), te je kod njih 10 postavljena trajna ventrikuloperitonealna drenaža.

### 5.1. Ispitanici: sociodemografski i klinički podaci

Od 20 bolesnika koji su testirani većina je ženskog spola (60%), dok medijan godina iznosi 72,5 što je u skladu sa svjetskim rezultatima koji pokazuju da se NPH češće javlja u starijih od 65 god. Analizom rezultata mini-mental testa (MMSE) te Japanske NPH ljestvice (JNPHS) prije i nakon testiranja vanjskom lumbalnom drenažom vidimo statistički značajnu razliku. Medijani (“prije” i “nakon” testiranja) su uspoređivani Mann-Whitney U testom. Od ukupnog broja testiranih bolesnika sa sumnjom na NPH, njih 10 je imalo značajno kliničko poboljšanje koje smo kvantificirali kao razliku od 2 ili više boda u MMSE i/ili JNPHS, te je kod njih indicirano postavljanje trajne ventrikuloperitonealne drenaže. Ukupna količina drenirane cerebrospinalne tekućine tijekom tri dana je prosječno iznosila 770 ml, uz raspon od 570-982 ml (Tablica 5.1., Slika 5.1.).

**Tablica 5.1.** Pregled sociodemografskih i kliničkih podataka. Brojevi su medijan (raspon) ili apsolutna (relativna) učestalost; medijani ("prije" i "nakon" drenaže) su uspoređivani Mann-Whitney U testom; \*statistički značajna razlika; MMSE – mini-mental test (engl. Mini-mental state examination); JNPHS – Japanska NPH ljestvica (engl. Japanese Normal-Pressure Hydrocephalus Scale); CST – cerebrospinalna tekućina.

	medijan/n	raspon	P
dob (godine)	72,5	65-82	
spol (ž/m)	12/8	60/40	
MMSE prije drenaže	26	4-29	0,044*
MMSE nakon drenaže	28	4-30	
JNPHS prije drenaže	4,5	3-11	0,010*
JNPHS nakon drenaže	3	1-11	
Volumen dreniranog CST -a kroz 72 h (ml)	770	570-982	
Postavljena ventrikuloperitonealna drenaža (da/ne)	10/10	50/50	



**Slika 5.1.** Usporedbe kliničkih podataka (MMSE i JNPHS) prije i nakon produžene lumbalne drenaže cerebrospinalne tekućine (engl. ELD - external lumbar drainage). Točke pokazuju pojedinačne vrijednosti na MMSE i JNPHS ocjenskim ljestvicama. Crvene linije su medijani. Statistička razlika između grupa je prikazana u crnom okviru kod obje ocjenske ljestvice.

## 5.2. Promjene volumena cerebrospinalne tekućine prije i nakon vanjske lumbalne drenaže

Analizirani su rezultati volumetrijske analize cerebrospinalne tekućine zasebno za intrakranijski i spinalni segment. Intrakranijski dio je dodatno podijeljen na moždane komore, te subarahnoidni prostor (Tablica 5.2.).

**Tablica 5.2.** Volumeni cerebrospinalne tekućine (ml) intrakranijskog prostora prije postavljanja vanjske lumbalne drenaže te nakon ispuštanja cerebrospinalne tekućine na vanjsku lumbalnu drenažu. Zasebno su prikazani volumeni cerebrospinalne tekućine (CST) u moždanim komorama, intrakranijskom subarahnoidnom prostor te ukupni intrakranijski volumen CST-a. Žutom bojom su označeni bolesnici koji su imali pozitivan klinički odgovor na drenažu CST-a.

Bolesnik redni broj	Volumen CST-a u kraniju prije drenaže (ml)	Volumen CST-a u kraniju nakon drenaže (ml)	Volumen CST-a u moždanim komorama prije drenaže (ml)	Volumen CST-a u moždanim komorama nakon drenaže (ml)	Volumen CST-a u intrakranijskom subarahnoidnom prostoru prije drenaže (ml)	Volumen CST-a u intrakranijskom subarahnoidnom prostoru nakon drenaže (ml)
1.	/	/	/	/	/	/
2.	265,2	/	79,5	/	185,7	/
3.	405,3	357,1	237,8	221,3	167,5	135,8
4.	316,6	328,1	142,8	131,6	173,8	196,5
5.	343,4	221,8	130,8	111,5	212,6	110,3
6.	/	/	/	/	/	/
7.	357,5	367,9	233,3	232,6	124,2	135,3
8.	274,7	289,9	151,6	144,4	123,0	145,5
9.	439,5	441,3	258,4	256,2	181,1	185
10.	360,6	351,1	216,8	208,4	143,9	142,7
11.	317,6	359,6	146,2	148,6	171,4	211
12.	484,4	470,4	241,7	237,6	242,7	232,8
13.	317,9	313,3	166,4	151,3	151,5	162
14.	363,8	386,6	221,4	215,3	142,4	171,3
15.	/	/	/	/	/	/
16.	262,7	281,9	132,2	123,5	130,5	158,4
17.	522,5	512,2	286,3	287,9	236,1	224,3
18.	463,9	/	212,1	/	251,8	/
19.	324,1	303,7	116,6	109,7	207,5	194
20.	410,9	277,1	77,7	78,3	333,1	198,8

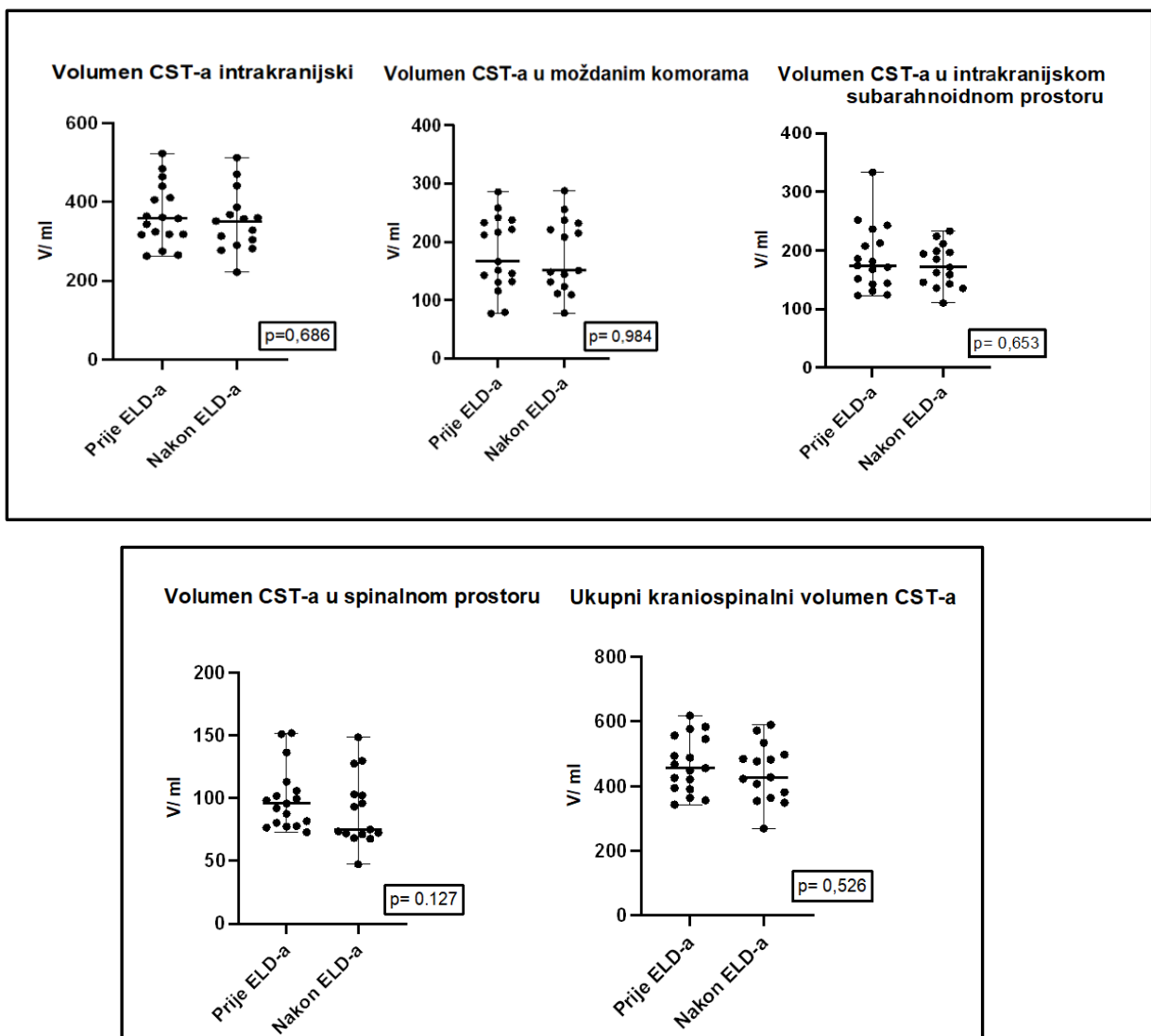


Kod troje bolesnika nije učinjena volumetrijska analiza, dok je kod još dvoje učinjena volumetrijska analiza samo prije testiranja vanjskom lumbalnom drenažom. Od spomenutih petero bolesnika troje je bilo izrazito nemirno tijekom MR snimanja te stoga učinjene snimke nisu mogle biti iskorištene za daljnju volumetrijsku analizu (bolesnici redni br. 1,6,18), dok je jedan pacijent bio klaustrofobičan prilikom ulaska u MR uređaj tako da snimanje nije niti pokušano (bolesnik redni br. 15). U posljednjeg bolesnika iz te skupine zbog bolova u leđima nakon testne drenaže ležanje je bilo izrazito bolno, te se stoga odustalo od kontrolnog MR snimanja (bolesnik redni br. 2). Prilikom usporedbe medijana volumetrijskih vrijednosti za ukupan broj bolesnika korišten je Mann-Whitney U test (Tablica 5.3.), dok je za usporedbe sociodemografskih, kliničkih i volumetrijskih podataka s obzirom na ishod testa (pozitivan test - kliničko poboljšanje nakon testne drenaže), korišten Mann-Whitney U test, a proporcije su uspoređivane hi-kvadrat testom (Tablica 5.4.).

**Tablica 5.3.** Pregled sociodemografskih, kliničkih i volumetrijskih podataka. Brojevi su medijan (raspon) ili apsolutna (relativna) učestalost (n),  $\mu$ -aritmetička sredina, SD-standardna devijacija; medijani ("prije" i "nakon" drenaže) su uspoređivani Mann-Whitney U testom; \*statistički značajna razlika; MMSE – mini-mental test (engl. Mini-mental state examination); JNPHS – Japanska NPH ljestvica (engl. Japanese Normal-Pressure Hydrocephalus Scale); CST – cerebrospinalna tekućina

	medijan/n	$\mu$	SD	raspon	P
dob (godine)	72,5	72,8	4,9	65-82	
spol (ž/m)	12/8	-	-	60/40	
MMSE prije drenaže	26	24	5,9	4-29	0,044*
MMSE nakon drenaže	28	25,7	6,2	4-30	
JNPHS prije drenaže	4,5	5,1	2,2	3-11	0,010*
JNPHS nakon drenaže	3	3,5	2,8	1-11	
Volumen CST-a intrakranijski prije drenaže (ml)	357,5	366,5	77,3	262,7-522,5	0,686
Volumen CST-a intrakranijski nakon drenaže (ml)	351,1	350,8	77,9	221,8-512,2	
Volumen CST-a u moždanim komorama prije drenaže (ml)	166,4	179,5	63,4	77,7-286,3	0,984
Volumen CST-a u moždanim komorama nakon drenaže (ml)	151,3	177,2	63,1	78,3-287,9	
Volumen CST-a u intrakranijskom subarahnoidnom prostoru prije drenaže (ml)	173,8	187,0	55,5	123-333,1	0,653
Volumen CST-a u intrakranijskom subarahnoidnom prostoru nakon drenaže (ml)	171,3	173,6	36	110,3-232,7	
Volumen CST-a u spinalnom prostoru prije drenaže (ml)	95,8	100	25,1	72,9-151,9	0,127
Volumen CST-a u spinalnom prostoru nakon drenaže (ml)	75,1	89,9	28,1	47,3-148,6	
Ukupni kraniospinalni volumen CST-a prije drenaže (ml)	455,8	466,5	85,8	343,1-618,3	0,526
Ukupni kraniospinalni volumen CST-a nakon drenaže (ml)	427,8	440,8	89,8	269,2-589,4	
Volumen mozga prije drenaže (ml)	1127	1139	112,9	792,2-1272	0,77
Volumen mozga nakon drenaže (ml)	1147,9	1150,4	89,7	949,5-1269,8	
Volumen drenirane CST kroz 72 h (ml)	770	776,2	102,9	570-982	
Postavljena ventrikuloperitonealna drenaža (da/ne)	10/10	-	-	50/50	

Usporedba volumena cerebrospinalne tekućine prije i nakon drenaže kod svih bolesnika ukazuje kako su ukupni intrakranijski volumen, volumen moždanih komora i volumen intrakranijskog subarahnoidnog prostora, spinalni volumen, te ukupni kraniospinalni volumen nakon drenaže bili nešto niži, no statistički se nisu razlikovali (Tablica 5.3., Slika 5.2.). Medijan volumena cerebrospinalne tekućine u spinalnom prostoru je iznosio prije postavljanja drenaže 95,8 ml, dok je medijan nakon testne drenaže iznosio 75,1 ml, uz  $p = 0,127$  što i dalje ne predstavlja statistički značajnu razliku zbog varijabilnosti rezultata (Tablica 5.3., Slika 5.2. ). Statističku značajnu razliku opazili smo samo kod rezultata MMSE i JNPHS prije i nakon vanjske lumbalne drenaže.



**Slika 5.2.** Grafčki prikaz volumetrijskih podataka (medijana i raspona) prije i nakon vanjske lumbalne drenaže (ELD- engl. external lumbar drainage) za sve bolesnike za različite dijelove SŽS-a i to: volumen CST-a intrakranijski, CST-a u moždanim komorama, CST-a u intrakranijskom subarahnoidnom prostoru, CST-a u spinalnom prostoru te ukupan kraniospinalni volumen CST-a. U crnom pravokutniku je uz svaki graf prikazana p vrijednost.

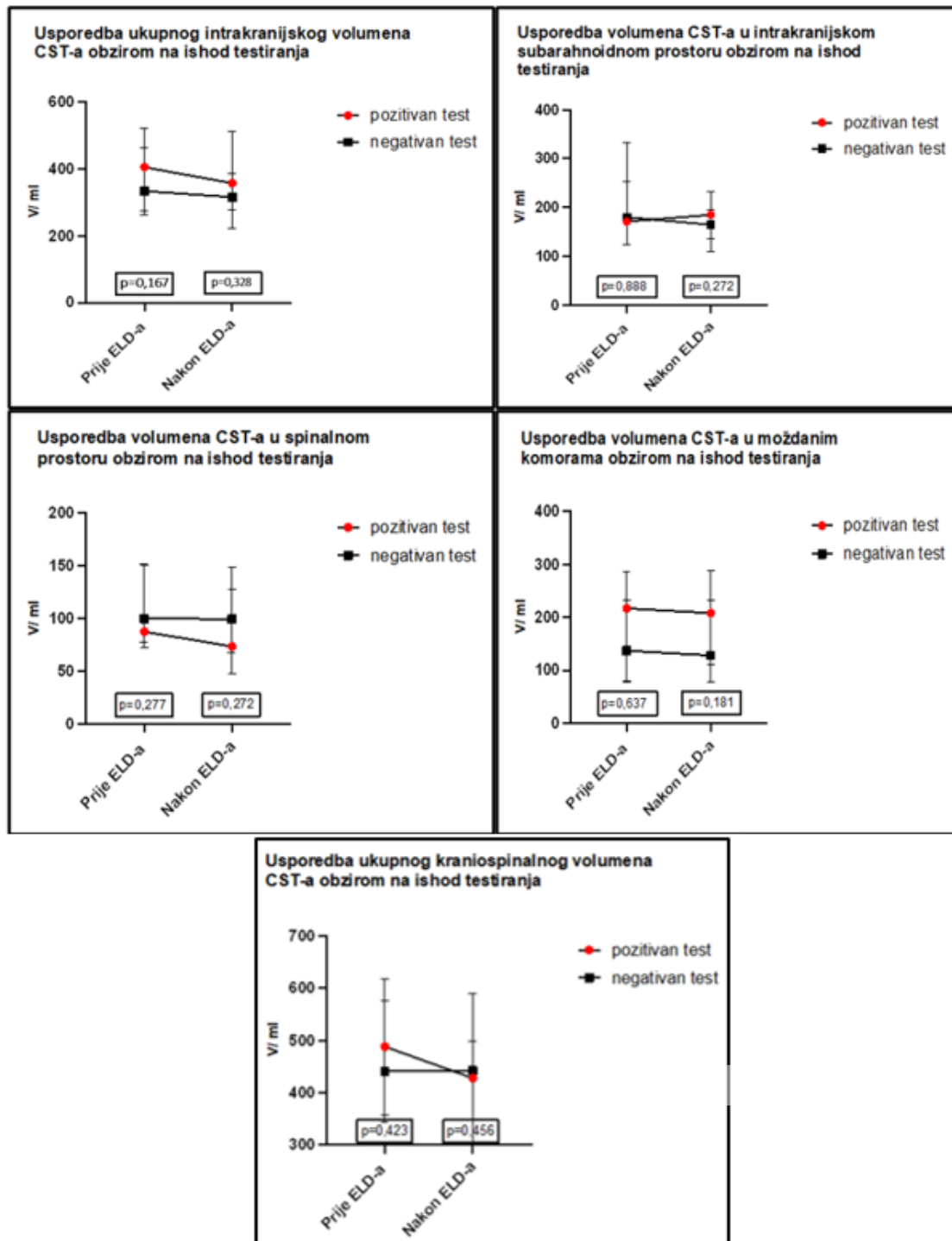
Za usporedbe sociodemografskih, kliničkih i volumetrijskih podataka s obzirom na ishod testa (pozitivan test- kliničko poboljšanje nakon vanjske lumbalne drenaže, negativan test- bez kliničkog poboljšanja), korišten je Mann-Whitney U test, a proporcije su uspoređivane hi-kvadrat testom. (Tablica 5.4.) Statistički je značajna samo razlika rezultata Japanske NPH ljestvice (JNPHS) nakon vanjske lumbalne drenaže, gdje kod bolesnika koji su imali pozitivan odgovor na testnu drenažu kontrolni medijan iznosi 2, dok kod pacijenata koji nisu imali dobar odgovor medijan iznosi 4 (p=0,015).

**Tablica 5.4.** Usporedbe sociodemografskih, kliničkih i volumetrijskih podataka s obzirom na ishod testa. Brojevi su medijan (raspon) ili apsolutna (relativna) učestalost,  $\mu$ -aritmetička sredina, SD-standardna devijacija; medijani su uspoređivani Mann-Whitney U testom; proporcije su uspoređivane hi-kvadrat testom; \*statistički značajna razlika; MMSE – test minimalne mentalne procjene (engl. Mini-mental state examination); JNPHS – Japanska NPH ljestvica (engl. Japanese Normal-Pressure Hydrocephalus Scale); CST – cerebros spinalna tekućina.

	pozitivan test (n=10)				negativan test (n=10)				P
	medijan/n	$\mu$	SD	raspon	medijan/n	$\mu$	SD	raspon	
dob (godine)	71	72	5,3	65-82	74	73,7	4,5	67-82	0,393
spol (ž/m)	5/5			50/50	7/3			70/30	0,650
MMSE prije drenaže	27	25,9	2,3	21-28	24	22	7,7	4-29	0,280
MMSE nakon drenaže	29	28	2,1	23-30	26	23,3	8,1	4-30	0,143
JNPHS prije drenaže	5	4,8	1,5	3-7	4	5,3	2,9	3-11	>0,999
JNPHS nakon drenaže	2	2	1,3	1-5	4	4,9	3,2	1-11	0,015*

	pozitivan test (n=10)				negativan test (n=10)				P
	medijan/n	μ	SD	raspon	medijan/n	μ	SD	raspon	
Volumen CST-a intrakranijski prije drenaže (ml)	405,3	392,6	82,3	274,7-522,5	333,7	337,2	63,9	262,7-463,9	0,167
Volumen CST-a intrakranijski nakon drenaže (ml)	357,1	374,7	82,2	277,1-512,2	315,9	315	60	221,8-386,6	0,328
Volumen CST-a u moždanim komorama prije drenaže (ml)	217	198,1	66,7	78-286	137	158,6	56,2	79,5-233	0,637
Volumen CST-a u moždanim komorama nakon drenaže (ml)	208	192,7	66,4	78-288	128	154	55	109,7-232,6	0,181
Volumen CST-a u intrakranijskom subarahnoidnom prostoru prije drenaže (ml)	171	194,5	65,4	123-333	180	178,6	44,7	124,2-251,8	0,888
Volumen CST-a u intrakranijskom subarahnoidnom prostoru nakon drenaže (ml)	185	182	36,9	135,8-232,8	164,9	161	33,7	110,3-196,5	0,272
Volumen CST-a u spinalnom prostoru prije drenaže (ml)	87,7	94,4	24,3	72,9-151,9	100,1	106,4	26	77,8-151,1	0,277
Volumen CST-a u spinalnom prostoru nakon drenaže (ml)	73,6	83,4	20,3	67,8-127,5	99,5	99,5	36,9	47,3-148,6	0,272
Ukupni kraniospinalni volumen CST-a prije drenaže (ml)	488,3	487	94,5	356,4-618,3	440,9	443,5	74	343,1-577	0,423
Ukupni kraniospinalni volumen CST-a nakon drenaže (ml)	427,8	458,3	90,7	348,9-589,4	441,8	414,5	89,7	269,2-497,6	0,456
Volumen mozga prije drenaže (ml)	1167,7	1138,2	146,9	792,2-1272	1125,1	1139,9	67,1	1068,8-1271,8	0,976
Volumen mozga nakon drenaže (ml)	1158,9	1150,4	101,6	949,5-1269,8	1147,9	1150,3	66,3	1079,8-1250,8	0,998
Volumen drenirane CST kroz 72 h (ml)	730	740,7	110,2	570-931	787	791	95,1	650-982	0,278

Kad uspoređujemo početni intrakranijski volumen cerebrospinalne tekućine, vidimo da je volumen CST-a veći u pacijenata koji imaju pozitivan odgovor na testnu drenažu i iznosi 405,3 ml, dok u negativnoj grupi medijan iznosi 333,7 (p= 0,167).



**Slika 5.3.** Grafički prikaz volumetrijskih podataka (*medijana* – crvena točka ili crni kvadrat, te *raspona* - tanke okomite linije) prije i nakon vanjske lumbalne drenaže s obzirom na ishod testiranja (pozitivan klinički test - indicacija za postavljanje trajne ventrikuloperitonealne drenaže, negativan test - bez kliničkog poboljšanja). U crnom pravokutniku je uz svaki graf prikazana p vrijednost, ELD (engl. external lumbar drainage)- vanjska lumbalna drenaža

Medijan ukupnog intrakranijskog volumena CST-a nakon testne drenaže je niži u obje grupe no izraženije je niži u pozitivnoj grupi i iznosi 357,1 ml. Usporedbom početnih volumena

cerebrospinalne tekućine u moždanim komorama i subarahnoidnom prostoru, vidljivo je da je volumen cerebrospinalne tekućine u komorama veći u pozitivnoj grupi (medijan - 217 ml), dok je volumen cerebrospinalne tekućine u subarahnoidnom prostoru veći u negativnoj grupi (medijan - 180 ml). Bolesnici s pozitivnim kliničkim odgovorom imaju više volumene CST-a u subarahnoidnom prostoru nakon vanjske drenaže (medijan - 185 ml).

Usporedbom volumena cerebrospinalne tekućine u spinalnom prostoru prije i nakon testne drenaže, vidljivo je da je u bolesnika s pozitivnim kliničkim odgovorom početni volumen niži (medijan- 87,7 ml), dok u negativnoj grupi medijan iznosi 100,1 ml, no isto tako je medijan volumena nakon ELD-a u pozitivnoj grupi značajnije niži (73,6 ml) u usporedbi s medijanom volumena u negativnoj grupi bolesnika (99,5 ml).

Medijan kraniospinalnog volumena cerebrospinalne tekućine nakon testne drenaže u negativnoj grupi iznosi 441,8 ml što je čak i više od medijana početnog volumena u istoj grupi koji iznosi 440,9 ml. U pozitivnoj grupi vrijednosti medijana za kraniospinalni volumen CST-a su nakon drenaže niže u odnosu na početne (427,8 ml u usporedbi s 488,3 ml). Ukoliko uspoređujemo količinu ukupno drenirane cerebrospinalne tekućine po skupinama tijekom 72 h vidljivo je da je količina dreniranog CST-a veća u negativnoj grupi - 787 ml u odnosu na pozitivnu skupinu u kojoj volumen iznosi 730 ml ( $p = 0,278$ ) (Tablica 5.4., Slika 5.3. ).

Rezultati ukazuju kako je ukupni intrakranijski, te ukupni kraniospinalni volumen CST-a bio veći u grupi ispitanika koja je imala pozitivan odgovor na drenažu, što bi ukazivalo kako je kod njih kraniospinalni kompenzacijski kapacitet pred iscrpljenjem (engl. decreased craniospinal compliance) (Slika 5.3.). Tome u prilog govori i činjenica kako je u toj skupini došlo do značajnijeg smanjenja volumena CST-a prilikom drenaže u usporedbi sa skupinom koja je imala negativan klinički odgovor.

### 5.3. Promjene tlakova cerebrospinalne tekućine tijekom drenaže

U tablici 5.5. prikazane su vrijednosti lumbalnog tlaka tijekom 72 sata za sve bolesnike, izražene u cm H<sub>2</sub>O, koji odgovara intrakranijskom tlaku u ležećem položaju, i to kao medijan, te minimalne i maksimalne vrijednosti. Prikazani su i medijani, minimalne i maksimalne vrijednosti zasebno za bolesnike koji su imali pozitivan i negativan odgovor na vanjsku lumbalnu drenažu (Slika 5.4., Slika 5.5., Slika 5.6.).

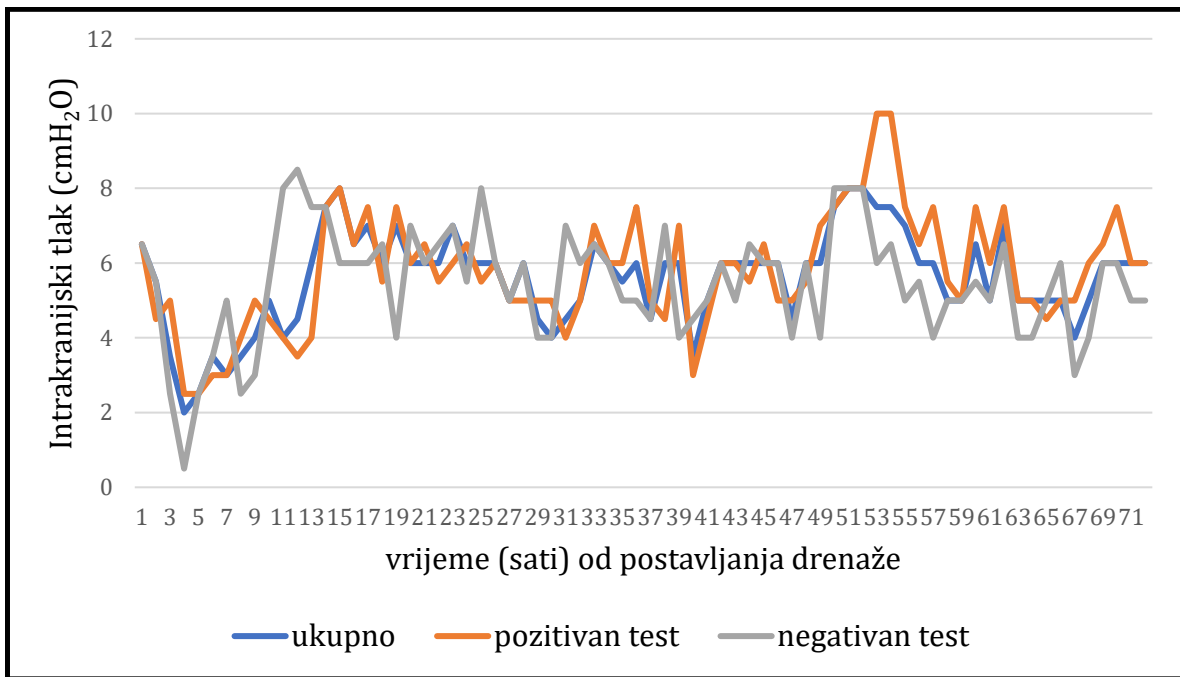
**Tablica 5.5.** Prikaz vrijednosti intrakranijskog tlaka tijekom 72 h (u cm H<sub>2</sub>O) izražene za sve pacijente medijanom, minimalnom i maksimalnom vrijednosti, kao i prikaz medijana, min. i maks. vrijednosti za pacijente koji su pozitivno odreagirali na testnu drenažu (pozitivan test) te one koji nisu imali pozitivan klinički odgovor (negativan test)

h	ukupno			pozitivan test			negativan test		
	medijan	min.	maks.	medijan	min.	maks.	medijan	min.	maks.
1	6,5	2	11	6,5	2	11	6,5	2	8
2	5,5	-2	16	4,5	0	10	5,5	-2	16
3	3,5	-3	10	5	0	10	2,5	-3	6
4	2	-4	10	2,5	-3	9	0,5	-4	10
5	2,5	-3	12	2,5	0	10	2,5	-3	12
6	3,5	-6	13	3	0	10	3,5	-6	13
7	3	-6	16	3	0	8	5	-6	16
8	3,5	-9	23	4	1	11	2,5	-9	23
9	4	-6	12	5	1	7	3	-6	12
10	5	-8	19	4,5	1	9	5,5	-8	19
11	4	-8	20	4	2	10	8	-8	20
12	4,5	-9	13	3,5	1	8	8,5	-9	13
13	6	-8	16	4	1	10	7,5	-8	16
14	7,5	-7	22	7,5	1	11	7,5	-7	22
15	8	-8	13	8	2	11	6	-8	13
16	6,5	-6	10	6,5	1	10	6	-6	10
17	7	-7	16	7,5	2	12	6	-7	16
18	6	-7	15	5,5	2	10	6,5	-7	15
19	7	-8	13	7,5	3	9	4	-8	13
20	6	-8	12	6	1	12	7	-8	10
21	6	-7	15	6,5	1	11	6	-7	15
22	6	-5	10	5,5	1	10	6,5	-5	10
23	7	-6	15	6	2	15	7	-6	14
24	6	-9	13	6,5	2	13	5,5	-9	13
25	6	-6	18	5,5	1	8	8	-6	18
26	6	-8	18	6	2	11	6	-8	18
27	5	-8	25	5	2	8	5	-8	25
28	6	-7	25	5	0	7	6	-7	25
29	4,5	-7	17	5	1	8	4	-7	17
30	4	-8	13	5	2	13	4	-8	13
31	4,5	1	11	4	2	10	7	1	11
32	5	1	18	5	2	8	6	1	18
33	6,5	-6	21	7	1	11	6,5	-6	21
34	6	2	16	6	2	11	6	2	16
35	5,5	-3	17	6	1	13	5	-3	17
36	6	-1	21	7,5	2	12	5	-1	21
37	4,5	2	15	5	2	10	4,5	2	15
38	6	1	21	4,5	1	9	7	1	21
39	6	-4	18	7	1	9	4	-4	18

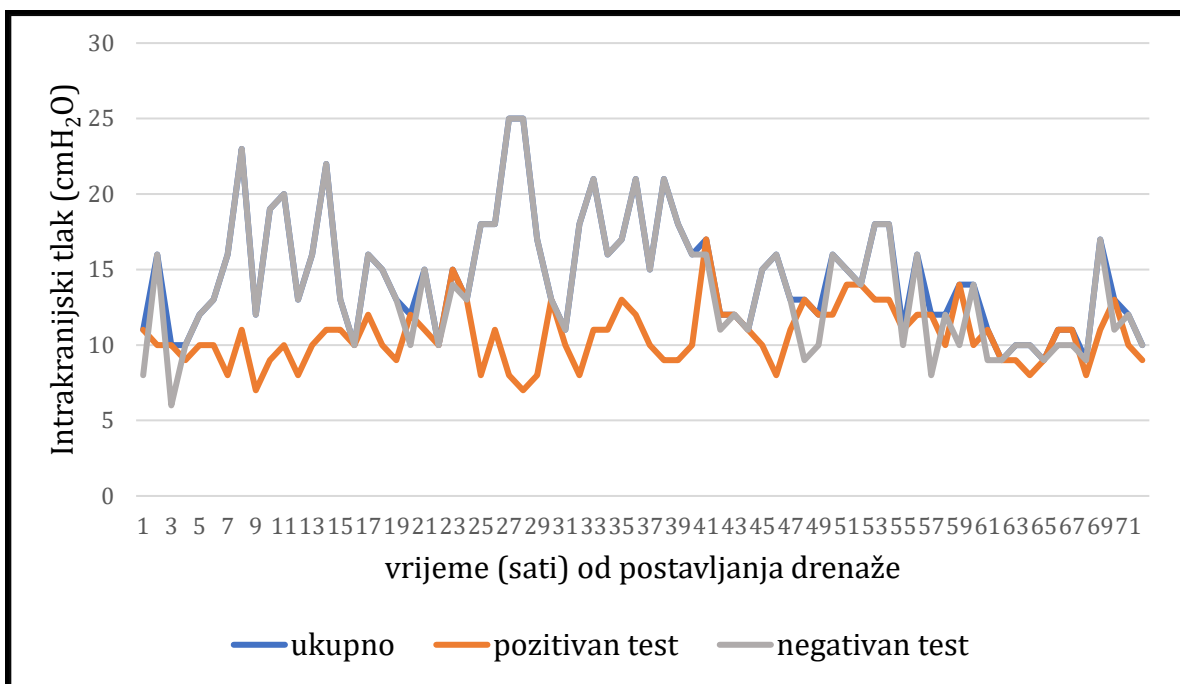


h	ukupno			pozitivan test			negativan test		
	medijan	min.	maks.	medijan	min.	maks.	medijan	min.	maks.
40	3,5	-7	16	3	1	10	4,5	-7	16
41	5	-3	17	4,5	-1	17	5	-3	16
42	6	-1	12	6	2	12	6	-1	11
43	6	-7	12	6	2	12	5	-7	12
44	6	-6	11	5,5	0	11	6,5	-6	11
45	6	-8	15	6,5	0	10	6	-8	15
46	6	-8	16	5	1	8	6	-8	16
47	4,5	-7	13	5	-7	11	4	-7	13
48	6	-3	13	5,5	3	13	6	-3	9
49	6	-1	12	7	-1	12	4	-1	10
50	7,5	-3	16	7,5	1	12	8	-3	16
51	8	-4	15	8	3	14	8	-4	15
52	8	-2	14	8	1	14	8	-2	14
53	7,5	-3	18	10	5	13	6	-3	18
54	7,5	-6	18	10	-6	13	6,5	-3	18
55	7	-1	11	7,5	1	11	5	-1	10
56	6	-1	16	6,5	1	12	5,5	-1	16
57	6	-3	12	7,5	-1	12	4	-3	8
58	5	-2	12	5,5	3	10	5	-2	12
59	5	0	14	5	1	14	5	0	10
60	6,5	1	14	7,5	6	10	5,5	1	14
61	5	1	11	6	2	11	5	1	9
62	7	0	9	7,5	1	9	6,5	0	9
63	5	-2	10	5	1	9	4	-2	10
64	5	-4	10	5	3	8	4	-4	10
65	5	0	9	4,5	1	9	5	0	9
66	5	1	11	5	1	11	6	1	10
67	4	-1	11	5	0	11	3	-1	10
68	5	-3	9	6	2	8	4	-3	9
69	6	0	17	6,5	2	11	6	0	17
70	6	1	13	7,5	1	13	6	2	11
71	6	-5	12	6	1	10	5	-5	12
72	6	-3	10	6	1	9	5	-3	10

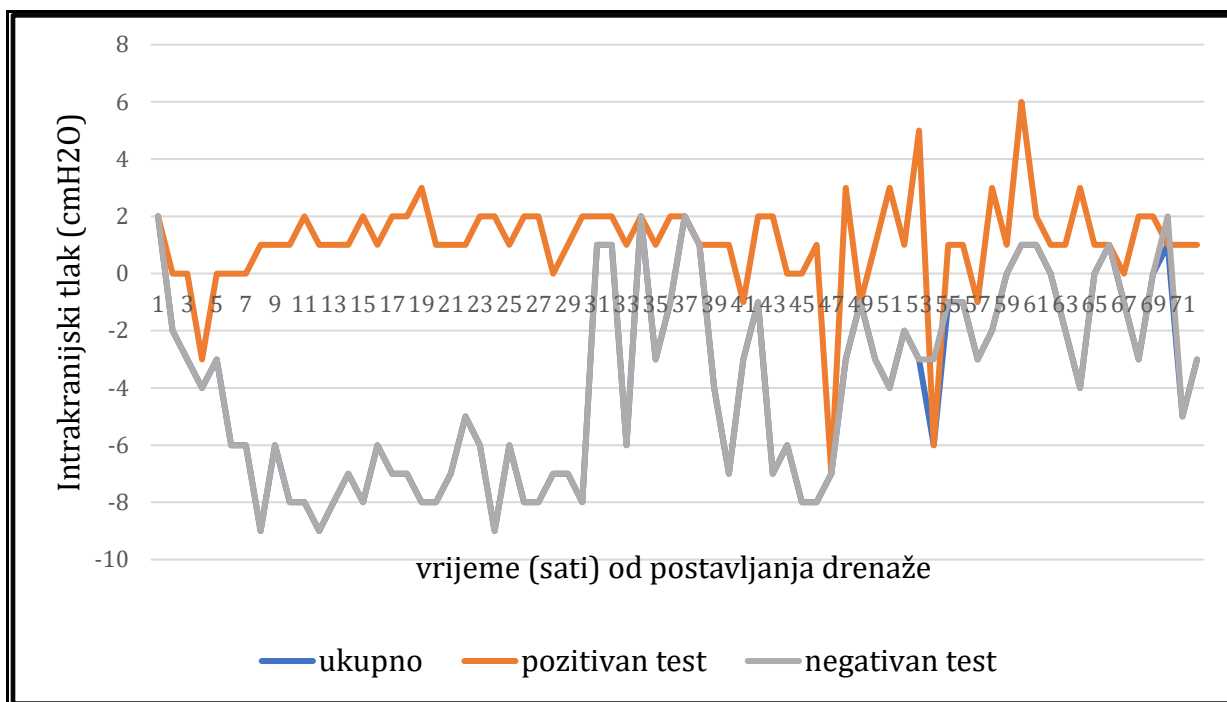
Kad analiziramo grafički dobivene rezultate vidimo značajne razlike u grafovima minimalnih i maksimalnih vrijednosti za dvije skupine bolesnika, gdje bolesnici koji nisu pokazali kliničko poboljšanje nakon testne drenaže imaju veću varijabilnost, odnosno veće ekstreme minimalnih i maksimalnih vrijednosti, dok bolesnici s pozitivnim kliničkim odgovorom nemaju takve oscilacije tlaka ( Slika 5.5, Slika 5.6.).



Slika 5.4. Prosječne satne vrijednosti intrakranijskog tlaka (cm H<sub>2</sub>O) tijekom 72h

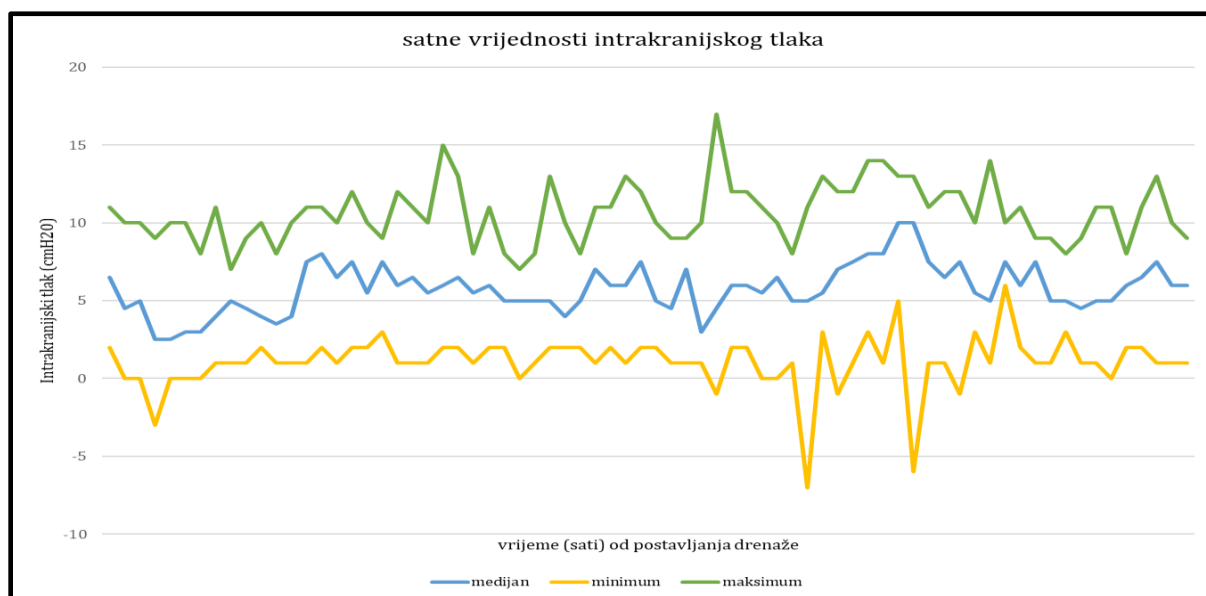


Slika 5.5. Maksimum satnih vrijednosti intrakranijskog tlaka tijekom 72 h



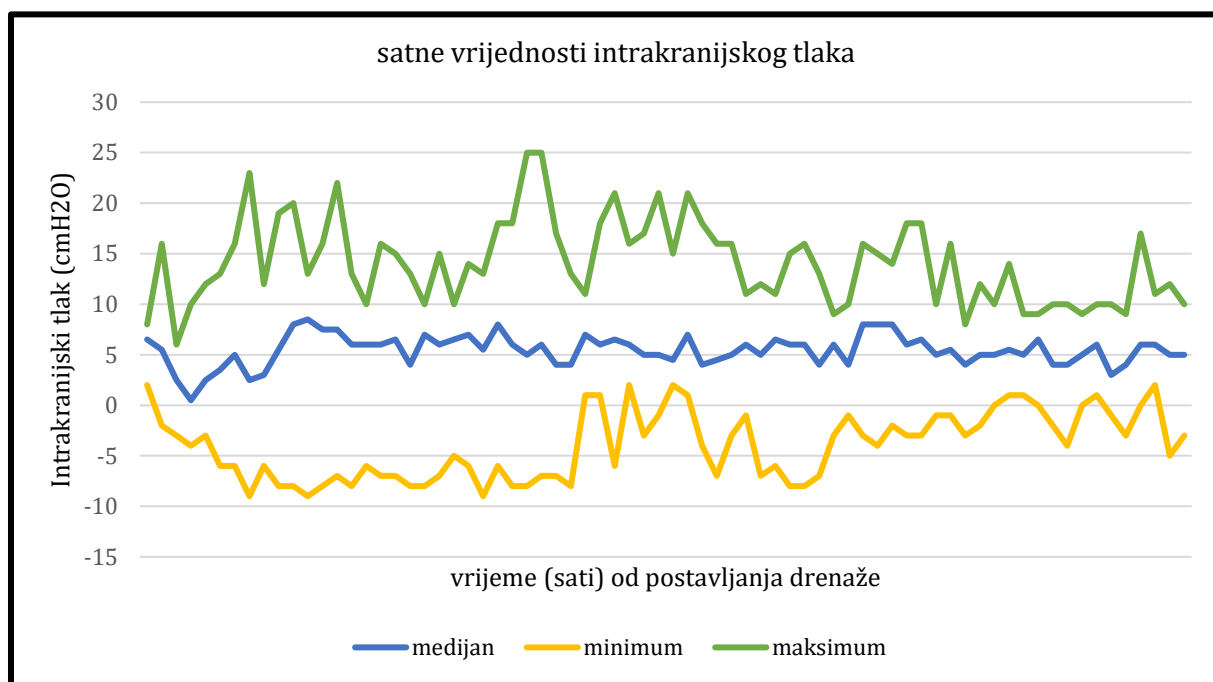
Slika 5.6. Minimum satnih vrijednosti intrakranijskog tlaka tijekom 72 h

Ako analiziramo zasebno za svaku kategoriju bolesnika medijane, minimalne i maksimalne vrijednosti tlaka, vidimo da je u pacijenata koji su imali pozitivan odgovor na vanjsku lumbalnu drenažu najmanja vrijednost u 72 - satnom razdoblju iznosila -7 cm H<sub>2</sub>O, najviša vrijednost u istom vremenom intervalu iznosila 17 cm H<sub>2</sub>O, dok su medijani iznosili između 2,5 - 10 cm H<sub>2</sub>O (Tablica 5.5., Slika 5.7.).



Slika 5.7. Satne vrijednosti intrakranijskog tlaka kod bolesnika koji su imali pozitivan klinički odgovor na vanjsku lumbalnu drenažu (pozitivan test)

U grupi bolesnika koji nisu imali pozitivan klinički odgovor (negativan test) vidljivo je da najniža vrijednost tlaka u 72-satnom razdoblju iznosila -9 cm H<sub>2</sub>O, najviša 25 cm H<sub>2</sub>O, dok su medijani u istom vremenom intervalu iznosili između 0 - 8,5 cm H<sub>2</sub>O (Tablica 5.5., Slika 5.8.).



**Slika 5.8.** Satne vrijednosti intrakranijskog tlaka kod bolesnika koji nisu imali klinički odgovor na vanjsku lumbalnu drenažu (negativan test)

Praćenje promjena tlaka tijekom drenaže ukazuje kako bolesnici s pozitivnim kliničkim odgovorom imaju manje oscilacije tlaka cerebrospinalne tekućine (Slika 5.5, Slika 5.6., Slika 5.7.), dok su u ispitanika sa negativnim kliničkim odgovorom promjene tlaka izraženije (Slika 5.5, Slika 5.6., Slika 5.8.). Iako je u grupi s negativnim testom tijekom drenaže izdrenirano više ml CST-a ta grupa je paradoksalno imala i veće maksimalne vrijednosti tlaka.

#### 5.4. Koncentracije biomarkera u cerebrospinalnoj tekućini tijekom drenaže

Neposredno nakon postavljanja vanjske lumbalne drenaže uzorkovan je prvi uzorak cerebrospinalne tekućine iz koje su kvantificirani biomarkeri [ $\beta$ -amiloidni proteini (A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 1-40), ukupni tau (t-tau) i fosforilirani-tau (p-tau), NFL, IL, te MBP]. Uzorkovanje je ponovljeno nakon 36 h te 72 h. U tablici 5.6. prikazane su apsolutne vrijednosti biomarkera amiloida (A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 1-40), ukupnog tau proteina, te fosforiliranog tau proteina (pT181) (t-tau) (izražene u pg/ml) u cerebrospinalnoj tekućini u vremenskim točkama 0`- odmah po postavljanju, nakon 36 h i 72h.

**Tablica 5.6.** Prikaz apsolutnih koncentracija (c) biomarkera (izražene u pg/ml) u cerebrospinalnoj tekućini u vremenskim točkama: 0`- početna vrijednost odmah po postavljanju vanjske lumbalne drenaže, 36h- nakon 36 h, 72h- nakon 72h. Žutom bojom su označeni pacijenti koji su imali pozitivan klinički odgovor na vanjsku lumbalnu drenažu

Bolesnik redni broj	0` c (A $\beta$ 1-42)	36h c (A $\beta$ 1-42)	72h c (A $\beta$ 1-42)	0` c (A $\beta$ 1-40)	36h c (A $\beta$ 1-40)	72h c (A $\beta$ 1-40)	0` c Ukupni tau	36h c Ukupni tau	72h c Ukupni tau	0` c p- Tau [pT181]	36h c p- Tau [pT181]	72h c p-Tau [pT181]
1.	136,4	140,3	273,9	2.531,1	3.941,2	5.187,8	161,2	369,9	381,9	27,4	51,6	63,2
2.	108,2	133,4	142,2	3.692,4	3.921,8	4.254,3	165,7	181,8	204,8	26,1	29,7	29,3
3.	314,1	550,1	476,5	8.729,8	10.280,1	8.321,8	335,0	420,5	455,4	58,9	108,8	105,3
4.	263,9	367,7	353,7	5.634,3	7.266,0	7.774,5	248,2	409,9	465,0	37,4	57,8	74,5
5.	316,8	379,1	391,5	3.550,2	6.147,4	6.937,0	165,3	278,4	296,3	28,1	35,9	40,7
6.	55,1	15,2	118,1	1.685,4	2.222,1	3.454,2	331,3	693,8	1.027,1	37,7	76,3	123,2
7.	97,1	159,1	139,3	4.078,3	6.256,4	5.248,3	295,3	478,1	421,5	44,8	107,5	34,0
8.	96,2	411,3	96,2	424,6	2.265,3	424,6	59,7	138,1	55,7	13,1	30,9	17,8
9.	72,0	183,8	580,4	631,4	1.441,8	7.214,3	91,6	357,0	204,6	23,7	59,2	63,4
10.	72,0	239,7	235,0	384,3	1.138,0	1.162,0	69,8	169,4	235,9	14,1	33,0	45,6
11.	248,8	320,0	556,2	1.668,8	4.408,2	2.756,8	144,6	275,8	318,5	39,8	50,9	56,3
12.	200,2	335,7	437,4	1.849,8	1.827,1	2.579,8	55,7	141,3	141,3	18,9	32,7	33,6
13.	1.486,1	1.386,8	568,2	11.045,3	12.682,4	4.567,9	263,8	251,7	355,1	52,9	54,4	69,5
14.	85,0	235,0	385,2	1.162,0	1.064,9	3.511,8	83,3	117,8	235,9	18,9	31,9	53,9
15.	270,8	433,7		1.668,8	4.527,3		157,1	264,1		45,2	34,1	
16.	42,9	409,9	47,0	341,1	8.969,2	913,3	22,7	171,3	75,1	15,2	36,5	32,2
17.	144,5	191,5	110,7	806,2	1.233,3	462,7	183,0	206,7	212,8	39,1	43,4	40,4
18.	481,2	323,7	42,9	5.712,4	4.181,2	384,3	86,8	77,5	15,8	24,8	23,6	22,3
19.	320,9	249,9	195,3	11.462,7	8.842,9	10.134,5	108,3	361,2	385,8	22,3	65,3	48,7
20.	449,4	634,5	535,9	14.250,6	22.197,7	21.188,4	200,7	352,4	367,1	37,0	65,8	68,6

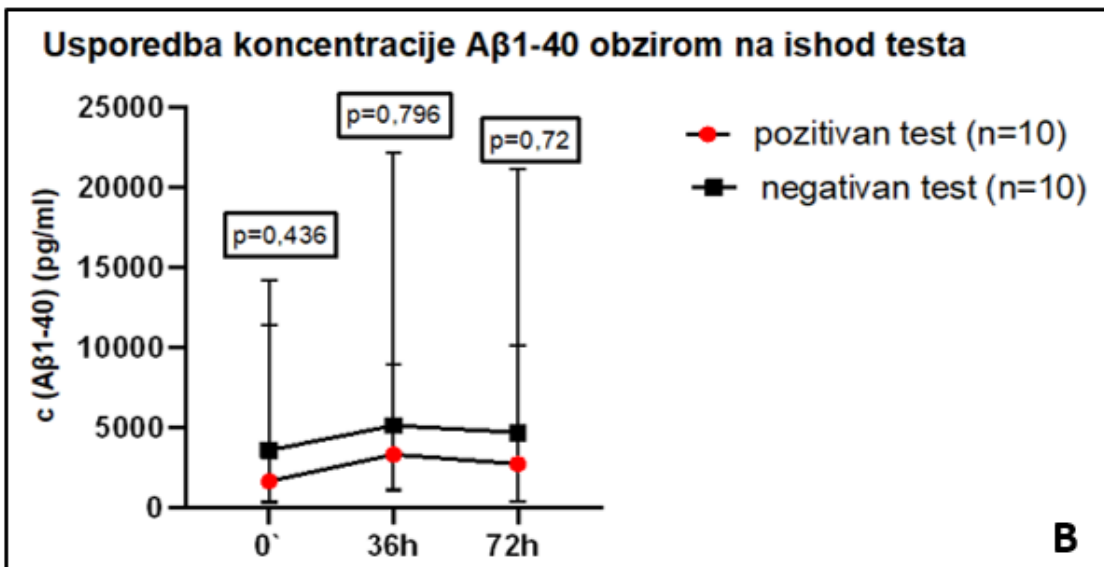
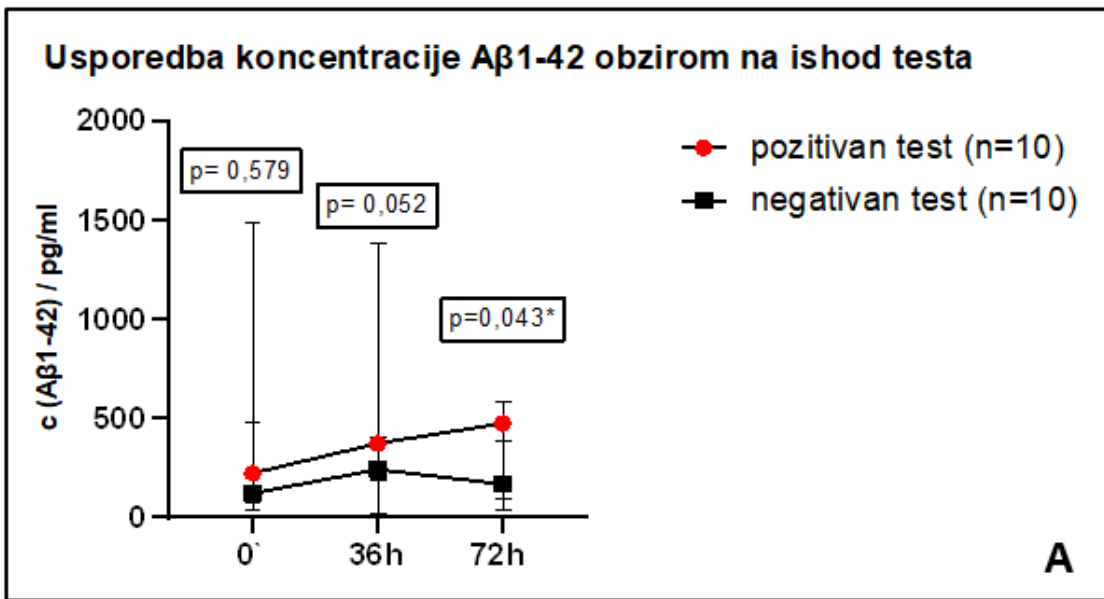
**Tablica 5.7.** Pregled koncentracija biomarkera u cerebrospinalnoj tekućini izražene medijanom, minimalnom i maksimalnom vrijednosti za sve pacijente. 0<sup>-</sup> - početna razina neposredno nakon postavljanja vanjske lumbalne drenaže, nakon 36 sati te nakon 72 sata od postavljanja testne drenaže. U zagradama je prikazan broj pacijenata kod kojih je izvedeno mjerenje. Vrijednosti su izražene u pg/ml. CST- cerebrospinalna tekućina.

<b>Biomarkeri u CST-u u različitim vremenskim točkama</b>	<b>medijan</b>	<b>minimum</b>	<b>maksimum</b>
Aβ1-42 početna razina (n = 20)	172,4	42,9	1486,1
Aβ1-42 nakon 36 sati (n = 20))	321,9	15,2	1386,8
Aβ1-42 nakon 72 sata (n =19)	273,9	42,9	580,4
Aβ1-40 početna razina (n = 20)	2190,4	341,1	14250,6
Aβ1-40 nakon 36 sati (n = 20)	4294,7	1.064,9	22197,7
Aβ1-40 nakon 72 sata (n = 19)	4254,3	384,3	21188,4
Ukupni tau početna razina (n = 20)	159,2	22,7	335,0
Ukupni tau nakon 36 sati (n = 20)	270,0	77,5	693,8
Ukupni tau nakon 72 sata (n = 19)	296,3	15,8	1027,1
NFL početna razina (n = 7)	267,2	101,9	370,6
NFL nakon 36 sati (n = 7)	384,5	175,1	550,0
NFL nakon 72 sata (n = 7)	320,8	245,3	649,4
Tau pS199 početna razina (n = 7)	3,5	2,5	5,2
Tau pS199 nakon 36 sati (n = 7)	4,9	2,3	7,3
Tau ps199 nakon 72 sata (n = 7)	5,2	2,7	11,2
Tau pT181 početna razina (n = 20)	27,7	13,1	58,9
Tau pT181 nakon 36 sati (n = 20)	47,2	23,6	108,8
Tau pT181 nakon 72 sata (n = 19)	48,7	17,8	123,2
IL-6 početna razina (n = 10)	3,1	2,1	26,4
IL-6 nakon 36 sati (n = 10)	21,6	10,8	26,5
IL-6 nakon 72 sata (n = 10)	14,7	6,3	24,1
IL-1β početna razina (n = 10)	0,9	0,0	20,3
IL-1β nakon 36 sati (n = 10)	0,1	0,0	20,4
IL-1β nakon 72 sata (n = 10)	6,2	0,0	18,6
MBP početna razina (n = 15)	1442,8	468,4	2852,3
MBP nakon 36 sati (n = 15)	1747,2	709,6	3700,9
MBP nakon 72 sata (n = 14)	1893,9	652,6	2691,5

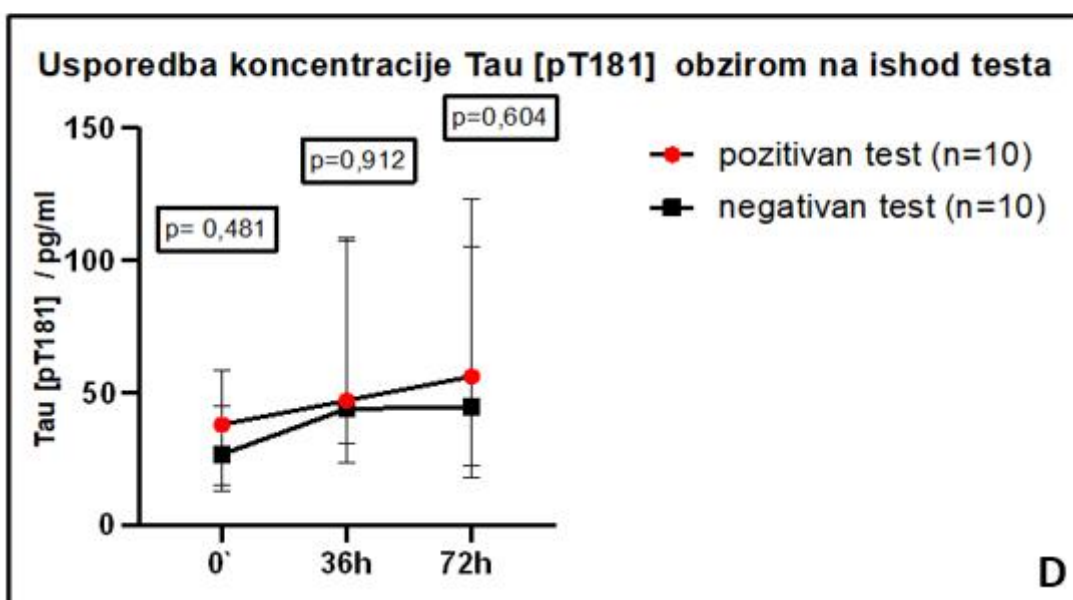
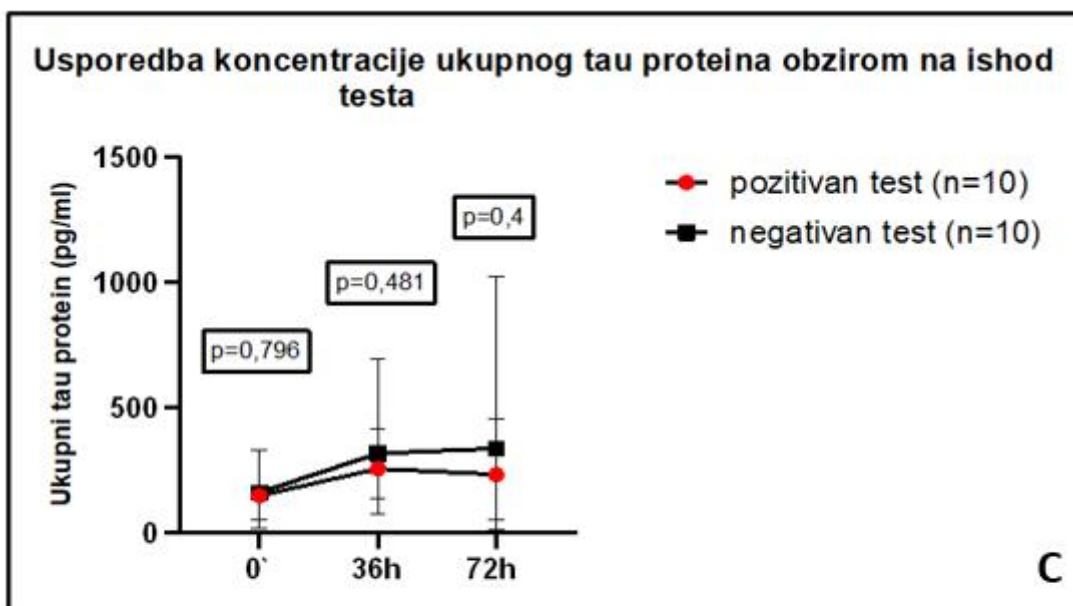
**Tablica 5.8.** Usporedbe biomarkera (pg/ml) u cerebrospinalnoj tekućini s obzirom na ishod testa; \*statistički značajna razlika

Biomarkeri	pozitivan test (n=10)		negativan test (n=10)		p
	medijan	raspon	medijan	Raspon	
Aβ1-42 početna razina	224,5	72-1486,1	122,3	42,9-481,2	0,579
Aβ1-42 nakon 36 sati	373,5	183,8-1386,8	242,4	15,2-409,9	0,052
Aβ1-42 nakon 72 sata	476,5	96,2-580,4	168,8	42,9-391,5	<b>0,043*</b>
Aβ1-40 početna razina	1668,8	384,3-14250,6	3621,3	341,1-11462,7	0,436
Aβ1-40 nakon 36 sati	3336,7	1138-22197,7	5164,3	1064,9-8969,2	0,796
Aβ1-40 nakon 72 sata	2756,8	424,6-21188,4	4721,0	384,3-10134,5	0,72
Ukupni tau početna razina	150,9	55,7-335	163,2	22,7-331,3	0,796
Ukupni tau nakon 36 sati	257,9	138,1-420,5	319,8	77,5-693,8	0,481
Ukupni tau nakon 72 sata	235,9	55,7-455,4	339,1	15,8-1027,1	0,4
Tau pT181 početna razina	38,1	13,1-58,9	26,8	15,2-44,8	0,481
Tau pT181 nakon 36 sati	47,2	30,9-108,8	44,1	23,6-107,5	0,912
Tau pT181 nakon 72 sata	56,3	17,8-105,3	44,7	22,3-123,2	0,604

Kad analiziramo vrijednosti biomarkera amiloida obzirom na ishod testa, vidimo da je u bolesnika koji su imali kliničko poboljšanje nakon lumbalne drenaže viša vrijednost izoforme Aβ1-42 u svim vremenskim točkama u odnosu na grupu koja nije imala kliničko poboljšanje, dok je statistički značajna samo razlika nakon 72 h (Tablica 5.8., Slika 5.9. A). Trend viših vrijednosti u grupi koja nije dobro reagirala na postavljanje privremene drenaže vidljiv je za biomarkere ukupni tau (Slika 5.9. C) te amiloid Aβ1-40 (Slika 5.9. B) u svim vremenskim točkama, no bez statističke značajnosti. Isto tako vidljiv je trend viših vrijednosti biomarkera fosforiliranog Tau proteina (pT181) na taurinskom mjestu 181 u pozitivnoj grupi bolesnika u svim vremenskim točkama, no međutim bez statistički značajne razlike (Slika 5.9. D).







**Slika 5.9.** Usporedbe (rangovi) različitih biomarkera: amiloida ( $A\beta 1-42$ ,  $A\beta 1-40$ ), ukupnog tau proteina (*t-tau*), te fosforiliranog tau proteina (*pT181*) (izražene u pg/ml) u cerebrospinalnoj tekućini u vremenskim točkama 0'-odmah po postavljanju, nakon 36 h te 72h.

Koncentracija izoforme  $A\beta 1-42$  u dreniranoj CST je konstantno rasla u grupi bolesnika s pozitivnim kliničkim odgovorom, što ukazuje kako smanjenje volumena likvora u subarahnoidnom prostoru dovodi do filtracije tekućine iz krvne cirkulacije u intersticij odakle se nakupljeni  $A\beta 1-42$  potom ispire prema cerebrospinalnoj tekućini.

## 5.5. Korelacije između sociodemografskih i kliničkih parametara s promjenama volumena cerebrospinalne tekućine

Spearmanov koeficijent korelacije ( $\rho$ ,  $r_s$ ) ili korelacija ranga izračunava se kad jedan od skupa podataka slijedi ordinalnu ljestvicu ili kad raspodjela podataka značajno odstupa od normalne raspodjele (engl. outliers). Za razliku od Pearsonovog koeficijenta koji podrazumijeva linearnu povezanost, za Spearmanov koeficijent korelacije to nije uvjet, a može se računati i na manjim uzorcima ( $N < 35$ ). U slučaju dobivenog  $r_s = 0$  može se zaključiti da povezanosti među varijablama zaista nema. Ukoliko je koeficijent korelacije značajan obzirom na postavljenu granicu značajnosti (uobičajeno  $P < 0,05$ ), zaključujemo da je koeficijent korelacije značajan i da se smije tumačiti. Prilikom tumačenja vrijednosti koeficijenta korelacije vrijede pravila: vrijednosti  $r$  od 0 do 0,25 ili od 0 do  $-0,25$  upućuju kako nema povezanosti, dok vrijednosti  $r$  od 0,25 do 0,50 ili od  $-0,25$  do  $-0,50$  upućuju na slabu povezanost među varijablama. Vrijednosti  $r$  od 0,50 do 0,75 ili od  $-0,50$  do  $-0,75$  upućuju na umjerenu do dobru povezanost, te vrijednosti  $r$  od 0,75 do 1 ili od  $-0,75$  do  $-1$  upućuju na vrlo dobru do izvrsnu povezanost među varijablama (126).

Vrlo dobra korelacija postoji između rezultata mini-mental testa prije i nakon drenaže. Dobra negativna korelacija je vidljiva i usporedbom varijabli JNPHS skora nakon drenaže te mini mental test skora nakon drenaže. Vrlo dobra korelacija postoji i između volumena cerebrospinalne tekućine u komorama nakon ELD-a te ukupnog intrakranijskog volumena CST-a nakon drenaže, ali i s volumenima cerebrospinalne tekućine u spinalnom prostoru prije i nakon drenaže. Obzirom da većina intrakranijskog CST-a otpada na volumen CST-a u moždanim komorama, logična je korelacija navedenih rezultata. Postoji i izvrsna korelacija intrakranijskog volumena CST- a nakon testiranja ELD-om sa spinalnim volumenima prije i nakon testiranja. Dobra negativna korelacija je između dobi pacijenta te volumena CST-a u spinalnom prostoru prije i nakon drenaže, što znači da se s dobi smanjuje volumen CST-a u spinalnom prostoru (Tablica 5.9.).

**Tablica 5.9.** Korelacije između dobi, kliničkog skora i volumena cerebrospinalne tekućine- Spearman-ova korelacija rangova; \* statistički značajno; MMSE<sup>1</sup> – mini-mental test (engl. Mini-mental state examination) prije postavljanja test drenaže; MMSE<sup>2</sup> mini-mental test (engl. Mini-mental state examination) nakon postavljanja test drenaže; JNPH<sup>1</sup> - Japanska ljestvica procjene normotenzivnog hidrocefalusa (engl. Japan Normal-Pressure Hydrocephalus Grading Scale) prije postavljanja test drenaže; JNPH<sup>2</sup> - Japanska ljestvica procjene normotenzivnog hidrocefalusa (engl. Japan Normal-Pressure Hydrocephalus Scale) nakon postavljanja test drenaže; Ven<sup>1</sup> – volumen ventrikularnog sustava prije postavljanja test drenaže; Ven<sup>2</sup> – volumen ventrikularnog sustava nakon postavljanja test drenaže; Sah<sup>1</sup> – volumen subarahnoidnog prostora prije postavljanja test drenaže; Sah<sup>2</sup> – volumen subarahnoidnog prostora nakon postavljanja test drenaže; kCSTv<sup>1</sup> – intrakranijski volumen cerebrospinalne tekućine prije postavljanja test drenaže; kCSTv<sup>2</sup> – intrakranijski volumen cerebrospinalne tekućine nakon postavljanja test drenaže; sCSTv<sup>1</sup> – intraspinalni volumen cerebrospinalne tekućine prije postavljanja test drenaže; sCSTv<sup>2</sup> – intraspinalni volumen cerebrospinalne tekućine nakon postavljanja test drenaže; uCSTv<sup>1</sup> – ukupni kraniospinalni volumen cerebrospinalne tekućine prije postavljanja test drenaže; uCSTv<sup>2</sup> – ukupni kraniospinalni volumen cerebrospinalne tekućine nakon postavljanja test drenaže.

		MMSE <sup>1</sup>	MMSE <sup>2</sup>	JNPH <sup>1</sup>	JNPH <sup>2</sup>	dob	Ven <sup>1</sup>	Ven <sup>2</sup>	Sah <sup>1</sup>	Sah <sup>2</sup>	kCSTv <sup>1</sup>	kCSTv <sup>2</sup>	sCSTv <sup>1</sup>	sCSTv <sup>2</sup>	uCSTv <sup>1</sup>	uCSTv <sup>2</sup>
MMSE <sup>1</sup>	ρ	1.000	.854*	-0.183	-0.377	-0.082	-0.063	0.337	0.269	0.403	0.082	0.373	0.073	0.299	-0.031	0.261
	P		0.000	0.439	0.101	0.731	0.809	0.219	0.297	0.137	0.754	0.170	0.779	0.279	0.906	0.348
MMSE <sup>2</sup>	ρ	.854*	1.000	-0.305	-.604*	-0.126	-0.124	0.127	0.047	0.251	-0.056	0.122	0.075	0.134	-0.309	0.056
	P		0.000	0.191	0.005	0.596	0.637	0.652	0.857	0.367	0.830	0.666	0.775	0.633	0.227	0.842
JNPH <sup>1</sup>	ρ	-0.183	-0.305	1.000	.622*	-0.111	0.385	0.452	0.129	-0.060	0.369	0.443	0.264	0.428	.507*	.515*
	P	0.439	0.191		0.003	0.641	0.128	0.091	0.622	0.833	0.145	0.098	0.305	0.112	0.038	0.049
JNPH <sup>2</sup>	ρ	-0.377	-.604*	.622*	1.000	0.179	0.073	-0.071	0.139	0.067	0.156	0.004	-0.295	-0.193	.650*	0.454
	P	0.101	0.005	0.003		0.450	0.780	0.802	0.596	0.813	0.549	0.990	0.251	0.490	0.005	0.089
dob	ρ	-0.082	-0.126	-0.111	0.179	1.000	-.616*	-0.450	-0.356	-0.396	-.591*	-0.493	-.557*	-.525*	-0.055	0.016
	P	0.731	0.596	0.641	0.450		0.008	0.093	0.160	0.144	0.012	0.062	0.020	0.044	0.833	0.955
Ven <sup>1</sup>	ρ	-0.063	-0.124	0.385	0.073	-.616*	1.000	.614*	0.294	0.171	.914*	.614*	.650*	.611*	.554*	0.318
	P	0.809	0.637	0.128	0.780	0.008		0.015	0.252	0.541	0.000	0.015	0.005	0.016	0.021	0.248
Ven <sup>2</sup>	ρ	0.337	0.127	0.452	-0.071	-0.450	.614*	1.000	0.446	0.421	.679*	.964*	.886*	.914*	0.082	0.414
	P	0.219	0.652	0.091	0.802	0.093	0.015		0.095	0.118	0.005	0.000	0.000	0.000	0.771	0.125
Sah <sup>1</sup>	ρ	0.269	0.047	0.129	0.139	-0.356	0.294	0.446	1.000	.911*	.586*	.643*	0.402	0.439	0.064	-0.079
	P	0.297	0.857	0.622	0.596	0.160	0.252	0.095		0.000	0.013	0.010	0.110	0.101	0.808	0.781
Sah <sup>2</sup>	ρ	0.403	0.251	-0.060	0.067	-0.396	0.171	0.421	.911*	1.000	.543*	.600*	0.318	0.307	-0.064	0.111
	P	0.137	0.367	0.833	0.813	0.144	0.541	0.118	0.000		0.037	0.018	0.248	0.265	0.820	0.694
kCSTv <sup>1</sup>	ρ	0.082	-0.056	0.369	0.156	-.591*	.914*	.679*	.586*	.543*	1.000	.779*	.672*	.657*	.510*	0.314
	P	0.754	0.830	0.145	0.549	0.012	0.000	0.005	0.013	0.037		0.001	0.003	0.008	0.037	0.254
kCSTv <sup>2</sup>	ρ	0.373	0.122	0.443	0.004	-0.493	.614*	.964*	.643*	.600*	.779*	1.000	.879*	.896*	0.118	0.368
	P	0.170	0.666	0.098	0.990	0.062	0.015	0.000	0.010	0.018	0.001		0.000	0.000	0.676	0.177
sCSTv <sup>1</sup>	ρ	0.073	0.075	0.264	-0.295	-.557*	.650*	.886*	0.402	0.318	.672*	.879*	1.000	.993*	-0.130	0.100
	P	0.779	0.775	0.305	0.251	0.020	0.005	0.000	0.110	0.248	0.003	0.000		0.000	0.619	0.723
sCSTv <sup>2</sup>	ρ	0.299	0.134	0.428	-0.193	-.525*	.611*	.914*	0.439	0.307	.657*	.896*	.993*	1.000	-0.061	0.125
	P	0.279	0.633	0.112	0.490	0.044	0.016	0.000	0.101	0.265	0.008	0.000	0.000		0.830	0.657
uCSTv <sup>1</sup>	ρ	-0.031	-0.309	.507*	.650*	-0.055	.554*	0.082	0.064	-0.064	.510*	0.118	-0.130	-0.061	1.000	.604*
	P	0.906	0.227	0.038	0.005	0.833	0.021	0.771	0.808	0.820	0.037	0.676	0.619	0.830		0.017
uCSTv <sup>2</sup>	ρ	0.261	0.056	.515*	0.454	0.016	0.318	0.414	-0.079	0.111	0.314	0.368	0.100	0.125	.604*	1.000
	P	0.348	0.842	0.049	0.089	0.955	0.248	0.125	0.781	0.694	0.254	0.177	0.723	0.657	0.017	

## 6. RASPRAVA

Patofiziologija normotenzivnog hidrocefalusa nije razjašnjena pa je stoga i klasifikacija posebnih oblika te bolesti složena (idiopatski normotenzivni hidrocefalus - iNPH, te stečeni oblici: kongenitalni i sekundarno stečeni oblici –Slika 1.4.). Idiopatski normotenzivni hidrocefalus (tzv. „izlječivi oblik demencije“) zbog mnogih sličnih zajedničkih radioloških i kliničkih karakteristika teško je razlikovati od drugih neurodegenerativnih bolesti. Iako su opisane mnoge dijagnostičke procedure koje povećavaju vjerojatnost odabira prikladnog bolesnika sa sumnjom na iNPH za operaciju i postavljanje drenaže (ventrikuloperitonealne ili lumboperitonealne), jasni kriteriji još uvijek nisu uspostavljeni.

Značajno kliničko poboljšanje nakon jedne i/ili nekoliko lumbalnih punkcija (127-131), ili nakon kontinuirane vanjske lumbalne drenaže CST-a (129,132,133) je najvažniji čimbenik u predviđanju dobrog kliničkog ishoda. Prema dostupnim podacima iz literature derivacija likvora daje pozitivan odgovor u svega 50-70% bolesnika (134). Unatoč postojanju međunarodnih smjernica ne postoje jedinstveni načini dijagnosticiranja i liječenja, a to je vjerojatno dobrim dijelom uzrokovano nedovoljnim poznavanjem patofiziologije CST-a.

Koliko CST-a unutar kraniospinalnog prostora ima u pojedinim razdobljima ljudskog života i koji je normalni raspon volumskih promjena prema kojima bi se trebali orijentirati tijekom drenaža CST-a su pitanja na koja ne postoje odgovori u literaturi. Isto tako nije jasno kako testno izvlačenje CST-a iz lumbalnog prostora može poboljšati stanje unutar kranija (npr. popraviti perfuziju mozga, otkloniti toksične metabolite i sl.). Postavlja se pitanje do kakvih promjena u tlaku unutar kranija i promjena u sastavu CST-a dovodi uklanjanje određenog volumena CST-a iz lumbalnog prostora.

Nova istraživanja fiziologije i patofiziologije likvora ukazuju kako su volumen, tlak i gibanje CST-a regulirani na drugačiji način nego se to do sada mislilo, kako ti parametri ovise o disbalansu između stvaranja i apsorpcije CST-a. Budući da prilikom testnih drenažnih procedura nisu sustavno praćeni parametri kao što su promjene volumena i tlaka CST-a, te promjene koncentracije biomarkera koji bi mogli biti ključni u odabiru bolesnika za operativni zahvat i potencijalno razumijevanje patofiziologije NPH, mi smo u našem istraživanju nastojali te parametre posebno analizirati.

## 6.1. Značenje volumetrije kranijaskog i spinalnog prostora za bolesnike s NPH-om

MR volumetrija intrakranijskog prostora koristi se u kliničkoj praksi za razlikovanje bolesnika s normotenzivnim hidrocefalusom od zdravih pojedinaca i onih s opstruktivnim hidrocefalusom, moždanom atrofijom, cerebrovaskularnom bolešću, vaskularnom demencijom ili Alzheimerovom demencijom (135-137). U literaturi se navodi kako je ukupni volumen CST-a u novorođenčadi između 40 i 60 ml, u starije djece od 60 do 100 ml, a u odraslih osoba oko 150 ml (138-140). Prosječan volumen moždanih komora kod odraslih zdravih osoba je oko 25 ml.

U našoj grupi bolesnika s NPH-om prosječni intrakranijski volumen CST-a bio je 366,5 ml (medijan 357,5 ml, raspon 262,7-522,5 ml) (Tablica 5.3., Slika 5.2.), što je za očekivati u odnosu na zdrave osobe. Prosječni volumen mozgovine bio je 1139 ml, te je taj volumen porastao na prosječno 1150,4 ml nakon trodnevne lumbalne drenaže gdje je prosječno izvučeno 776,2 ml (medijan 770 ml, raspon 570-982 ml), a kontrolni MR-ovi su snimani u razdoblju od 30 min nakon zaustavljanja drenaže (Tablica 5.3., Slika 5.2.). Ovaj porast volumena mozgovine od prosječno 11 ml donekle se može objasniti smanjenjem intrakranijskog volumena CST-a (smanjenje prosječno 16 ml) koji se dogodio ubrzo nakon drenaže.

Ako se posebno analiziraju volumeni u bolesnika koji su imali pozitivan odgovor u odnosu na one koji to nisu, uočavamo kako je kod bolesnika s pozitivnim odgovorom prosječni volumen CST-a u intrakranijskom prostoru bio za 60 ml veći (zbog veće varijabilnosti volumena nije bilo statističke razlike) (Tablica 5.4., Slika 5.3.). Ti naši rezultati su u skladu s najnovijim opažanjima (141) koji ukazuju kako NPH bolesnici s većim volumenom likvora vjerojatno imaju bitno smanjene kompenzacijske mogućnosti kraniospinalnog prostora (engl. decreased compliance). Dakle, smanjenje volumena CST-a drenažom bi kod njih povećalo kompenzacijske kapacitete i omogućilo bolju prokrvljenost mozgovine, te popravljajući kliničkog statusa što je prikazano u novijim studijama koje su koristile neinvazivne MR metode (142,143).

Prosječni volumen moždanih komora kod naših bolesnika bio je 179,5 ml (medijan 166,4 ml, raspon 77,7-286,3 ml) (Tablica 5.3., Slika 5.2.) što jasno ukazuje kako je kod bolesnika sa sumnjom na NPH došlo do povećanja volumena komora oko 150 ml u odnosu na prosječni normalni volumen od 25-30 ml (138-140,144) kojeg nalazimo kod zdravih pojedinaca. No, nakon trodnevne testne drenaže u kojoj je prosječno izvučeno 776,2 ml iz

lumbalnog prostora uočeno je kako u bolesnika dolazi do prosječno malog smanjenja volumena komora od oko 2 ml (medijan 15 ml) (Tablica 5.3., Slika 5.2.). Isto tako usporedbom volumena komora nismo našli nikakve statističke razlike između grupe koja je imala pozitivan odgovor u odnosu na one koji nisu (Tablica 5.4., Slika 5.3.).

Početni prosječni volumen CST-a u kranijском subarahnoidnom prostoru u našoj grupi NPH bolesnika je iznosio 187 ml (medijan 173,8, raspon 123-333,1) (Tablica 5.3., Slika 5.2.). Ranije publicirani rezultati na bolesnicima s idiopatskom intrakranijskom hipertenzijom su pokazali da je volumen CST-a u kranijском subarahnoidnom prostoru prosječno iznosio 164 ml (145). CST iz intrakranijskog subarahnoidnog prostora je u izravnom kontaktu s likvorom u spinalnom subarahnoidnom prostoru koji je važan kompenzacijski prostor (141,146). Do sada je svega nekoliko studija analiziralo varijabilnost volumena likvora u spinalnom subarahnoidnom prostoru (141, 145-149). Kod naših NPH bolesnika prosječni volumen likvora u spinalnom subarahnoidnom prostoru bio je 100 ml (medijan 95,8 ml, raspon 72,9-151,9 ml) (Tablica 5.3., Slika 5.2.). U našem istraživanju, te studiji Kudelića i sur. (141) (prosječni volumen 114 ml) volumen CST-a u spinalnom prostoru je bio nešto veći nego u drugim studijama na zdravim osobama i bolesnicima s benignom intrakranijskom hipertenzijom gdje je prosječno iznosio oko 80 ml (145).

Rezultati ukazuju kako je početni ukupni intrakranijski (za 55ml), te ukupni kraniospinalni volumen CST-a bio veći za prosječno 44 ml u grupi ispitanika koja je imala pozitivan odgovor na drenažu, što bi ukazivalo kako je kod njih kraniospinalni kompenzacijski kapacitet pred iscrpljenjem (engl. decreased craniospinal compliance). Nakon trodnevne lumbalne drenaže došlo je do uočljive promjene kraniospinalnog volumena CST-a u obje skupine bolesnika i to za prosječno 29 ml, a usporedbom medijana razlika je izraženija za grupu pacijenata s pozitivnim odgovorom, no bez statističke značajnosti. (Tablica 5.4., Slika 5.3.)

Analiza svih ovih podataka ukazuje da je ukupni volumen cerebrospinalne tekućine veći od 400 ml što je znatno veći volumen od onoga koji se navodi u svim udžbenicima iz neurologije, neurokirurgije, anestezije, fiziologije i drugih medicinskih struka. Naime, do nedavno se smatralo da je ukupni volumen cerebrospinalne tekućine u zdravih pojedinaca 125-150 ml od čega se polovica nalazi u intrakranijskom, a polovica u spinalnom prostoru (10, 144-149). Točnih podataka o volumenima cerebrospinalne tekućine u bolesnika sa normotenzivnim hidrocefalusom do nedavno nije uopće bilo, a pojavom volumetrijskih metoda u literaturi se javljaju samo podaci o intrakranijskom, ali ne i o spinalnom volumenu. Kod bolesnika s normotenzivnim hidrocefalusom, osim proširenog komornog sustava, u pravilu su očuvane normalne anatomske karakteristike kraniospinalnog prostora. Statističkom obradom

anatomskih dimenzija i kranijaskog i spinalnog prostora, te volumena pojedinih komponenti koje ti prostori zauzimaju nije utvrđena statistički značajna povezanost između dužine spinalnog kanala i volumena spinalne cerebrospinalne tekućine (141) što ukazuje da se volumen cerebrospinalne tekućine u spinalnom prostoru može značajno mijenjati.

Praćenjem intrakranijskih promjena volumena u razdoblju 30 min, 4 h i 24 h nakon tap testa (150) uočeno je kako se volumen CST-a nakon izraženijih akutnih promjena vraća prema ranijim vrijednostima te je na kraju učinak tap testa minimalan kako na volumen mozgovine (porast 0,2%) tako i na smanjenje volumena komora (svega nekoliko ml). Slična zapažanja su bila vezana i za volumske promjene nakon trodnevne lumbalne drenaže (151). Ovaj naknadni porast volumena likvora pokušava se objasniti sekrecijom likvora.

Promjene volumena u kraniospinalnom prostoru praćene su nakon lumbalne punkcije kod bolesnika s benignom intrakranijskom hipertenzijom i uočeno je kako se promjene volumena likvora (smanjenje) odvija dominantno u spinalnom subarahnoidnom prostoru odakle je volumen likvora i bio izvučen (145). Iako je bilo izvučeno 15-20 ml likvora lumbalnom punkcijom i došlo do pada tlaka za 17 cm H<sub>2</sub>O, volumen likvora se smanjio za prosječno 7 ml. Autori smatraju kako je ova razlika posljedica povećanog stvaranja likvora (u praćenom razdoblju procijenjeno je kako se likvor stvarao značajno brže od normale i to brzinom od oko 0,4 ml/min) (145).

Čini se kako u bolesnika s NPH-om taj volumen bude u početku veći u onih s pozitivnim odgovorom na testnu drenažu, u odnosu na one s negativnim odgovorom. Tako je u ranijoj studiji (141) u onih bolesnika kojima je nakon produžene vanjske lumbalne drenaže indicirana operacija, izmjeren veći volumen spinalne cerebrospinalne tekućine ( $120,5 \pm 14,9$  ml) za razliku od neoperiranih bolesnika ( $103,1 \pm 27,4$  ml). To je istraživanje po prvi puta pokazalo da bi volumen spinalnog likvora mogao imati prediktivnu vrijednost u selekciji bolesnika s normotenzivnim hidrocefalusom za operacijsko liječenje. U našem istraživanju nismo uočili da bolesnici s pozitivnim odgovorom imaju prosječno veći spinalni volumen, nego imaju prosječno veći ukupni kraniospinalni volumen CST-a.

Za razliku od intrakranijskog prostora, zbog elastičnosti duralne vreće u spinalnom kanalu te činjenice da je ona samo dijelom fiksirana za koštanu stijenu spinalnog kanala, promjene volumena cerebrospinalne tekućine u spinalnom prostoru su itekako moguće i vjerojatno imaju ključnu ulogu u regulaciji intrakranijskog tlaka, te predstavljaju ključni kompenzacijski odjeljak unutar ukupnog kraniospinalnog prostora. To je nedavno pokazano u istraživanju na životinjama gdje su relativno male promjene (oduzimanje ili dodavanje 100  $\mu$ l

likvora) u spinalnom prostoru uzrokovale statistički značajne promjene (porast ili pad) intrakranijskog tlaka (146).

## **6.2. Promjene tlakova cerebrospinalne tekućine tijekom dijagnostičke procedure**

Naši bolesnici su pri lumbalnoj punkciji imali normalne vrijednosti tlaka CST-a koje su se kretale od 2 do 11 cm H<sub>2</sub>O što je bilo nužno jer je to jedan od kriterija za vjerojatni NPH. Mnoge studije su pokazale kako nakon drenaže određenog volumena likvora iz spinalnog subarahnoidnog prostora dolazi do značajnog pada tlaka (141,145). U studiji na NPH bolesnicima smanjenje volumena cerebrospinalne tekućine lumbalnom punkcijom za 15 ml dovodi do dodatnog spuštanja „nule“ hidrostatskog tlaka za prosječno 8,5 cm H<sub>2</sub>O što ukazuje da tlak cerebrospinalne tekućine direktno ovisi o njezinom volumenu te da volumen cerebrospinalne tekućine u spinalnom prostoru ima velik utjecaj na visinu tlaka (141).

U našoj studiji smo pratili promjene tlaka svakih sat vremena kroz 72 sata trajanja produžene lumbalne drenaže. Uočeno je kako je tlak CST-a prosječno varirao između 4-6 cm H<sub>2</sub>O (Slika 5.4.) uz dinamiku izvlačenja volumena CST-a od prosječno 10 ml/h.

Kad se usporede rezultati bolesnika s pozitivnim odgovorom u odnosu na one s negativnim kliničkim odgovorom uočava se kako bolesnici s pozitivnim kliničkim odgovorom imaju niže srednje vrijednosti tlaka, te imaju manje oscilacije tlaka (Slike 5.5., 5.6. i 5.7.). Suprotno tome, u ispitanika sa negativnim kliničkim odgovorom promjene tlaka CST-a su bile izraženije tj. postojala su razdoblja s jako negativnim i jako pozitivnim tlakovima (Slike 5.5., 5.6. i 5.8.). Iako je u grupi s negativnim testom tijekom drenaže prosječno izdrenirano više ml CST-a ta grupa je paradoksalno imala i puno veće maksimalne vrijednosti tlaka čak i preko 20 cm H<sub>2</sub>O. Ovo dodatno ukazuje kako su mogućnosti regulacije tlaka i povezanost visine tlaka s promjenama volumena CST znatno smanjene u bolesnika s negativnim kliničkim odgovorom.



### **6.3. Povezanost promjena volumena i tlakova CST-a s promjenama koncentracije biomarkera**

Idiopatski normotenzivni hidrocefalus je neurodegenerativna bolest koja se učestalije javlja u gerijatrijskoj populaciji, a karakteriziraju ju biokemijske promjene u cerebrospinalnoj tekućini koje reflektiraju metaboličke promjene mozga. Leinonen i sur. su pokazali kako u bolesnika sa suspektnim NPH-om prisutnost amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića u biopsijskim uzorcima korelira s kasnijih razvojem Alzheimerove demencije, gdje je čak 22% pacijenta kroz razdoblje od 4,4 godine razvilo AD (152). Kako bismo razlučili pacijente koji će pokazati kliničko poboljšanje nakon postavljanja trajne drenaže od onih koji „imitiraju“ simptome iNPH-a, iako je podloga njihove kliničke slike druga neurodegenerativna bolest, koriste se biomarkeri u cerebrospinalnoj tekućini koji mogu razdvojiti navedene patologije. Najistraživaniji biomarkerski profil je onaj AD-a kojeg karakterizira povišena koncentracija ukupnog i fosforiliranog tau proteina, te snižena koncentracija amiloidnog peptida A $\beta$ 1-42 (96). Stoga je i u pacijenta s idiopatskim normotenzivnim hidrocefalusom najistraživaniji upravo navedeni biomarkerski profil. Meta-analiza 13 studija (114, 117, 153-163) kojom se pokušalo odgovoriti na pitanje koji biomarkerski profil korelira s pozitivnim odgovorom na drenažu pokazala je da je u pacijenta koji imaju pozitivan klinički odgovor na drenažu koncentracija ukupnog te fosforiliranog tau proteina u lumbalnom CST-u niža od pacijenta koji nemaju kliničko poboljšanje, dok se vrijednosti A $\beta$ 1-42 nisu značajno razlikovale (164). Međutim i tu postoje jasna ograničenja za generalizaciju rezultata: razlike u testovima koji su korišteni za analizu u različitim laboratorijima, metodološke slabosti studija (vremenski intervali uzimanja uzoraka i volumeni uzetih uzoraka CST-a su jako varirali od studije do studije), te mali broj studija koje su uključene za analizu biomarkera A $\beta$ 1-42.

Većina objavljenih studija nije provodila longitudinalno praćenje koncentracija biomarkera, već su određivale koncentracije u jednoj vremenskoj točki. Naši rezultati pokazuju promjene u tri vremenske točke (0 h, 36 h, 72 h) tijekom drenaže CST-a putem vanjske lumbalne drenaže. Kad analiziramo vrijednosti biomarkera amiloida obzirom na ishod testa, vidimo da je u bolesnika koji su imali kliničko poboljšanje nakon lumbalne drenaže viša koncentracija izoforme A $\beta$ 1-42 u svim vremenskim točkama u odnosu na grupu koja nije imala kliničko

poboljšanje, dok je statistički značajna razlika samo nakon 72 h što je suprotno od dosadašnjih istraživanja. Pojava većih koncentracija ovog biomarkera ukazuje kako taj biomarker pojačano pristiže iz tkiva SŽS-a. Naime, kod smanjenja volumena likvora i tlaka do kojeg dolazi radi izvlačenja CST-a iz sustava, za očekivati je da će pod gradijenom hidrostatskog tlaka koji se stvori između krvi i intersticijske tekućine doći do ulaska vode iz krvi u intersticij što bi dovelo do „ispiranja“ sadržaja iz intersticijskog prostora i dolaska biomarkera u CST sustav koji s intersticijem normalno komunicira (25).

Trend viših vrijednosti u grupi koja nije imala kliničko poboljšanje (non-responders) na vanjsku lumbalnu drenažu vidljiv je za biomarkere ukupni tau protein te amiloid  $A\beta$ 1-40 u svim vremenskim točkama, no bez statističke značajnosti. U pozitivnoj grupi (responders) vidljivo je da nakon 72 h koncentracije ukupnog tau proteina padaju, što bi ukazivalo da nakon početnog „ispiranja“ markera karakterističnog za neurodegeneraciju, njegova se koncentracija u pacijenata bez AD komorbiditeta smanjuje u lumbalnom uzorku CST-a. Isto tako vidljiv je trend viših vrijednosti biomarkera fosforiliranog Tau proteina (pT181) na taurinskom mjestu 181 u pozitivnoj grupi bolesnika u svim vremenskim točkama, no međutim bez statistički značajne razlike, što je u suprotnosti s ranije navedenim studijama.

Obzirom da je u pacijenta s AD amiloidni peptid  $A\beta$ 1-42 vezan u amiloidne plakove, njegova koncentracija u cerebrospinalnoj tekućini je smanjena, dok je u bolesnika s iNPH-om koncentracija peptida  $A\beta$ 1-42 veća u odnosu na pacijente s AD, no nešto niža u odnosu na zdravu populaciju (105). Tarnaris i sur. su pokazali na malom broju pacijenta (ukupno 11) sa suspektnim NPH-om da tijekom ELD-a dolazi do povećanja koncentracije  $A\beta$ 1-42 te ukupnog tau proteina tijekom 72 h evakuacije CST-a (165). Jingami i sur. su pokazali kako tijekom tap-testa postoje razlike u koncentraciji biomarkera ako se uspoređuje prvi i zadnji mililitar CST-a, uz povišenu koncentraciju ukupnog tau proteina u zadnjem mililitru, dok su vrijednosti  $A\beta$ 1-42 u zadnjem mililitru smanjene (166). Taj fenomen je već davno opisan u našem laboratoriju (24). Naime, pojedine tvari u lumbalnom likvoru, čije je porijeklo iz tkiva SŽS-a, imaju koncentracijski gradijent u CST-u, tako da je radi usporedbi rezultata raznih studija izuzetno važno precizno navesti u kojem je dijelu uzorka CST-a mjerenje izvršeno.

Obzirom da je količina drenirane cerebrospinalne tekućine u ranije navedenoj studiji bila 30 ml (166), rezultati se ne mogu uspoređivati s našim rezultatima gdje je količina dreniranog likvora prosječno iznosila 770 ml što je značajno veća količina. Još je jedna longitudinalna studija, koja je pratila koncentracije biomarkera u lumbalnom i ventrikularnom prostoru kroz vrijeme, pokazala da u bolesnika s vjerojatnim iNPH-om i negativnom  $A\beta$

biopsijom mozga, koncentracija A $\beta$ 1-42 divergira prema pozitivnijim vrijednostima u usporedbi s bolesnicima s iNPH-om i pozitivnom A $\beta$  biopsijom mozga, osobito nakon duljeg vremenskog razdoblja. To bi ukazivalo da je u bolesnika s dijagnozom vjerojatnog iNPH-a, viša vrijednost biomarkera A $\beta$ 1-42 najbolji negativan prediktor podležeće AD (167). Navedeno bi govorilo u prilog boljeg kliničkog odgovora na trajnu drenažu u NPH bolesnika s višim vrijednostima A $\beta$ 1-42 izoforme u lumbalnom CST-u.

## 7. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata dobivenih u ovom istraživanju na bolesnicima s NPH-om možemo zaključiti sljedeće:

- 1) Naše istraživanje predstavlja prvu studiju u kojoj je kod iste osobe izmjeren ukupni kranijjski i spinalni volumen CST-a i to prije i nakon produžene lumbalne drenaže.
- 2) MR volumetrijom u 20 bolesnika sa sumnjom na NPH uočeno je kako volumen CST-a u kraniju čini oko 20% ukupnog intrakranijskog volumena, te da je taj volumen veći u bolesnika koji imaju pozitivan klinički odgovor na produženu lumbalnu drenažu za prosječno 55 ml. Osim toga, rezultati ukazuju kako je početni ukupni kraniospinalni volumen CST-a bio veći za prosječno 44 ml u grupi ispitanika koja je imala pozitivan odgovor na drenažu. To bi ukazivalo kako je kod njih kraniospinalni kompenzacijski kapacitet pred iscrpljenjem (engl. decreased craniospinal compliance).
- 3) Volumen likvora u spinalnom prostoru iznosi oko 100 ml.
- 4) Zbroj ukupnog volumena CST-a u kraniju i u spinalnom prostoru ukazuje da taj volumen iznosi oko 466 ml u odraslih osoba što je znatno više nego se to do sada mislilo čak i kad se umanjuje volumen za 150 ml što predstavlja prosječno povećanje komora kod NPH bolesnika.
- 5) Tlakovi CST-a tijekom drenaže općenito padaju u odnosu na početne vrijednosti u prvih desetak sati no kasnije prosječno osciliraju između 4 i 8 cm H<sub>2</sub>O.
- 6) Sposobnost regulacije tlaka CST-a i povezanost visine tlaka s promjenama volumena CST-a znatno su smanjene u bolesnika s negativnim kliničkim odgovorom.
- 7) Promjene koncentracije biomarkera ukazuju kako postupni porast koncentracije A $\beta$ 1-42 koji se događa tijekom trodnevne drenaže CST-a predstavlja mogući pozitivni prognostički čimbenik za postavljanje trajne CST drenaže u bolesnika s NPH-om.
- 8) Ukupni rezultati ovog istraživanja su u skladu sa novom hipotezom hidrodinamike cerebrospinalne tekućine prema kojoj likvorski tlak ne ovisi o sekreciji, cirkulaciji i apsorpciji likvora, nego se volumen i tlak CST-a reguliraju na razini kapilarne mreže i posljedica su razlike hidrostatskih i osmotskih tlakova između krvi, intersticijske i cerebrospinalne tekućine.

## 8. SAŽETAK

Patofiziologija normotenzivnog hidrocefalusa (NPH) nije jasna, te se danas ispituju razni prognostički čimbenici na osnovu kojih bi se mogli odabrati bolesnici za operacijsko liječenje. Cilj ovog istraživanja je bio ispitati po prvi put da li promjene kranijuskog i spinalnog volumena cerebrospinalne tekućine (CST) mijenjaju intrakranijsku hidrodinamiku i koncentracije biomarkera, te intrakranijski tlak uz poboljšanje kliničkog stanja bolesnika koje opravdava operacijsko postavljanje trajne drenaže. Dvadeset bolesnika s kliničkom i neuroradiološkom sumnjom na NPH su bili podvrgnuti vanjskoj lumbalnoj drenaži tijekom razdoblja od 72 h, uz praćenje promjena koncentracije biomarkera u CST-u i intrakranijskog tlaka, te mjerenje volumena CST-a u kraniospinalnom prostoru prije i nakon drenaže. Kod 10 bolesnika došlo je do kliničkog poboljšanja. Rezultati su pokazali da je sposobnost regulacije tlaka CST-a s promjenama volumena znatno smanjena u bolesnika s negativnim kliničkim odgovorom. MR volumetrijom uočeno je kako volumen CST-a u kraniju čini oko 20% ukupnog intrakranijskog volumena, te da je taj volumen kao i ukupni kraniospinalni volumen veći u bolesnika koji imaju pozitivan klinički odgovor na produženu lumbalnu drenažu. Zbroj ukupnog volumena CST-a u kraniju i u spinalnom prostoru ukazuje da taj volumen iznosi oko 466 ml u odraslih osoba što je znatno više nego se to do sada mislilo čak i kad se umanjuje volumen za 150 ml što predstavlja prosječno povećanje komora kod NPH bolesnika. Promjene koncentracije odabranih biomarkera (amiloid  $\beta$ , ukupni i fosforilirani tau proteini) iz uzoraka CST-a u tri vremenske točke (0, 36 i 72 h) tijekom drenaže povezane su s promjenom kliničkog stanja. Pokazano je kako postupni porast koncentracije A $\beta$ 1-42 koji se događa tijekom trodnevne drenaže CST-a predstavlja mogući pozitivni prognostički čimbenik za postavljanje trajne CST drenaže u bolesnika s NPH-om.

**Ključne riječi:** cerebrospinalna tekućina, normotenzivni hidrocefalus, intrakranijski i spinalni volumen CST-a, intrakranijski tlak, vanjska lumbalna drenaža, biomarkeri u CST-u

## 9. SUMMARY

### **The influence of external lumbar drainage on cerebrospinal fluid pressure and volume, amyloid beta and tau protein concentrations, and on the clinical status of patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus**

**Klara Brgić Mandić, 2024.**

The pathophysiology of normal pressure hydrocephalus (NPH) is not clear, and various prognostic factors are currently being investigated that could facilitate the selection of patients who would benefit from surgical treatment. This research aimed to examine for the first time whether changes in cranial and spinal volume of cerebrospinal fluid (CSF) influence intracranial hydrodynamics and biomarker concentrations, as well as intracranial pressure while improving the patient's clinical condition, which justifies surgical placement of permanent drainage. Twenty patients with clinical and neuroradiological signs of NPH underwent external lumbar drainage during a period of 72 h. During this period we monitored changes in the concentration of biomarkers in the CSF and intracranial pressure, and also measured the volume of CSF in the craniospinal space before and after drainage. Clinical improvement was observed in 10 patients. The results showed that the ability to regulate CSF pressure with volume changes was significantly reduced in patients with negative clinical response. MRI volumetry showed that intracranial CSF accounts for 20% of the total intracranial volume, and that this CSF volume, as well as the total craniospinal volume, is greater in patients who have a positive clinical response (responders) to extended lumbar drainage. The sum of the total volume of the CSF in the cranium and in the spinal space indicates that this volume is about 466 ml in adults, which is significantly higher than previously thought, even when the volume is reduced by 150 ml, which represents the average increase in the ventricles in NPH patients. Changes in the concentration of selected biomarkers (amyloid  $\beta$ , total, and phosphorylated tau proteins) from CSF samples at three-time points (0, 36, and 72 h) during drainage are associated with changes in the clinical condition. The gradual increase in A $\beta$ 1-42 concentration that occurs during the

three-day CSF drainage represents a possible positive prognostic factor for the placement of permanent CSF drainage in patients with NPH.

**Keywords:** cerebrospinal fluid, normal pressure hydrocephalus, intracranial and intraspinal CSF volume, intracranial pressure, external lumbar drainage, CSF biomarkers

## 10. LITERATURA

1. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol Rev.* 2013;93:1847–1892.
2. Hladky SB, Barrand MA. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS.* 2014;11:26.
3. Spector R, Keep RF, Snodgrass RS, Smith QR, Johanson CE. A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. *Exp Neurol.* 2015;267:78–86.
4. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2011;128(6):309-16.
5. Lemieux L, Hammers A, Mackinnon T, Liu RSN. Automatic segmentation of the brain and intracranial cerebrospinal fluid in T1-weighted volume MRI scans of the head, and its application to serial cerebral and intracranial volumetry. *Magn Reson Med.* 2003;49(5):872–84.
6. Brodbelt A, Stoodley M. CSF pathways: a review. *Br J Neurosurg.* 2007;2:510-20.
7. Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2008;5:10.
8. Speake T, Whitwell C, Kajita H, Majid A, Brown PD. Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus. *Microsc Res Tech.* 2001;52(1):49–59.
9. Pollay M. Formation of cerebrospinal fluid. Relation of studies of isolated choroid plexus to the standing gradient hypothesis. *J Neurosurg.* 1975;42(6):665–73.
10. Davson H, Welch K, Segal MB. *Physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid.* Edinburgh: Churchill Livingstone;1987.
11. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology.* 11. izd. Philadelphia: W.B. Saunders;2005.
12. Weed LH. Forces concerned in the absorption of the cerebrospinal fluid. *Am J Physiol Content.* 1935;114(1):40–5.
13. Weed LH. *Studies on Cerebro-Spinal Fluid. No. III : The pathways of escape from the Subarachnoid Spaces with particular reference to the Arachnoid Villi.* *J Med Res.* 1914;31(1):51–91.



14. Pollay M. The function and structure of the cerebrospinal fluid system. *Fluids Barriers CNS*. 2010;7:9
15. Kida S, Pentazis A, Weller RO. Cerebrospinal fluid drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunological significance. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1993;19:480-488.
16. Mollanji R, Bozanovic-Sosic R, Zakharov A, Makarian L, Johnston MG. Blocking cerebrospinal fluid absorption through the cribriform plate increases resting intracranial pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282:1593-1599.
17. Silver I, Li B, Szalai J, Johnston M. Relationship between intracranial pressure and cervical lymphatic pressure and flow rates in sheep. *Am J Physiol*. 1999;277:1712-1717.
18. Dandy WE. Experimental hydrocephalus. *Ann Surg*. 1919;70:129-142.
19. Hassin GB, Oldberg E, Tinsley M. Changes in the brain in plexectomized dogs. With comments on the cerebrospinal fluid. *Arch Neurol Psychiatry*. 1937;38:1224-1239.
20. Milhorat TH. Choroid plexus and cerebrospinal fluid production. *Science*. 1969;166:1514-1516.
21. Orešković D, Klarica M. The formation of cerebrospinal fluid: nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Res Rev*. 2010;64:241-262.
22. Milhorat TH. The third circulation revisited. *J Neurosurg*. 1975;42(6):628-45.
23. Milhorat TH, Hammock MK, Chien T, Davis DA. Normal rate of cerebrospinal fluid formation five years after bilateral choroid plexectomy: Case report. *J Neurosurg*. 1976;44(6):735-9.
24. Bulat M, Klarica M. Recent insights into a new hydrodynamics of the cerebrospinal fluid. *Brain Res Rev*. 2011;65:99-112.
25. Orešković D, Radoš M, Klarica M. New Concepts of Cerebrospinal Fluid Physiology and Development of Hydrocephalus. *Pediatr Neurosurg*. 2017;52(6):417-425.
26. Bering EA Jr. Water exchange of central nervous system and cerebrospinal fluid. *J Neurosurg*. 1952;9:275-287.
27. Bulat M, Lupret V, Orešković D, Klarica M. Transventricular and transpial absorption of cerebrospinal fluid into cerebral microvessels. *Coll Antropol*. 2008;32(1):43-50.
28. Orešković D, Klarica M. The controversy on choroid plexus function in cerebrospinal fluid production in humans: how long different views could be neglected? *Croat Med J*. 2015;56:306-310.
29. DiChiro G. Movement of the cerebrospinal fluid in human beings. *Nature*. 1964;204:290-291.

30. Igarashi H, Tsujita M, Suzuki J, Kwee IL, Nakada T. Inhibition of aquaporin-4 significantly increases regional cerebral blood flow. *Neuroreport*. 2013;24:324-328.
31. Klarica M, Miše B, Vladić A, Radoš M, Orešković D. “Compensated hyperosmolarity” of cerebrospinal fluid and the development of hydrocephalus. *Neuroscience*. 2013;248:278-289.
32. Mase M, Hayashi E, Yamada H, Oshima N, Aoyama K, Hibino S, i sur. Water turnover in brain and ventricles in normal volunteers and patients with idiopathic NPH: dynamic PET study using H215O. 16th International Symposium on Intracranial Pressure and Neuromonitoring, Cambridge, 2016, str. 119-120.
33. Krishnamurthy S, Li J, Schultz L, Jenrow KA. Increased CSF osmolarity reversibly induces hydrocephalus in the normal rat brain. *Fluids Barriers CNS*. 2012;9:13.
34. Krishnamurthy S, Tichnenor MD, Satish AG, Lehmann DB. A proposed role for efflux transporters in the pathogenesis of hydrocephalus. *Croat Med J*. 2014;55:366-376.
35. Yamada S. Cerebrospinal physiology: visualization of cerebrospinal fluid dynamics using the magnetic resonance imaging time-spatial inversion pulse method. *Croat Med J*. 2014;55:337-346.
36. Yamada S, Kelly E. Cerebrospinal fluid dynamics and the pathophysiology of hydrocephalus: new concepts. *Semin Ultrasound CT MRI*. 2016;37:84-91.
37. Klarica M, Radoš M, Erceg G, Petošić A, Jurjević I, Orešković D. The influence of body position on cerebrospinal fluid pressure gradient and movement in cats with normal and impaired craniospinal communication. *PLoS One*. 2014;9(4):e95229. doi: 10.1371/journal.pone.0095229.
38. Lifshutz JI, Johnson WD. History of hydrocephalus and its treatments. *Neurosurg Focus*. 2001;11(2):1–5.
39. Aschoff A, Kremer P, Hashemi B, Kunze S. The scientific history of hydrocephalus and its treatment. *Neurosurg Rev*. 1999;22:67–93;22(2-3):94-5.
40. Adams RD, Fisher CM, Hakim S, Ojemann RG, Sweet WH. Symptomatic Occult Hydrocephalus with Normal Cerebrospinal-Fluid Pressure — A Treatable Syndrome. *N Engl J Med*. 1965;273:117-26.
41. Hakim CA, Hakim R, Hakim S. Normal-pressure hydrocephalus. *Neurosurg Clin N Am*. 2001;12(4):761-73.
42. Tsakanikas D, Relkin N. Normal pressure hydrocephalus. *Semin Neurol*. 2007;27(1):58-65.

43. Marmarou A, Young HF, Aygok GA, Sawauchi S, Tsuji O, Yamamoto T, i sur. Diagnosis and management of idiopathic normal-pressure hydrocephalus: a prospective study in 151 patients. *J Neurosurg.* 2005;102:987–997.
44. Andersson J, Rosell M, Kockum K, Lilja-Lund O, Söderström L, Laurell K. Prevalence of idiopathic normal pressure hydrocephalus: a prospective, population-based study. *PLoS One.* 2019;14: e0217705. doi: 10.1371/journal.pone.0217705.
45. Jaraj D, Rabiei K, Marlow T, Jensen C, Skoog I, Wikkelsø C. Prevalence of idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Neurology.* 2014;82:1449–1454.
46. Hiraoka K, Meguro K, Mori E. Prevalence of idiopathic normal-pressure hydrocephalus in the elderly population of a Japanese rural community. *Neurol Med Chir.* 2008;48:197-200.
47. Iseki C, Kawanami T, Nagasawa H, Wada M, Koyama S, Kikuchi K, i sur. Asymptomatic ventriculomegaly with features of idiopathic normal pressure hydrocephalus on MRI (AVIM) in the elderly: a prospective study in a Japanese population. *J Neurol Sci.* 2009;277:54–57.
48. Iseki C, Takahashi Y, Wada M, Kawanami T, Adachi M, Kato T. Incidence of idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH): a 10-year follow-up study of a rural community in Japan. *J Neurol Sci.* 2014;339:108–112.
49. Nakashita S, Wada-Isue K, Uemura Y, Tanaka K, Yamamoto M, Yamawaki M, i sur. Clinical assessment and prevalence of parkinsonism in Japanese elderly people. *Acta Neurol Scand.* 2016;133: 373–379.
50. Hattingen E, Jurcoane A, Melber J, Blasel S, Zanella FE, Neumann-Haefelin T, i sur. Diffusion tensor imaging in patients with adult chronic idiopathic hydrocephalus. *Neurosurgery.* 2010;66:917–924.
51. Black PM. Idiopathic normal-pressure hydrocephalus. Results of shunting in 62 patients. *J Neurosurg.* 1980;52:371–377.
52. Marmarou A, Bergsneider M, Relkin N, Klinge P, Black PM. Development of guidelines for idiopathic normal-pressure hydrocephalus: introduction. *Neurosurgery.* 2005;57:S1–3;discussion ii-v
53. Miyoshi N, Kazui H, Ogino A, Ishikawa M, Miyake H, Tokunaga H, i sur. Association between cognitive impairment and gait disturbance in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2005;20:71–76.
54. Stolze H, Kuhtz-Buschbeck JP, Drücke H, Jöhnk K, Diercks C, Palmié S, i sur. Gait analysis in idiopathic normal pressure hydrocephalus - which parameters respond to the CSF tap test? *Clin Neurophysiol.* 2000;111:1678–1686.

55. Stolze H, Kuhtz-Buschbeck JP, Drücke H, Jöhnk K, Illert M, Deuschl G. Comparative analysis of the gait disorder of normal pressure hydrocephalus and Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;70:289–297.
56. Williams MA, Thomas G, de Lateur B, Imteyaz H, Rose JG, Shore WS, i sur. Objective assessment of gait in normal-pressure hydrocephalus. *Am J Phys Med Rehabil*. 2008;87:39–45.
57. Iddon JL, Morgan DJ, Loveday C, Sahakian BJ, Pickard JD. Neuropsychological profile of young adults with spina bifida with or without hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75:1112–1118.
58. Boon AJ, Tans JT, Delwel EJ, Egeler-Peerdeman SM, Hanlo PW, Wurzer HA, i sur. Dutch normal-pressure hydrocephalus study: prediction of outcome after shunting by resistance to outflow of cerebrospinal fluid. *J Neurosurg*. 1997;87:687–693.
59. Chaudhry P, Kharkar S, Heidler-Gary J, Hillis AE, Newhart M, Kleinman JT, i sur. Characteristics and reversibility of dementia in normal pressure hydrocephalus. *Behav Neurol*. 2007;18:149–158.
60. Ogino A, Kazui H, Miyoshi N, Hashimoto M, Ohkawa S, Tokunaga H, i sur. Cognitive impairment in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;21:113–119.
61. Thomas G, McGirt MJ, Woodworth G, Heidler J, Rigamonti D, Hillis AE, i sur. Baseline neuropsychological profile and cognitive response to cerebrospinal fluid shunting for idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2005;20:163–168.
62. Hellström P, Edsbacke M, Archer T, Tisell M, Tullberg M, Wikkelsø C. The neuropsychology of patients with clinically diagnosed idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Neurosurgery*. 2007;61: 1219–1226; discussion 1227-1228.
63. Mataró M, Matarín M, Poca MA, Pueyo R, Sahuquillo J, Barrios M, i sur. Functional and magnetic resonance imaging correlates of corpus callosum in normal pressure hydrocephalus before and after shunting. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78:395–398.
64. Del Mar Matarín M, Pueyo R, Poca MA, Falcón C, Mataró M, Bargalló N, i sur. Post-surgical changes in brain metabolism detected by magnetic resonance spectroscopy in normal pressure hydrocephalus: results of a pilot study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78:760–763.
65. Nakayama T, Ouchi Y, Yoshikawa E, Sugihara G, Torizuka T, Tanaka K. Striatal D2 receptor availability after shunting in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J Nucl Med*. 2007;48:1981–1986.

66. Mathew R, Pavithran S, Byju P. Neuropsychiatric manifestations of cognitively advanced idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Dement Geriatr Cogn Dis*. 2018;8:467–475.
67. Yamada S, Ishikawa M, Yamamoto K. Optimal diagnostic indices for idiopathic normal pressure hydrocephalus based on the 3D quantitative volumetric analysis for the cerebral ventricle and subarachnoid space. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36:2262–2269.
68. Kitagaki H, Mori E, Ishii K, Yamaji S, Hirono N, Imamura T. CSF spaces in idiopathic normal pressure hydrocephalus: morphology and volumetry. *Am J Neuroradiol*. 1998;19:1277–1284.
69. Sasaki M, Honda S, Yuasa T, Iwamura A, Shibata E, Ohba H. Narrow CSF space at high convexity and high midline areas in idiopathic normal pressure hydrocephalus detected by axial and coronal MRI. *Neuroradiology*. 2008;50:117–122.
70. Ishii K, Kawaguchi T, Shimada K, Ohkawa S, Miyamoto N, Kanda T, i sur. Voxel-based analysis of gray matter and CSF space in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008;25:329–335.
71. Yamashita F, Sasaki M, Takahashi S, Matsuda H, Kudo K, Narumi S, i sur. Detection of changes in cerebrospinal fluid space in idiopathic normal pressure hydrocephalus using voxel-based morphometry. *Neuroradiology*. 2010;52:381–386.
72. Lee WJ, Wang SJ, Hsu LC, Lirng JF, Wu CH, Fuh JL. Brain MRI as a predictor of CSF tap test response in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J Neurol*. 2010;257:1675–1681.
73. Hashimoto M, Ishikawa M, Mori E, Kuwana N. Study of INPH on neurological improvement (SINPHONI): Diagnosis of idiopathic normal pressure hydrocephalus is supported by MRI-based scheme: a prospective cohort study. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2010;7:18.
74. Matsuoka T, Akakabe M, Iida JI, Kawahara M, Uchiyama Y. Changes in cognitive function scores after cerebrospinal fluid tap testing in patients with suspected idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Cogn Behav Neurol*. 2018;31:201–206.
75. Kazui H, Miyajima M, Mori E, Ishikawa M. SINPHONI-2 Investigators: Lumboperitoneal shunt surgery for idiopathic normal pressure hydrocephalus (SINPHONI-2): an open-label randomised trial. *Lancet Neurol*. 2015;14:585–594.
76. Miyajima M, Kazui H, Mori E, Ishikawa M. On behalf of the SINPHONI-2 Investigators: One-year outcome in patients with idiopathic normal-pressure hydrocephalus: comparison of lumboperitoneal shunt to ventriculoperitoneal shunt. *J Neurosurg*. 2016;125:1483–1492.

77. Schleipman AR, Bailey NO. Programmable shunt radiography. *Radiol Technol.* 2001;73:108–16.
78. Giordan E, Palandri G, Lanzino G, Murad MH, Elder BD. Outcomes and complications of different surgical treatments for idiopathic normal pressure hydrocephalus: a systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg.* 2019;131:1024–1036.
79. Miyake H, Kajimoto Y, Tsuji M, Ukita T, Tucker A, Ohmura T. Development of a quick reference table for setting programmable pressure valves in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Neurol Med Chir.* 2008;48:427-432.
80. Liao CL, Tseng PH, Huang HY, Chiu TL, Lin SZ, Tsai ST. Lumbar-peritoneal shunt for idiopathic normal pressure hydrocephalus and secondary normal pressure hydrocephalus. *Tzu Chi Med J.* 2021;34(3):323-328.
81. Lemcke J, Meier U, Müller C, Fritsch MJ, Kehler U, Langer N, i sur. Safety and efficacy of gravitational shunt valves in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus: a pragmatic, randomised, open label, multicentre trial (SVASONA). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84:850–857.
82. Delwel EJ, de Jong DA, Dammers R, Kurt E, van den Brink W, Dirven CMF. A randomised trial of high and low pressure level settings on an adjustable ventriculoperitoneal shunt valve for idiopathic normal pressure hydrocephalus: results of the Dutch evaluation programme Strata shunt (DEPSS) trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84:813–817.
83. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx.* 2004;1(2):182–188.
84. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.* 2003;60(8):1119–1122.
85. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer’s disease. *Alzheimer Dement.* 2007;3(3):186–191.
86. Skalicky P, Mladek A, Vlasak A, De Lacy P, Benes V, Bradac O. Normal pressure hydrocephalus-an overview of pathophysiological mechanisms and diagnostic procedures. *Neurosurg Rev.* 2020;43:1451–1464.
87. Capone PM, Bertelson JA, Ajtai B. Neuroimaging of Normal Pressure Hydrocephalus and Hydrocephalus. *Neurol Clin.* 2020;38:171–183.
88. Kitagaki H, Mori E, Ishii K, Yamaji S, Hirono N, Imamura T. CSF spaces in idiopathic normal pressure hydrocephalus: Morphology and volumetry. *Am J Neuroradiol.* 1998;19:1277–1284.

89. Siraj S. An overview of normal pressure hydrocephalus and its importance: How much do we really know? *J Am Med Dir Assoc.* 2011;12:19–21.
90. Del Bigio MR, Cardoso ER, Halliday WC. Neuropathological changes in chronic adult hydrocephalus: Cortical biopsies and autopsy findings. *Can J Neurol Sci.* 1997;24:121–126.
91. Savolainen S, Paljarvi L, Vapalahti M. Prevalence of Alzheimer's disease in patients investigated for presumed normal pressure hydrocephalus: A clinical and neuropathological study. *Acta Neurochir.* 1999;141:849–853.
92. Golomb J, Wisoff J, Miller DC, Boksay I, Kluger A, Weiner H, i sur. Alzheimer's disease comorbidity in normal pressure hydrocephalus: Prevalence and shunt response. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;68:778–781.
93. Bech-Azeddine R, Hogh P, Juhler M, Gjerris F, Waldemar G. Idiopathic normal-pressure hydrocephalus: Clinical comorbidity correlated with cerebral biopsy findings and outcome of cerebrospinal fluid shunting. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007;78:157–161.
94. Leinonen V, Alafuzoff I, Aalto S, Suotunen T, Savolainen S, Nagren K, i sur. Assessment of beta-amyloid in a frontal cortical brain biopsy specimen and by positron emission tomography with carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B. *Arch Neurol.* 2008;65:1304–1309.
95. Biscetti L, Salvadori N, Farotti L, Cataldi S, Eusebi P, Paciotti S, i sur. The added value of A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> in the CSF signature for routine diagnostics of Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta.* 2019;494:71–73.
96. Formichi P, Battisti C, Radi E, Federico A. Cerebrospinal fluid tau, A $\beta$ , and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):39–46.
97. Lazo ND, Maji SK, Fradinger EA, Bitan G, Teplow DB. The amyloid  $\beta$ -protein. U: Sipe JD. *Amyloid Proteins - The Beta Sheet Conformation and Disease.* Weinheim: Wiley-VCH; 2005: str. 385–491.
98. Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/ $\beta$ -amyloid 42 ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neuro.* 2007;64(3):343–349.
99. Andreasen N, Hesse C, Davidsson P, Minthon L, Wallin A, Winblad B, i sur. Cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neuro.* 1999;56(6):673–680.

100. Galasko D, Chang L, Motter R, Clark CM, Kaye J, Knopman D, i sur. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid  $\beta$ 42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neuro*. 1998;55(7):937–945.
101. Hampel H, Teipel SJ, Fuchsberger T, Andreasen N, Wiltfang J, Otto M, i sur. Value of CSF  $\beta$ -amyloid1-42 and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry*. 2004;9(7):705–710.
102. Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel AW, Henkel MK, i sur. Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF A $\beta$ 42, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging*. 2004;25(3):273–281.
103. Mulder C, Schoonenboom SN, Wahlund LO, Scheltens P, van Kamp GJ, Veerhuis R, i sur. CSF markers related to pathogenetic mechanisms in Alzheimer's disease. *J Neural Trans*. 2002;109(12):1491–1498.
104. Thal LJ, Kantarci K, Reiman EM, Klunk WE, Weiner MW, Zetterberg H, i sur. The role of biomarkers in clinical trials for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006;20(1):6–15.
105. Schirinzi T, Sancesario GM, Ialongo C, Imbriani P, Madeo G, Toniolo S, i sur. A clinical and biochemical analysis in the differential diagnosis of idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Front Neurol*. 2015;6:86.
106. Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, i sur. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 2001;293(5534):1487–1491.
107. Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*. 1998;8(11):425–427.
108. Formichi P, Battisti C, Radi E, Federico A. Cerebrospinal fluid tau, A $\beta$ , and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Cell Physiol*. 2006;208(1):39–46.
109. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2003;2(10):605–613.
110. Hu YY, He SS, Wang X, Duan QH, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, i sur. Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Pathol*. 2002;160(4):1269–1278.



111. Kudo T, Mima T, Hashimoto R, Nakao K, Morihara T, Tanimukai H, i sur. Tau protein is a potential biological marker for normal pressure hydrocephalus. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2000;54:199–202.
112. Miyajima M, Nakajima M, Ogino I, Miyata H, Motoi Y, Arai H. Soluble amyloid precursor protein alpha in the cerebrospinal fluid as a diagnostic and prognostic biomarker for idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Eur J Neurol.* 2013;20:236–242.
113. Anoop A, Singh PK, Jacob RS, Maji SK. CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Int J Alzheimers Dis.* 2010;606802:12.
114. Agren-Wilsson A, Lekman A, Sjoberg W, Rosengren L, Blennow K, Bergenheim AT, i sur. CSF biomarkers in the evaluation of idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Acta Neurol Scand.* 2007;116:333–339.
115. Jeppsson A, Zetterberg H, Blennow K, Wikkelso C. Idiopathic normal-pressure hydrocephalus: Pathophysiology and diagnosis by CSF biomarkers. *Neurology.* 2013;80:1385–1392.
116. Pyykko OT, Lumela M, Rummukainen J, Nerg O, Seppala TT, Herukka SK, i sur. Cerebrospinal fluid biomarker and brain biopsy findings in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *PLoS ONE.* 2014;9:e91974.
117. Tullberg M, Blennow K, Mansson JE, Fredman P, Tisell M, Wikkelso C. Cerebrospinal fluid markers before and after shunting in patients with secondary and idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Cereb Fluid Res.* 2008;5:9.
118. Tullberg M, Blennow K, Mansson JE, Fredman P, Tisell M, Wikkelso C. Ventricular cerebrospinal fluid neurofilament protein levels decrease in parallel with white matter pathology after shunt surgery in normal pressure hydrocephalus. *Eur J Neurol.* 2007;14:248–254.
119. Jeppsson A, Bjerke M, Hellstrom P, Blennow K, Zetterberg H, Kettunen P, i sur. Shared CSF Biomarker Profile in Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus and Subcortical Small Vessel Disease. *Front Neurol.* 2022;13:839307.
120. Clarke LP, Velthuisen RP, Camacho MA, Heine JJ, Vaidyanathan M, Hall LO, i sur. MRI segmentation: methods and applications. *Magn Reson Imaging.* 1995;13(3):343–68.
121. Despotović I, Goossens B, Philips W. MRI segmentation of the human brain: challenges, methods, and applications. *Comput Math Methods Med.* 2015;450341.

122. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*. 2006;31(3):1116-28.
123. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental status". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12(3):189–98.
124. Arevalo-Rodriguez I, Smailagic N, Roqué-Figuls M, Ciapponi A, Sanchez-Perez E, Giannakou A, et al. "Mini-Mental State Examination (MMSE) for the early detection of dementia in people with mild cognitive impairment (MCI)". *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;7(7):CD010783.
125. Manjón JV, Coupe P. VolBrain: an online MRI brain volumetry system. *Front Neuroinform*. 2016;10:30.
126. Dawson B, Trapp RG. *Basic and Clinical Biostatistics*. 4.izd. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2004.
127. Hu T, Lee Y. Idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *CMAJ*. 2019;191(1):E15.
128. Da Rocha SFB, Kowacs PA, de Souza RKM, Pedro MKF, Ramina R, Teive HAG. Serial Tap Test of patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus: impact on cognitive function and its meaning. *Fluids Barriers CNS*. 2021;18(1):22.
129. Mori E, Ishikawa M, Kato T, Kazui H, Miyake H, Miyajima M, et al. Guidelines for management of idiopathic normal pressure hydrocephalus: second edition. *Neurol Med Chir*. 2012;52(11):775–809.
130. Wikkelsø C, Hellstrom P, Klinge PM, Tans JT, European iNPH Multicentre Study Group. The European iNPH Multicentre Study on the predictive values of resistance to CSF outflow and the CSF Tap Test in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(5):562–8.
131. Marmarou A, Bergsneider M, Klinge P, Relkin N, Black PM. The value of supplemental prognostic tests for the preoperative assessment of idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Neurosurgery*. 2005;57(3):S17–28.
132. Walchenbach R, Geiger E, Thomeer RT, Vanneste JA. The value of temporary external lumbar CSF drainage in predicting the outcome of shunting on normal pressure hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;72(4):503-6.
133. Chotai S, Medel R, Herial NA, Medhkour A. External lumbar drain: A pragmatic test for prediction of shunt outcomes in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Surg Neurol Int*. 2014;5:12.

134. Oliveira LM, Nitrini R, Román GC. Normal-pressure hydrocephalus: A critical review. *Dement Neuropsychol* [Internet]. 2019;13(2):133–43.
135. Ishii K, Soma T, Shimada K, Oda H, Terashima A, Kawasaki R. Automatic volumetry of the cerebrospinal fluid space in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2013;3(1):489-96.
136. Kitagaki H, Mori E, Ishii K, Yamaji S, Hirono N, Imamura T. CSF spaces in idiopathic normal pressure hydrocephalus: morphology and volumetry. *Am J Neuroradiol*. 1998;19(7):1277-84.
137. Singer OC, Melber J, Hattingen E, Jurcoane A, Keil F, Neumann-Haefelin T, i sur. MR volumetric changes after diagnostic CSF removal in normal pressure hydrocephalus. *J Neurol*. 2012;259(11):2440-6.
138. Cutler RW, Page L, Galicich J, Watters GV. Formation and absorption of cerebrospinal fluid in man. *Brain*. 1968;91(4):707-20.
139. McComb JG. Recent research into the nature of cerebrospinal fluid formation and absorption. *J Neurosurg*. 1983;59(3):369-83.
140. McComb JG. Cerebrospinal fluid physiology of the developing fetus. *Am J Neuroradiol*. 1992;13(2):595-599.
141. Kudelić N, Koprek I, Radoš M, Orešković D, Jurjević I, Klarica M. Predictive value of spinal CSF volume in the preoperative assessment of patients with idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Front Neurol*. 2023;14:1234396.
142. Bagatto D, Tereshko Y, Piccolo D, Fabbro S, De Colle MC, Morassi M, i sur. Clinical applicability of arterial spin labeling magnetic resonance imaging in patients with possible idiopathic normal pressure hydrocephalus: a prospective preliminary study. *Clin Neurol Neurosurg*. 2023;227:107645.
143. Fabbro S, Piccolo D, Vescovi MC, Bagatto D, Tereshko Y, Belgrado E, i sur. Resting-state functional-MRI in iNPH: can default mode and motor networks changes improve patient selection and outcome? Preliminary report. *Fluids Barr CNS*. 2023;20:7.
144. Naidich TP, Castillo M, Cha S, Smirniopoulos JG. *Imaging of the brain*. Philadelphia: Saunders; 2013.
145. Alperin N, Bagci AM, Lee SH, Lam BL. Automated Quantitation of Spinal CSF Volume and Measurement of Craniospinal CSF Redistribution following Lumbar Withdrawal in Idiopathic Intracranial Hypertension. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37(10):1957-1963.

146. Klarica M, Radoš M, Erceg G, Jurjević I, Petošić A, Virag Z, i sur. Cerebrospinal fluid micro-volume changes inside the spinal space affect intracranial pressure in different body positions of animals and phantom. *Front Mol Neurosci.* 2022;15:931091.
147. Nikić I, Radoš M, Frobe A, Vukić M, Orešković D, Klarica M. The effects of lumboperitoneal and ventriculoperitoneal shunts on the cranial and spinal cerebrospinal fluid volume in a patient with idiopathic intracranial hypertension. *Croat Med J.* 2016;57(3):293-297.
148. Edsbagge M, Starck G, Zetterberg H, Ziegelitz D, Wikkelso C. Spinal cerebrospinal fluid volume in healthy elderly individuals. *Clin Anat.* 2011;24(6):733-40.
149. Lebret A, Hodel J, Rahmouni A, Decq P, Petit E. Cerebrospinal fluid volume analysis for hydrocephalus diagnosis and clinical research. *Comput Med Imaging Graph.* 2013;37(3):224-233.
150. Virhammar J, Warntjes M, Laurell K, Larsson EM. Quantitative MRI for Rapid and User-Independent Monitoring of Intracranial CSF Volume in Hydrocephalus. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016;37(5):797-801.
151. Lenfeldt N, Hansson W, Larsson A, Birgander R, Eklund A, Malm J. Three-day CSF drainage barely reduces ventricular size in normal pressure hydrocephalus. *Neurology.* 2012;79(3):237-42.
152. Leinonen V, Koivisto AM, Savolainen S, Rummukainen J, Tamminen JN, Tillgren T, i sur. Amyloid and tau proteins in cortical brain biopsy and Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2010;68:446-453.
153. Abu Hamdeh S, Virhammar J, Sehlin D, Alafuzoff I, Cesarini KG, Marklund N. Brain tissue A $\beta$ 42 levels are linked to shunt response in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J Neurosurg.* 2018;130(1):121-129.
154. Craven CL, Baudracco I, Zetterberg H, Lunn MPT, Chapman MD, Lakdawala N, i sur. The predictive value of T-tau and AB1-42 levels in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Acta Neurochir.* 2017;159(12):2293-2300.
155. Hong YJ, Kim MJ, Jeong E, Kim JE, Hwang J, Lee JI, i sur. Preoperative biomarkers in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus showing a favorable shunt surgery outcome. *J Neurol Sci.* 2018;387:21-26.
156. Johansson BB, Wikkelso C, Blomstrand C, Linder L, Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide in cerebrospinal fluid of patients with dementia. *Nord Psykiatr Tidsskr.* 1985;39(11):69-73.

157. Migliorati K, Panciani PP, Pertichetti M, Borroni B, Archetti S, Rozzini L, i sur. P-Tau as prognostic marker in long term follow up for patients with shunted iNPH. *Neurol Res.* 2021;43(1):78–85.
158. Minta K, Jeppsson A, Brinkmalm G, Portelius E, Zetterberg H, Blennow K, i sur. Lumbar and ventricular CSF concentrations of extracellular matrix proteins before and after shunt surgery in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Fluids Barriers CNS.* 2021;18(1):23.
159. Patel S, Lee EB, Xie SX, Law A, Jackson EM, Arnold SE, i sur. Phosphorylated tau/amyloid beta 1–42 ratio in ventricular cerebrospinal fluid reflects outcome in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Fluids Barriers CNS.* 2012;9(1):7.
160. Pyykkö OT, Helisalmi S, Koivisto AM, Mölsä JA, Rummukainen J, Nerg O, i sur. APOE4 predicts amyloid- $\beta$  in cortical brain biopsy but not idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83(11):1119–1124.
161. Scollato A, Terreni A, Caldini A, Salvadori B, Gallina P, Francese S, i sur. CSF proteomic analysis in patients with normal pressure hydrocephalus selected for the shunt: CSF biomarkers of response to surgical treatment. *Neurol Sci.* 2010;31(3):283–291.
162. Tarnaris A, Toma AK, Chapman MD, Keir G, Kitchen ND, Watkins LD. Use of cerebrospinal fluid amyloid- $\beta$  and total tau protein to predict favorable surgical outcomes in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J Neurosurg.* 2011;115(1):145–150.
163. Vanninen A, Nakajima M, Miyajima M, Rauramaa T, Kokki M, Musialowicz T, i sur. Elevated CSF LRG and decreased Alzheimer's disease biomarkers in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J Clin Med.* 2021;10(5):1105.
164. Thavarajasingam SG, El-Khatib M, Vemulapalli KV, Iradukunda HAS, Laleye J, Russo S, i sur. Cerebrospinal fluid and venous biomarkers of shunt-responsive idiopathic normal pressure hydrocephalus: a systematic review and meta-analysis. *Acta Neurochir.* 2022;164:1719–1746.
165. Tarnaris A, Toma AK, Chapman MD, Petzold A, Kitchen ND, Keir G, i sur. The longitudinal profile of CSF markers during external lumbar drainage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(10):1130-3.
166. Jingami N, Uemura K, Asada-Utsugi M, Kuzuya A, Yamada S, Ishikawa M, i sur. Two-Point Dynamic Observation of Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. *J Alzheimers Dis.* 2019;72(1):271-277.

167. Lukkarinen H, Tesseur I, Pemberton D, Van Der Ark P, Timmers M, Slemmon R, i sur. Time Trends of Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Neurodegeneration in Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. *J Alzheimers Dis.* 2021;80(4):1629-1642.

## 11. ŽIVOTOPIS

Klara Brgić Mandić je rođena 3. travnja 1986. godine u Puli gdje je pohađala i završila srednju školu s odličnim uspjehom. Medicinski fakultet je upisala 2004. godine. U akademskoj godini 2009. / 2010. dobitnica je dvije dekanove nagrade, za postignut uspjeh te za znanstveni rad pod nazivom "Profiliranje proteoma plazme kod hepatocelularnog karcinoma putem tekućinske kromatografije i spektrometrije masa". Taj znanstveni rad izrađen je u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Lovorke Grgurević. Nakon jednogodišnjeg pripravničkog staža položila je dana 23. studenoga 2011. stručni ispit Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi. Godine 2013. je započela sa specijalizacijom iz neurokirurgije za Opću bolnicu Pula. Tijekom specijalizacije aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i stranim kongresima. Sudjelovala je u četverogodišnjem ciklusu tečaja za specijalizante neurokirurgije - "European Training Courses in Neurosurgery" te položila pismeni ispit u kolovozu 2019. u Brnu. Dana 20.09.2019. položila je specijalistički ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva. Nakon godinu dana specijalističkog staža u Puli, 2020. godine prelazi u Klinički bolnički centar Zagreb. 2016. godine je upisala doktorski poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te je do 2019. godine odslušala i položila sve predviđene ispite.