

Marina Josipović

Utjecaj oštećenja jetrenog parenhima na aktivnost
C-reaktivnog proteina i interleukina-6

DIPLOMSKI RAD

predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2012.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za kemiju KBC „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Nade Vrkić.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Nadi Vrkić na vodstvu, stručnoj pomoći i velikom trudu pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem Jeleni Culej, mag. med. biochem. na pristupačnosti i pomoći pri izradi praktičnog dijela rada.

Posebno hvala mojoj obitelji na razumjevanju i podršci tijekom studiranja.

SADRŽAJ :

1.	UVOD.....	1
1.1.	JETRA.....	1
1.1.1.	Enterohepatički put.....	1
1.1.2.	Ekskrecijska funkcija jetre.....	2
1.2.	BOLESTI BILIJARNOG TRAKTA.....	2
1.2.1.	Kolangitis.....	3
1.2.1.1.	Dijagnostika.....	3
1.2.2.	Žučni kamenci.....	3
1.2.2.1.	Nastanak žučnih kamenaca.....	4
1.2.2.2.	Kolesterolski kamenci.....	4
1.2.2.3.	Pigmentni kamenci.....	5
1.2.2.4.	Što doprinosi nastanku žučnih kamenaca.....	5
1.2.3.	Tumori žučnih puteva.....	6
1.2.3.1.	Posljedica opstrukcije žučnih puteva.....	6
1.2.3.2.	Kolestatska žutica.....	7
1.2.3.3.	Metode pregleda žučnih kanala.....	7
1.2.3.3.1.	Ultrazvuk.....	7
1.2.3.3.2.	Kompjuterizirana tomografija.....	7
1.2.3.3.3.	Kolangiopankreatografija upotrebom magnetske rezonancije.....	7
1.2.3.3.4.	Endoskopska retrogradna kolangiopankreatografija.....	8
1.3.	UPALA.....	8
1.3.1.	Akutna faza upale.....	9
1.3.2.	Subakutna faza upale.....	9
1.3.3.	Kronična faza upale.....	9
1.3.4.	Proteini akutne faze.....	10
1.3.5.	Citokini.....	10
1.3.5.1.	Citokinski receptori.....	10

1.4.	C-REAKTIVNI PROTEIN I INTERLEUKIN-6.....	11
1.4.1.	C-reaktivni protein.....	11
1.4.2.	Interleukin-6.....	14
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	17
3.	MATERIJALI I METODE.....	19
3.1.	ISPITANICI I UZORCI.....	19
3.2.	ANALITIČKE METODE.....	19
3.2.1.	Određivanje CRP-a imunoturbidimetrijskom metodom na analizatoru Olympus 2700.....	19
3.2.2.	Određivanje IL-6 E nzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metodom	20
3.2.2.1.	Postupak određivanja IL-6.....	20
3.2.2.2.	Izračunavanje koncentracije IL-6 u serumu.....	21
3.2.3.	Određivanje ukupnog bilirubina fotometrijskim testom bojanja na Beckman Coulter analizatoru.....	22
3.3.	STATISTIČKE METODE.....	22
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1.	REZULTATI.....	24
4.1.1.	Prikaz rezultata kroz deskriptivnu statistiku.....	24
4.1.2.	Utjecaj endoskopske bilijarne dekompresije na upalni odgovor.....	27
4.1.2.1.	Utjecaj endoskopske bilijarne dekompresije na koncentracije CRP-a.....	27
4.1.2.1.1.	Značajnost razlike koncentracije CRP u skupinama A i B.....	28
4.1.2.2.	Utjecaj endoskopske bilijarne dekompresije na konc. IL- 6.....	29
4.1.2.2.1.	Značajnost razlike koncentracije IL-6 u skupinama A i B.....	30
4.1.2.3.	Utjecaj endoskopske bilijarne dekompresije na koncentraciju ukupnog serumskog bilirubina.....	31
4.1.2.3.1.	Značajnost razlike koncentracije ukupnog serumskog bilirubina u skupinama A i B.....	32
4.1.3.	Međuovisnost protuupalnog citokina IL-6 i CRP.....	33
4.1.3.1.	Međuovisnost protuupalnog citokina IL-6 i CRP skupine A.....	33
4.1.3.1.1.	Regresijski model za povezanost IL-6 i CRP skupine A.....	34

4.1.3.2.	Međuovisnost protuupalnog citokina IL-6 i CRP skupine B.....	36
4.1.3.2.1.	Regresijski model za povezanost IL-6 i CRP skupine B.....	37
4.1.4.	Povezanost CRP i IL-6 s koncentracijom ukupnog bilirubina.....	39
4.2.	RASPRAVA.....	40
5.	ZAKLJUČCI.....	45
6.	LITERATURA.....	46
7.	SAŽETAK.....	48
7.1.	SUMMARY.....	49
	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	50
	BASIC DOCUMENTATION CARD.....	51

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU

CCC	eng. <i>Cholangio cellular carcinoma</i> , tumori žučnih vodova
CRP	C-reaktivni protein
CT	eng. <i>Computed tomography</i> , kompjuterizirana tomografija
DNA	eng. <i>Deoxyribonucleic acid</i> , deokiribonukleinska kiselina
DPD	eng. <i>3,5-dichlorophenyl-diazonium-tetrafluoroborate</i> , 3,5-diklorfenil-diazonij-tetrafluoroborat
EDTA	eng. Ethylenediaminetetraacetic acid, etilendiaminotetraoctena kiselina
ELISA	eng. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzim-imunokemijska tehnika
ERCP	eng. <i>Endoscopic retrograde cholangiopancreatography</i> , endoskopska retrogradna kolangiopankreatografija
GP130	glikoprotein 130
HRP	hren-peroksidaza
IFN β_2	interferon beta 2
IL- 1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6
IL-6R	receptor za IL-6
JAK	Janus kinaze
MRCP	eng. <i>Magnetic resonance cholangiopancreatography</i> , magnetno rezonantna kolangiopankreatografija
RES	retikuloendotelni sustav
TMB	tetrametilbenzidin
TNF- α	eng. <i>Tumor necrosis factor</i> , faktor tumora nekroze alfa
TUZ	transabdominalni ultrazvuk

1. UVOD

1.1. JETRA

Jetra je najveći organ u tijelu, smješten na desnoj strani trbušne šupljine. Sastoji se od dva režnja ili lobusa, od kojih je desni oko šest puta veći od lijevog. Na donjem rubu jetre, između dva režnja, ulaze grane jetrene arterije i portalne vene. Jetra je karakterističan organ jer posjeduje dvostruku cirkulaciju. Oko 70% krvi ulazi u jetru portalnom venom koja donosi krv iz slezene i krv bogatu hranjivim sastojcima iz gastrointestinalnog trakta, a oko 30% kroz jetrenu arteriju koja donosi arterijsku krv bogatu kisikom. U jetri se nalazi i mreža limfnih žila kojom limfa zajedno s međustaničnom tekućinom dospjeva iz jetre u opću cirkulaciju. Iz jetrenih stanica izlaze i žučne kapilare, one stvaraju mrežu između redova stanica, te stvaraju intrahepatičke žučne kanalići. Ti se kanalići spajaju stvarajući desni i lijevi hepatici žučni kanal, koji izlaze iz jetre i spajaju se u zajednički hepatici kanal. Taj kanal zajedno s izvodnim kanalom žučnog mjehura stvara zajednički žučni kanal, koji ulazi u dvanaesnik. Složena mješavina žučnih soli i otpadnih produkata koja se zove žuč, egzokrina jetrena lučevina, pohranjuje se i koncentrira u žučnom mjehuru. Stvaraju je hepatociti, a izmjenjuju žučni mjehur i žučni vodovi. Organske tvari u žuči su žučne kiseline, žučni pigmenti, kolesterol, fosfolipidi i manja količina proteina. Anorganske tvari u žuči čine elektroliti. Funkcionalna anatomski jedinica jetre jest acinus. Glavne funkcionirajuće stanice u jetri su hepatociti, koji čine oko 70% jetrene mase. U jetri se nalaze još i fenestrirane endotelne stanice i Kupfferove stanice koje sadržavaju lizosome s hidrolitičkim enzimima. U malo broju se nalaze u jetri i zvjezdaste stanice koje su smjštene između endotelne obruba sinusoida i hepatocita, tzv. Disseov prostor. Jetra ima važnu ulogu u brojnim metaboličkim, kataboličkim i anaboličkim procesima, te se stoga naziva i „centralni laboratorij“ (Štraus, 2009).

1.1.1. Enterohepatički put

Složena mješavina žučnih soli i otpadnih produkata koja se zove žuč, egzokrina jetrena lučevina, pohranjuje se i koncentrira u žučnom mjehuru. Stvaraju je hepatociti, a izmjenjuju žučni mjehur i žučni vodovi. Organske tvari u žuči su žučne kiseline, žučni pigmenti, kolesterol, fosfolipidi i manja količina proteina. Anorganske tvari u žuči čine elektroliti. Kolesterol i žučne kiseline besprekidno cirkuliraju između tankog crijeva i jetre. Taj se proces

zove enterohepatička cirkulacija. Kolesterol sintetiziran u jetri ulazi u cirkulaciju, prelazi u žučne kiseline ili se luči u žuč, a putem nje u tanko crijevo. Oko 50% kolesterola koji je na taj način dospio u tanko crijevo ponovno se apsorbira i vraća u jetru. Ostatak se izlučuje stolicom. U proces enterohepatičke cirkulacije također su uključene i žučne kiseline. One se putem žuči luče u tanko crijevo. Omogućuju otapanje bilijarnog kolesterola u žuči, a u tankom crijevu pospješuju njegovu apsorpciju i apsorpciju masti. Oko 97% svih žučnih kiselina prispjelih u tanko crijevo ponovno se apsorbira i ulazi u sustav portalne cirkulacije, dok se svega 3% izlučuje stolicom. Žučne kiseline ponovno se izlučuju pri prvom prolasku kroz jetru. One u jetri svoju sintezu također reguliraju metabolizmom povratne sprege. U većine ostalih, 300-500 mg kolesterola se pretvara u žučne kiseline, a one se resecerniraju u žuč kako bi zatvorile ciklus enterohepatičke cirkulacije. Žučne kiseline prolaze put enterohepatičke cirkulacije oko šest puta na dan – dva puta uz svaki obrok. Dnevno se izlučuje 500-600 mililitara (Grundy, 1990).

1.1.2. Ekskrecijska funkcija jetre

Laboratorijskim pretragama kojim određujemo sadržaj žučnih kiselina i bilirubina u krvi procjenjujemo ekskrecijske funkcije jetre (Čepelak i sur., 2004.). Bilirubin je razgradni produkt hema. Oko 85% bilirubina potječe od dotrajalih eritrocita koji se razgrađuju u retikuloendotelnim stanicama jetre, slezene i koštane srži. Iz retikuloendotelnih stanica dopjeva u krv te se vezan na albumine prenosi do jetre. Na membrani hepatocita dolazi do odvajanja albumina i transporta kroz membranu. Unutar jetrenih stanica bilirubin se reverzibilno veže na topljive proteine, ligandine ili protein Y. Zatim se konjugira s glukuronskom kiselinom te nastaju bilirubin-monoglukuronidi i diglukuronidi koji se izlučuju u žuč. Daljnji prijenos bilirubina ovisi o normalnom toku žuči koji pak ovisi o lučenju žučnih kiselina iz hepatocita. Upravo su ovi procesi najčešće poremećeni pri oštećenju jetre.

1.2. BOLESTI BILIJARNOG TRAKTA

U bolesti bilijarnog trakta ubrajamo žučne kamence, upale žučnih puteva (kolangitis) i žučne vrećice te maligne bolesti.

1.2.1 Kolangitis

Akutna upala žučnih puteva klinički je sindrom kojeg karakterizira skup simptoma također poznatim pod imenom Charcotov trijas a to su abdominalna bol, vrućica i žutica. Najčešći uzrok akutnog kolangitisa je bakterijska infekcija. Ukoliko dođe do kolonizacije bakterija u žuč, to ne znači istovremenu pojavu upale žučnih vodova.

Porast intrabilijarnog tlaka je najvažniji preduvjet nastanka upale. Bakterijska invazija žučnih vodova nastaje pretežno iz duodenuma, preko Vaterove papile. U kulturama žuči najčešće se izoliraju bakterije *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, enterokoki i *Proteus*. Upala žučnih puteva najčešće je posljedica bilijarne opstrukcije i staze žuči. Ako je opstrukcija prolongirana, dolazi do porasta intrabilijarnog tlaka, koji je i glavni uzrok akutnog kolangitisa. U tom slučaju bakterije migriraju iz ogranaka portalne vene u bilijarni trakt s posljedičnom kolonizacijom. Također je važno spomenuti da je komunikacija otvorena u oba smjera, što znači da bakterije mogu migrirati iz žuči u sistemske cirkulacije te dolazi do pojave kliničkih simptoma sepse (Rustemović, 2006).

1.2.1.1. Dijagnostika

Dijagnoza se postavlja na temelju rutinskih laboratorijskih testova koji najčešće nalaze leukocitozu s dominantnom neutrofilijom te kolestazom izazvan porast alkalne fosfataze, gama-glutamil transferaze te hiperbilirubinemije na račun konjugiranog bilirubina. Laboratorijski testovi koje se naprave u kasnijem vremenu mogu upućivati na posljedičnu akutnu hepatocitnu nekrozu s porastom transaminaza iznad 1000 IU/L. Potrebno je uzeti hemokulturu kod svih pacijenata kod kojih se sumnja na akutni kolangitis.

Transabdominalni ultrazvuk (Tuz) bi trebala biti prva primijenjena slikovna tehnika u postavljanju dijagnoze (Rustemović, 2006).

1.2.2. Žučni kamenci

Žučni kamenci predstavljaju relativno čest poremećaj, što dokazuje podatak da oko 10% ukupne populacije ima žučne kamence. Kamenci žučnog trakta spadaju u skupinu bolesti koje češće zahvaćaju ženski dio populacije; kod žena se nalaze čak četiri puta češće. Kamenci su češće prisutni u žučnom mjehuru nego u žučnim putovima. Kad su prisutni u žučnim

putovima, predstavljaju najčešći uzrok ekstrahepatičke opstruktivne žutice, a mogu izazvati potencijalno smrtonosne infekcije (kolangitis), pankreatitis ili kroničnu jetrenu bolest. Prema izgledu i kemijskoj strukturi žučne kamence razvrstavamo u dvije osnovne skupine: kolesterolski i pigmentni kamenci (Gamulin i sur., 2005).

Žučni su kamenci obično glatki, tvrdi, sivosmeđi ili bjelkasti konkrementi koji se stvaraju u žučnoj vrećici. Mogu biti i veliki, no i tada su obično obli, a kad ih ima više, onda su poliedričnog oblika. Sastoje se od kolesterola, bilirubina, kalcija i mukoproteina, a mogu sadržavati i lipide te tragove željeza, bakra, magnezija i mangana. Kolesterolski kamenci su obično bjelkasti, masnog opipa i lakše se drobe, dok su kamenci od bilirubina i kalcijevih soli, tzv. pigmentni kamenci, tamne boje i tvrdi su (Štraus, 2009).

1.2.2.1. Nastanak žučnih kamenaca

U normalnoj žuči nalaze se soli žučnih kiselina i kolesterol u omjeru oko 10:1, i taj višak žučnih kiselina održava kolesterol otopljenim u žuči. Kad se u jetri stvara više kolesterola, ili se kolesterol manje metabolizira u žučne kiseline i steroidne hormone, remeti se odnos žučnih kiselina i kolesterola u žuči, pa dolazi do taloženja i stvaranja žučnih kamenaca. Tome pridonose još i upalni procesi i infekcije žučnog mjehura, zastoj žuči i promjene pH (Štraus, 2009).

1.2.2.2. Kolesterolski kamenci

Žučne soli stvaraju se u jetrenim stanicama od kolesterola iz krvne plazme, a u procesu lučenja žučnih soli u žuč dnevno se iz plazme izdvoji i u žuč izluči i oko 1-2 g kolesterola.

Kolesterol je gotovo netopljiv u čistoj vodi, ali se s njim vežu žučne soli i lecitin u žuči stvarajući submikroskopske micle u obliku koloidne otopine. Kad se žuč zgusne u žučnom mjehuru, žučne soli i lecitin zgušnjavaju se zajedno s kolesterolom, pa on ostane otopljen. U patološkim okolnostima kolesterol se u žučnom mjehuru može istaložiti, pa nastaju kolesterolski žučni kamenci. Količinu kolesterola u žuči djelomice određuje količina masti koju čovjek uzima hranom, jer jetrene stanice sintetiziraju kolesterol metaboličkom pregradnjom masti u tijelu. Zato su osobe koje godinama jedu hranu koja obiluje mastima, sklonije stvaranju žučnih kamenaca. Kolesterolski kamenci čine 75% svih kamenaca.

1.2.2.3. Pigmentni kamenci

Povećana koncentracija bilirubina uzrokuje nastanak pigmentnih žučnih kamenaca. Sastoje od kalcijevog bilirubinata, ili kalcificiranog bilirubina, tvari koja se stvara razgradnjom hemoglobina u krvi. Bilirubin se odlaže jednim dijelom u jetri iz koje odlazi pigment bilirubin u žučnjak. Kako se žučni sok na podražaj hranom u želudcu izlučuje u dvanaesnik (početak tankog crijeva), tako se i bilirubin jednim dijelom izlučuje stolicom, a drugim se dijelom ponovno vraća u krvotok crijevnom sluznicom tankog crijeva jer je neophodan u stvaranju hemoglobina. U našim krajevima nailazimo na pigmentne kamenace crne boje koji se sastoje od bakra, kalcija i mucinskih glikoproteina. Smeđi, orijentalni tip pigmentnih kamenaca posljedica je bakterijske infekcije bilijarnog sustava, a građeni su od kalcijevabilirubinata i kalcijevih soli masnih kiselina (Opačić, 2006). Pigmentni kamenci crni ili smeđi često se stvaraju u žučnjacima osoba s hemolitičkom anemijom ili cirozom. Oni čine oko 15% žučnih kamenaca (Kumar i sur., 2005).

1.2.2.4. Što doprinosi nastanku žučnih kamenaca

Životna dob najveći je rizični čimbenik za nastanak žučnih kamenaca. Kod djece se rijetko javljaju, osim u hemolitičkim bolestima. Učestalost žučnih kamenaca veća je kod žena u odnosu na muškarce (3:1), a posebno je izražena u dobi od 30 do 40 godina. Spolni hormoni uzrokuju različite promjene u bilijarnom sustavu koje u konačnici završavaju hipersaturacijom žuči kolesterolom i usporenim motilitetom žučnog mjehura što pogoduje stvaranju kamenaca. Oralni kontraceptivi i nadomjesna terapija estrogenima također su povezani s većom učestalošću žučnih kamenaca. Genski faktori također imaju važnu ulogu. Žučni kamenci javljaju se dvostruko češće unutar obitelji, u rođaka u prvom koljenu, osobito u žena. Debljina i naglo mršavljenje povećavaju rizik pojave žučnih kamenaca, te nepotpuno razjašnjen utjecaj šećerne bolesti na povećanu sklonost pojave žučnog kamena. Ciroza je također važan faktor nastanka žučnih kamenaca te dva lijeka - klofibrat i ceftiakson (Opačić, 2006).

1.2.3. Tumori žučnih puteva

Uz žučne kamence, najčešći uzrok opstrukciji žučnih puteva jesu tumori koji mogu biti benigni (papilom, adenom, fibrom) ili maligni (karcinom). Kolangiocelularni karcinomi (CCC, engl. *cholangio cellular carcinoma* – tumori žučnih vodova) nastaju iz epitela intrahepatalnih i ekstrahepatalnih žučnih vodova. Ovi zloćudni tumori vrlo su rijetki, ali imaju visoki mortalitet jer se u pravilu kasno dijagnosticiraju kad je bolest uznapredovala na lokalnoj razini. Terminom kolangiokarcinom nazivamo zloćudne tumore žučnih vodova koji nastaju u intrahepatalnim žučnim vodovima, u perihilarnoj regiji te unutar ekstrahepatalnih žučnih vodova. Tumori žučnog mjehura i periampularne regije svrstavaju se u izdvojenu kategoriju bolesti. Karcinomi perihilarne regije dodatno se klasificiraju po Bismuthovim kriterijima s obzirom na to kako opstruiraju žučne vodove:

- tumori ispod spoja lijevog i desnoga žučnog voda (tip I),
- tumori koji zahvaćaju račvište (tip II),
- tumori koji opstruiraju zajednički žučovod te zahvaćaju ili lijevi ili desni intrahepatalni žučni vod (tip III a i III b) i
- tumori koji su multicentrični ili zahvaćaju uz konfluens i oba intrahepatalna žučna voda (tip IV).

Tumori koji su locirani u visini bifurkacije žučnih kanala nazivaju se i Klatskinovi tumori neovisno o tome potječu li od intrahepatalnih ili ekstrahepatalnih žučnih kanala. Ovi perihilarni tumori predstavljaju 60 do 70% kolangiokarcinoma, 25% se nalazi u području ekstrahepatalnih žučnih kanala, dok mali preostali dio otpada na karcinome intrahepatalnih žučnih kanala. (Rustemović N, 2006)

1.2.3.1. Posljedica opstrukcije žučnih puteva

Najčešća posljedica opstrukcije žučnih kanala i oštećenja jetrenih stanica jest smanjenje ili prestanak izlučivanja žuči. Zastoj u stvaranju žuči zove se još i kolestaza. Tada se u krvnom serumu nagomilavaju tvari koje se normalno izlučuju putem žuči: bilirubin, alkalna fosfataza, serumski kolesterol. Hiperbilirubinemija ili povećanje bilirubina u serumu, uzrokuje žutu boju kože ili žuticu. Najčešće se pojavljuje kada su koncentracije bilirubina u serumu između 34 i 51 $\mu\text{mol/L}$. Opstrukcije žučnih kanala vodi do kolestatske žutice (Štraus, 2009).

1.2.3.2. Kolestatska žutica

U RES-u se bilirubin normalno stvara i krvlju dolazi do jetre u kojoj se konjugira s glukuronskom kiselinom. Zbog oštećenja žučnih kanala ne može se zajedno s žuči izlučivati u crijevo, te se vraća u krvi i dolazi do povećanja konjugiranog bilirubina. Zbog onemogućenog izlučivanja u crijevo, ne stvara se urobilinogen, pa je stolica blijeda, akolična. Također ne dolazi ni do enterohepatičke cirkulacije urobilinogena, pa ni urobilinogena u mokraći. U mokraći se ipak pojavljuje bilirubin, jer serum sadržava veliku koncentraciju konjugiranog bilirubina koji prolaskom krvi kroz bubrege lagano prolazi kroz glomerularni filtrat (Štraus, 2009).

1.2.3.3. Metode pregleda žučnih kanala

1.2.3.3.1. Ultrazvuk

Transabdominalni ultrazvuk vrlo je precizna i najdostupnija metoda. No, iako u gotovo 100% slučajeva prepoznaje prisutnost kamenca u žučnom mjehuru, često ne prepoznaje kamenac u žučnim vodovima. Dijagnoza se mora dopuniti sa detaljnom kliničkom i laboratorijskom obradom pacijenta (Krnić, 2006)

1.2.3.3.2. Kompjuterizirana tomografija

Nalaze transabdominalnog ultrazvuka možemo uspoređivati sa CT. Radi se o tehnološki naprednoj radiološkoj metodi koja se zasniva na rendgenskim zrakama i metodama složene računalne obrade signala iz tijela pacijenta. Žučni kamenci su zbog svog specifičnog kemijskog sastava često bolje vidljivi ultrazvukom nego CT-om, tako da je bolest žučnih kamenaca jedna od rijetkih bolesti gdje je ultrazvuk precizniji od CT-a. (Krnić A, 2006)

1.2.3.3.3. Kolangiopankreatografija upotrebom magnetske rezonancije

MRCP je bezbolna i brza metoda koja prikazuje izvanjetrene i veće unutar jetrene žučne vodove. Zbog toga je omogućeno jasno utvrđivanje mjesta na kojem je doslo do zastoja žuči. Međutim, ovisno o fizikalnim namještanjima, ponekad bolje otkriva žučne kamence a u drugim slučajevima tumor kao uzrok žutice. (Krnić A, 2006)

1.2.3.3.4. Endoskopska retrogradna kolangiopankreatografija

ERCP utemeljili su liječnici iz Japana i Njemačke kao dijagnostičko i terapijsko sredstvo 1969. godine. Radi se o kombinaciji endoskopskog i radiološkog postupka. Vrlo je agresivna ali precizna metoda koja prikazuje žučne vodove. Pacijent mora biti na tašte zadnjih šest sati, te primiti odgovarajuća sedacijska sredstva. Kontinuirano se mjere vitalni znaci kao što su puls, krvni tlak i pulsna oksimetrija. Kod starijih pacijenata potrebno je pratiti i srčane funkcije. Endoskop se uvodi kroz usta, preko jednjaka i želudca do dvanaesnika, ulazi se i u završni dio glavnog žučovoda. Zatim se daje rendgensko kontrastno sredstvo, kojim se ocrtvaju i žučni i gušteračni vodovi. Na taj način je omogućeno postavljanje određene dijagnoze i sljedećeg koraka u terapiji koja slijedi. Ova metoda omogućuje rješavanje opstrukcije kamencem ili tumorom pomoću električnog spaljivanja otvora glavnog žučovoda, procesom koji se naziva sfinkterotomija, i vađenjem kamenca. Zbog dugotrajnog učinka u otvor se može staviti i potporna mrežica, tzv. „stent“, koja će spriječiti novo urastanje tumora. ERCP je postupak koji se povezuje s brojnim komplikacijama kao što su pankreatitis, perforacije, kolangitis i hemoragije, zbog čega se u današnje vrijeme primjenjuje samo u terapijske svrhe. Iako je to metoda izbora za neoperativne zahvate kod bolesti žučnog voda i bolesti gušterače, postoje i drugi komplementarni postupci, kao što su kompjuterska tomografija, magnetska rezonancija i endoskopski ultrasonograf (Biery, 2000).

1.2. UPALA

Skupni tkivni odgovor na upalotvornu noksu zove se upala. Kliničko očitovanje upalne reakcije tj. jakost, kinetika, utjecaj na funkciju organa i ishod, određeno je odnosom dvaju velikih skupina suprotstavljenih mehanizama: upalotvornim i upalostatskim procesima. Pri susretu s upalotvornom noksom čovjekov organizam pokreće stereotipizirane upalne mehanizme kojima se nastoji ograničiti ili ukloniti noksu i nastala tkivna oštećenja. Zbog toga je upala osnovni homeostatički mehanizam održavanja ustrojbene i djelatne cjelovitosti tkiva. U kliničkom smislu upala se očituje akutnim, subakutnim i kroničnim tijekom (Gamulin, 2005).

1.3.1. AKUTNA FAZA UPALE

Upala istodobno uključuje lokalne tkivne procese i sustavne procese. Uobičajeni znakovi i simptomi koji opisuju klinička svojstva akutnog lokalnog upalnog događanja su „calor, dolor, rubor, tumor et functio laesa“. Navedene pojave potječu od snažnog oksidativnog metabolizma u upaljenu tkivu u neutrofilima i makrofagima. Osnovni obrazac akutne lokalne upale obuhvaća 1) infiltraciju i pobudu upalotvornih stanica, 2) pokretanje biokemijskih pojačivačkih upalotvornih mehanizama, 3) promjena propusnosti i otpornosti krvnih žila i 4) određeni stupanj promjene arhitekture tkiva i funkcije upaljenog tkiva.

Za vrijeme akutne lokalne upale u organizmu se pokreću sustavni upalni procesi, koji se još nazivaju odgovorom akutne faze. To su 1) akutnofazni odgovor središnjeg živčanog sustava, 2) akutnofazni odgovor jetre, 3) vrućice, 4) katabolička reakcija, 5) ubrzanje energijskog metabolizma i 6) sekundarne promjene pojedinih funkcijskih sustava (Gamulin, 2005).

1.3.2. SUBAKUTNA FAZA UPALE

Subakutna faza upale ima kliničke značajke akutne i kronične faze upale. To je faza zacijeljivanja i obnavljanja. Rast vezivnog tkiva pruža potporu rastu kapilara u oštećenom području. Štetne tvari se neutraliziraju i vidljivi znaci upale se povlače (Gamulin, 2005).

1.3.3. KRONIČNA FAZA UPALE

Kronična upala može slijediti akutnu upalu ili upalni odgovor može biti kroničan od početka. Prijelaz akutne u kroničnu upalu javlja se kada akutni upalni odgovor ne može biti ukonjen ili zbog daljnjeg postojanja štetnog agensa ili pak zbog neke interferencije s normalnim procesom cijeljenja. Kronična upala najčešće počinje kao primarni proces. Karakterizirana je infiltracijom mononuklearnim stanicama koje uključuje makrofage, limfocite i plazma-stanice., razaranjem tkiva i fibrozom. U početnoj fazi kronične upale navedene stanice čine histološku sliku granulacije odnosno granuloma, a u kasnijim fazama prevladavaju vezivotvorni i angiogenetski procesi. U upalnom području se uglavnom sintetiziraju proteoglikani i kolagen. Svojstva tkiva koje je zahvaćeno kroničnom upalom uključuju „stezanje“ zarobljenog tkiva fibroznim dijelovima, tvrđu konzistenciju, deformacije, manji ili veći stupanj opstrukcije izvodnih kanala i krvnih žila, te smanjenje djelatne pričuve organa (Gamulin, 2005).

1.3.4. Proteini akutne faze

Akutnofazni odgovor jetre očituje se promjenama proteina akutne faze. Njihova koncentracija višestruko raste unutar 24 sata. Citokini, pretežito IL-1, IL-6 i TNF- α te mnogi drugi sekundarni citokini u jetri mijenjaju program genskog očitovanja. Rezultat je takvog procesa jest povećanje ili smanjenje sinteze proteina. Prvo navedene nazivamo pozitivnim proteinima akutne faze, a druge negativnim proteinima akutne faze. Proteini akutne faze razlikuju se po svojoj funkciji i građi ali imaju zajedničke obrambene zadaće. Nalaze se normalno u plazmi u niskim koncentracijama koje izražavamo u mg/L. Porast koncentracije komponenata komplekta povećava aktivnost komplementarnog sustava i na taj način dolazi do nakupljanja leukocita na mjestu oštećenja te posreduje lizu i konačno odstranjenje bakterija ili oštećenih stanica. Dok proteini kolagulacijskog sustava, kao na primjer fibrinogen, osim što sudjeluje u koagulaciji potiče i cijeljenje oštećenog tkiva. Inhibitori proteaza imaju protuuplano djelovanje. Vežu se za lizosomske enzime oslobođene iz leukocita i tako ih neutraliziraju. Proteini koji vežu hemoglobin ili hem, sprečavaju gubitak željeza i smanjuju njegovu dostupnost bakterijama. Porast koncentracije ceruloplazmina povećava količine bakra za tkiva.

1.3.5. CITOKINI

Citokini su topljivi polipeptidi koji uz hormone i neurotransmitore predstavljaju glavni oblik komunikacije između stanica i time usklađuju njihovu funkciju. Izlučuju se u kaskadi i stvaraju citokinsku mrežu u kojoj se djelovanje mnogih citokina preklapa (pleotropizam i redundancija). Mogu djelovati na stanice koje ih izlučuju kao autokrini, na stanice u njihovoj blizini kao parakrini i na udaljene stanice kao endokrini. Citokini djeluju u vrlo malim koncentracijama (pmol/L) i imaju kratak poluvijek života (minute), zbog čega im je u normalnim okolnostima učinak uglavnom lokalni i ograničen na mjesto djelovanja uljeza. Vežu se na specifične membranske citokinske receptore na različitim stanicama, a do konačnog biološkog odgovora dolazi putem drugog glasnika. Biološki odgovor na citokine podrazumjeva povećanje ili smanjenje ekspresije membranskih proteina, lučenje efektorskih molekula i proliferaciju (Štraus, 2009).

1.3.5.1. Citokinski receptori

Kao što smo objasnili, citokini djeluju preko specifičnih membranskih citokinskih receptora koji se mogu svrstati u nekoliko porodica na temelju njihove strukture i aktivnosti.

Razlikujemo imunoglobulinsku, hematopoietsku, interferonsku i kemokinsku porodicu i porodicu receptora faktora tumorske nekroze. Receptor za interleukin-6, citokin koji smo određivali u ovom istraživanju, pripada porodici hematopoietskih receptora. Tu porodicu receptora čine dimeri i trimeri koji imaju specifične podjedinice za pojedini citokin i podjedinice za prijenos signala (Štraus, 2009).

1.4. C-REAKTIVNI PROTEIN I INTERLEUKIN-6

1.4.1. C-REAKTIVNI PROTEIN

Povijest C-reaktivnog proteina započinje s William S. Tillettom i Thomasom Francisom, Jr. koji su 1930. godine otkrili novi antigen bakterije *pneumococcus* kojeg su nazvali Fragment C. Testirali su njegove imunološke reakcije koristeći serum pacijenata s pneumonijom i otkrili da sa serumom pacijenata koji su bili u ranoj, akutnoj fazi upale dolazi do snažne precipitacijske reakcije, koja slabi i nestaje kako se pacijent oporavlja. Također su otkrili da reakcija nije specifična samo za pneumokokna infekcije, već se javlja i kod drugih bolesti kao na primjer bakterijski endokarditis i akutna reumatska groznica. Nekoliko godina kasnije Oswald T. Avery, Theodore J. Abernethy i Colin MacLeod ustanovili su da supstanca koja reagira na Fragment C je zapravo protein koji je tako dobio ime C-reaktivni protein (<http://centennial.rucare.org>). Gen za CRP nalazi se na prvom kromosomu, (1q21-q23). Građen je od pet istovjetnih, neglikoziliranih podjedinica koje formiraju prsten s centralnom prazninom. Svaka podjedinica građena je od jednolančanog polipeptidnog lanca koji sadrži 224 aminokiselinskih ostataka molekulske mase 23,017 daltona. Zbog navedenih strukturnih obilježja CRP se ubraja u obitelj proteina pentraksina, kalcij-vezujućih proteina koji imaju svojstva imunološke obrane. Sinteza CRP-a odvija se velikom brzinom u jetri, indukcijom interleukina-6 koji pripada obitelji citokina.



Slika 1. Shematski prikaz pentamerne strukture CRP

Tablica 1. Referentni intervali C- reaktivnog proteina za različite dobne skupine (Štraus,2009)

Pretraga/analit	Preporučena metoda	Jedinica	Spol	Dob	Referentni interval
C- reaktivni protein	Imunonefelometrija	mg/L	muški, ženski	1-20 dana	0,1-4,1
				2 mj.-15 g.	0,1-2,8
				≥ 20 g.	< 5,0

Sinteza izvan jetre ne pridonosi koncentraciji CRP-a u serumu koji se koristi kao uzorak. U fiziološkim uvjetima omjer sinteze CRP-a iznosi 1-10 mg/dan, s povećanjem iznad 1g/dan u akutnom upalnom procesu.

Biološka aktivnost CRP-a određena je njegovom sposobnošću vezanja velikog broja endogenih i egzogenih liganda, čime se oni uklanjaju iz krvi i tkiva procesom opsonizacije. U prisutstvu kalcijevih iona može se vezati na endogene produkte nekroze i istrošene stanice vezanjem na fosforilkolin, DNA i histone. CRP se jedino veže na stanicu domaćina ako je poremećena struktura lipidnog dvosloja, tj., ako su unutrašnji fosfolipidi izloženi na vanjskoj strani membrane. Najvažnija egzogena čestica za koju se CRP veže je fosforilkolin koji se nalazi u staničnom zidu bakterije, gljiva i parazita. Jednom kad se CRP veže na ligand, aktivira se veliki broj biokemijskih reakcija koje rezultiraju uklanjanjem liganda iz krvi i tkiva. Jedan od načina je aktivacija klasičnog puta komplementa, kojim se kompleks CRP-ligand uklanja pomoću makrofaga u krvi, tkivu i slezeni. C3b komponentu kompleta koja se nalazi na površini kompleksa, CRP-ligand prepoznaje preko receptora na makrofagu. Također, CRP se veže i na receptore limfocita.

Klinička važnost porasta koncentracije CRP-a u plazmi ili serumu jest u njegovoj indikatorskoj ulozi za akutne i kronične upale koje mogu biti praćene bakterijskom infekcijom, autoimune bolesti, nekrozu tkiva i malignitet. U slučaju akutnog procesa, primjerice traume, koncentracije CRP-a u plazmi povisuju se unutar 6 sati, vrhunac se postiže nakon 48 sati i koncentracija CRP-a se zatim smanjuje s poluvremenom od približno 19 sati. Jedno određivanje CRP-a korisno je samo za otkrivanje upale koja postoji unutar 3 dana od početka akutnog procesa. Povišene koncentracije CRP-a ukazuju na patološki proces, no nije

nužno. Primjerice, kod pušača i maratonaca prisutno je oštećenje tkiva i prateća upala dovoljna da uzrokuje manje povećanje CRP-a u uzorku. Također, ako je CRP unutar referentnih intervala, ne isključuje se i moguće postojanje nižeg stupnja akutne lokalizirane upale ili određene kronične bolesti kao što su sistemski eritematozni lupus, progresivna sistemska skleroza, dermatomiozitis i ulcerozni kolitis.

Najsnažniji pokretač reakcija akutne faze upale jest bakterijski endotoksin. Najviše koncentracije CRP-a, i do 500 mg/L, izazivaju infekcije s Gram-negativnim bakterijama. Infekcije Gram-pozitivnim bakterijama i parazitima uzrokuju skromnije povećanje koncentracije CRP-a, oko 100 mg/L. Virusne infekcije izazivaju najmanji porast koncentracije CRP-a, do 50 mg/L. Na temelju koncentracije CRP-a, može se razlikovati virusna od bakterijske infekcije.

Raspon koncentracije CRP-a 10-50mg/L povezuje se s blagom upalom, kao kod lokalne bakterijske infekcije, operativnog zahvata, duboke venske tromboze i većine virusnih infekcija. Koncentracija CRP-a do 100 mg/L predstavlja stanje višeg stupnja upalnog procesa koji zahtjeva intervenciju. Kada je koncentracija iznad 100 mg/L radi se o najčešće o bakterijskoj infekciji. Od svih proteina akutne faze koji se mogu jednostavno izmjeriti u laboratoriju, CRP je jedan od najosjetljivijih i najbržih odgovora na akutnu upalu (Thomas i sur., 1998).

Visoke razine CRP-a mogu se povezati i s faktorima rizika za aterosklerozu, poremećaj koja nastaje kao rezultat kroničnog upalnog procesa na endotelu krvnih žila. Rizničnim čimbenicima za pojačanu aterogenezu smatraju se: povijest obiteljskih bolesti koronarnih arterija, dislipidemija, hipertenzija, dijabetes melitus, pušenje, pretilost i sjedilački način života. Patogeneza ateroskleroze proučena je sve do njezinog početnog upalnog procesa koji ima ključnu ulogu u nastajanju, progresiji i destabilizaciji ateroma. Mjerenjem koncentracije CRP-a kao biljega upale, možemo procijenjivati dinamiku aterogeneze. Visoke koncentracije CRP-a koreliraju s višim stupnjem ateroskleroze. Dokazano je da zdravi pojedinci s visokim koncentracijama CRP-a imaju veći rizik za razvoj bolesti perifernih arterija. Povećanje koncentracije CRP-a, kao i IL-6 i TNF, povezuju se također i s abdominalnom pretilošću. Istraživanja otkrivaju pozitivan utjecaj dugotrajne fizičke aktivnosti na snižavanje koncentracije CRP-a i upalnih citokina kod djece i adolescenata, tj., utjecaj fizičke aktivnosti na prevenciju kardiovaskularnih bolesti (Santos i sur., 2008).

CRP je također primjenjiv kao biljeg aktivacije imunološkog sustava kod pacijenata s karcinomom. U tom se slučaju koristi visoko osjetljiv test kojim se mjeri vrlo niska koncentracija CRP-a, takozvani Low-Reactive Protein (LRP). Serijskim mjerenjem L-CRP-a u serumu pacijenata oboljelih od naprednog melanoma i karcinoma jajnika dokazano je postojanje jasnog ciklusa izlučivanja CRP-a. Koncentracije L-CRP-a su u porastu tijekom početka i u opadanju pri završetku imunološkog odgovora što upućuje na regulirani anti-tumorski odgovor imunološkog sustava kod pacijenata koji su oboljeli od karcinoma. Mjerenje koncentracije CRP-a koristi se za predviđanja rizika oboljenja od karcinoma, otkrivanja povratka karcinoma i procjenu progresije karcinoma (Coventry i sur., 2009).

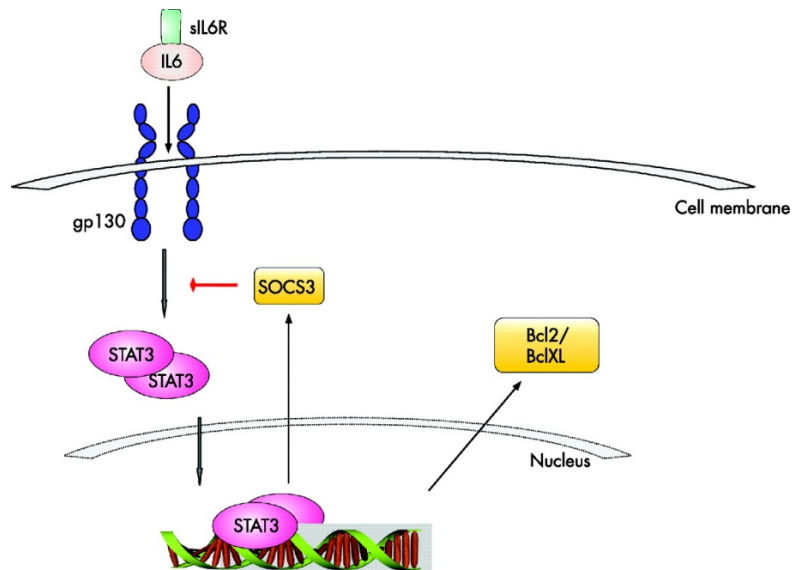
Istraživanja otkrivaju povezanost depresije i značajnih biljega upale, pa tako i CRP-a. Mehanizam porasta nije razjašnjen. Jedno objašnjenje je da depresija utječe na nekoliko posrednika povezanih s povećanjem upalnog stanja, kao što je povećanje simpatičke i smanjenje parasimpatičke živčane aktivnosti, te pretjerani stupanj sjedilačkog načina života što doprinosi povećanom otpuštanju IL-6 i CRP-a. Drugo objašnjenje kreće od upalnog procesa, da uređenje i raspodjela upalnih citokina i drugih upalnih čimbenika mogu uzrokovati simptome bolesti kao što su anhedonija, poremećaj spavanja i apetita koji podsjećaju na depresiju. Dokazano je da dugotrajno visoke koncentracije CRP-a ubrzavaju pojavu simptoma depresije u sljedećih pet godina (Howren i sur., 2007)

Zbog jednostavnog određivanja koncentracije u serumu i najbolje kliničke i epidemiološke korelacije, CRP je poseban biljeg koji omogućava otkrivanje novih načina prevencije i liječenja mnogih učestalih bolesti te smanjenju motbiditeta i mortaliteta.

1.4.2. INTERLEUKIN-6

Važnu ulogu u povijesti IL-6 imalo je otkriće uloge T i B limfocita u sintezi antitijela. Otkriveno je da B limfociti proizvode antitijela samo uz prisutstvo T limfocita, koji su odgovorni za postojanje faktora rasta i diferencijacije B limfocita. Daljnja istraživanja su dovela do izolacije komplementarne DNA za jedan od faktora stimulacije B limfocita, koji se danas zove IL-6. Pokazalo se da je IL-6 proučavan do tada pod različitim imenima, kao B limfocitni stimulirajući faktor 2, IFN- β 2, 26-kD protein, hibridoma/plazmocitom faktor rasta te hepatocitni stimulirajući faktor koji inducira različite proteine akutne faze uključujući CRP, β 2-fibrinogen, amiloidni protein, haptoglobin, hemopeksin. Humani IL-6 čine 184

aminokiseline, s dva potencijalna mjesta za N-glikozilaciju i četiri cisteinska ostatka. IL-6 je pleotropni, α -helikalni citokin koji ima važnu ulogu u reakcijama akutne faze upale, hematopoezi, koštanoj srži i onkogenezi. Izlučuju ga različite vrste imunoloških i neimunoloških stanica, kao što su T i B limfociti, monociti, fibroblasti, keratinociti, endotelne stanice i određene stanice tumora. Pleotropija i redundancija IL-6 utvrđene su karakterizacijom jedinstvenog receptorskog sustava, koji sadrži dva funkcionalna proteina: specifični receptor za IL-6 (IL-6R) i glikoprotein 130 (gp130) receptorska komponenta nekoliko citokina. Stimulacija stanica s IL-6 aktivira tirozin fosforilaciju citoplazmatskih proteina. Otkrivene tirozin kinaze svrstane su u JAK (Janus kinaza) obitelj. Također je izoliran i transkripcijsku faktor Stat3, koji nakon aktivacije JAK kinaze koje su povezane s receptorima za citokine, formira dimer nakon čega slijedi njegova translokacija u jezgru. Referentni interval za IL-6 u serumu ili plazmi iznosi <10 pg /mL.



Slika 2. Shematski prikaz stimulacije stanice s IL-6

Povišene koncentracije IL-6 otkrivene su kod pacijenata sa srčanim miksomom, reumatoidnim artritisom i Castlemanovom bolesti. U takvim upalnim bolestima nije povišen samo IL-6, već i topljivi receptor IL-6R, tako da kompleks IL-6 i IL-6R stimuliraju gp130 i induciraju upalne signale. Terapija ovih pacijenata zbog toga se temelji na pokušaju blokiranja IL-6 signalizacije, koja je inducirana interakcijom IL-6 s IL-6R na površini stanice, i neutralizacije topljivih receptora s anti-IL-6R antitijelima (Kishimoto, 2010). Određivanje koncentracije IL-6 prikladan je prognostički parametar za sepsu, traumu, zatajenje srce i ranu dijagnozu neonatalne sepsu. Povišene koncentracije IL-6 upućuju na pokrenuti upalni odgovor u organizmu. Tijekom analize potrebno je uzeti u obzir da IL-6 mogu izlučivati imunološke i

neimunološke stanice. Monociti i makrofagi izlučuju IL-6 unutar nekoliko sati nakon doticaja s bakterijom i/ili bakterijskim toksinom, što ga čini dobrim indikatorom mogućeg razvoja neonatalne sepse kod visokorizičnih novorođenčadi. Tkivna hipoksija i trauma uzrokuju značajno otpuštanje IL-6 iz neimunoloških stanica. Otpuštanje IL-6 in vivo je zbog toga prikladno za određivanje opsega oštećenja organa i/ili periferne hipoksije (Thomas i sur., 1998).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Broj oboljelih od opstruktivne žutice raste iz godine u godinu, a uzroke možemo tražiti u općenitom porastu oboljelih od malignih bolesti te porastu incidencije kamenaca bilijarnog sustava. Patogeneza bolesti obilježena je i sustavnim upalnim odgovorom organizma koji možemo procjenjivati biokemijskim upalnim biljezima –citokonima i proteinima akutne faze. Opstojanje opstrukcije protoka žuči oštećuje jetreni parenhim što potiče nespecifični imunološki obrambeni odgovor organizma, aktivaciju T limfocita i makrofaga koji luče citokine, a oni nadalje stimuliraju sintezu proteina, u prvom redu fibrinogena i C-reaktivnog proteina, stimuliraju ekspresiju adhezijskih molekula i tumor-nekrotizirajućeg čimbenika.

Benignu opstruktivnu žuticu uzrokovanu žučnim kamencima najčešće prate lezije jetrenog parenhima (evidentirane ultrazvučnom dijagnostikom) te posljedično oštećenje ekskrecijske i sintetske jetrene funkcije.

Endoskopska retrogradna kolangiopankreatografija (ERCP) invazivna je medicinska dijagnostička i terapijska metoda kojom se uspostavlja opstruirani protok žuči. Postupak nosi rizik od ozbiljnih komplikacija kao što su primjerice pankreatitis, perforacije, kolangitis, hemoragije. Stupanj ERCP komplikacija uvelike ovisi o upalnom odgovoru. Stoga je procjena stupnja upale na temelju praćenja koncentracije biokemijskih biljega u krvi mogući put ka procjeni mogućih komplikacija nakon postupka ERCP.

Cilja ovog rada bio je istražiti stupanj upalnog odgovora na stanje uznapredovale benigne opstruktivne žutice te stupanj upale nakon medicinskog postupka ERCP. Procjena mogućeg rizika od komplikacija nakon ERCP mogla bi se temeljiti na procjeni stupnja upalnog odgovora.

Specifični ciljevi:

1. Izmjeriti koncentracije ukupnog bilirubina, citokina IL-6 i CRP u serumu bolesnika s obstruktivnim ikterusom neposredno prije postupka ERCP.
2. Izmjeriti koncentracije ukupnog bilirubina, citokina IL-6 i CRP u serumu iste skupine bolesnika 12 sati nakon primijenjenog postupka ERCP.
3. Usporediti rezultate mjerenja prije i poslije ERCP te procijeniti utjecaj ERCP na upalno stanje organizma.

4. Istražiti međuovisnosti IL-6 i CRP i bilirubina u svakoj seriji mjerenja.
5. Procijeniti doprinos laboratorijskih mjerenja u procjeni uspješnosti terapije ERCP metodom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI I UZORCI

U istraživanje je uključeno 28 bolesnika (14 ženskog spola i 14 muškog spola) s benignom opstruktivskom žuticom koji se liječe na Zavodu za gastroenterologiju bolnice Dubrava. Kod svih bolesnika s opstruktivskom žuticom provedena je endoskopska bilijarna dekompresija. Ispitanicima je uzeta venska krv iz kubitalne vene u epruvete s antikoagulansom, neposredno nakon i 12 sati poslije dekompresije. Izvađena krv se nakon zgrušavanja centrifugirala brzinom od 3500 ok/min te se odvojio serum. U serumu su određivane koncentracije C-reaktivnog proteina, IL-6 i ukupnog bilirubina. Uzorci su obrađeni u Kliničkoj bolnici „Sestre milosrdnice“, na Zavodu za kliničku kemiju i Kliničkoj bolnici Dubrava, na Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku.

3.2. ANALITIČKE METODE

3.2.1. Određivanje CRP-a imunoturbidimetrijskom metodom na analizatoru Olympus 2700

C-reaktivni protein određivan je u serumu kvantitativnom visokoosjetljivom imunoturbidimetrijskom metodom na analizatoru Olympus 2700. Reagens CRP Latex (kat. br. OSR 6299), kalibratori i kontrolni uzorci, kao i instrument, istog su proizvođača – Beckman Coulter, Inc., Fullerton, SAD.

Načelo metode temelji se na stvaranju kompleksa između specifičnih antitijela vezanih na čestice lateksa, koji se u obliku suspenzije nalazi u reagensu i humanog CRP-a u uzorku seruma. Nastali sadržaj netopljivih agregata izmjeren spektrofotometrijski na valnoj duljini od 340 nm, proporcionalan je koncentraciji CRP u ispitivanom serumu. Mjerno područje metode je 0,07 - 480 mg/L. Što znači da je, donja granica detekcije (najniža mjerljiva koncentracija) 0,07 mg/L, a linearnost do 480 mg/L.

3.2.2. Određivanje IL-6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metodom

Koncentracija humanog IL-6 određena je ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodom. Korišten je Human IL-6 Platinum ELISA kit BMS213/2 (proizvođača eBioscience, San Diego, SAD). Anti-humana IL-6 antitijela vezana su za čvrstu fazu mikrotitarske pločice. Na njih se vežu humani IL-6 koji se nalazi u uzorcima i standardima. Dodatkom biotin-konjugata (anti-humana IL-6 antitijela) nastaje kompleks s antigenom iz uzorka, vezanim za antitijelo na čvrstoj podlozi. Uspostavljanjem ravnoteže u sustavu, slobodna antitijela i slobodni kompleksi antigen-antitijelo uklanjaju se ispiranjem. Antigeni vezani za čvrstu fazu detektiraju se konjugatom streptavidin-HRN, a kao supstrat koristi se tetrametilbenzidin (TMB). Absorbancija se mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini 450 nm.

Kvantifikacija IL-6 u uzorcima radi se usporedbom absorbancija s referentnom krivuljom koja se dobije mjerenjem absorbancija sedam standardnih otopina poznatih koncentracija, u rasponu vrijednosti od 1.56 – 100.00 pg/mL IL-6.

3.2.2.1. Postupak određivanja IL-6

- Koncentrat otopine za ispiranje (Wash Buffer) volumena 50 ml razrijediti s destiliranom vodom do volumena 1000 ml
- Koncentrat otopine Assay Buffer volumena 5 ml razrijediti s destiliranom vodom do volumene 100 ml
- Pripremiti standardne otopine (S1 – S7) tako da u svih sedam epruveta dodamo 225 µl Assay Buffer otopine, te u prvu epruvetu pipetiramo 225 µl rekonstituiranog standarda, aspiriramo i prenosimo 225 µl u sljedeću epruvetu. Nakon što taj postupak napravimo sa svih sedam epruveta, dobili smo serijsko razrijeđene, sedam koncentracija za kreiranje standardne krivulje
- Uzorke seruma termostatirati na sobnu temperaturu
- Isprati mikrotitarsku pločicu dva puta po 400 ml Wash Buffer-a
- Pipetirati 100 µl Assay Buffer otopine u jažicu koja predstavlja slijepu probu

- Pipetirati 100 µl svakog standarda (S1-S7) u duplikatu
- Dodati 50 µl Assay Buffer otopine u sve ostale jažice
- Dodati 50 µl uzorka u svaku jažicu
- Dodati 50 µl biotin-konjugata u sve jažice
- Prekriti mikrotitarsku pločicu adhezivnom folijom i inkubirati na sobnoj temperaturi 2h uz miješanje na 100 rpm
- Nakon inkubacije, foliju ukloniti i isprazniti jažice, te isprati mikrotitarsku pločicu četiri puta
- Dodati 100 µl razrijeđenog Streptavidin-HRP u sve jažice
- Prekriti folijom mikrotitarsku pločicu i inkubirati na sobnoj temperaturi 1h uz miješanje na 100 rpm
- Ukloniti foliju i isprazniti jažice, te isprati četiri puta
- Pipetirati 100 µl TMB supstrata u sve jažice i inkubirati na sobnoj temperaturi otprilike 10 minuta u tamnom
- Preporučljivo je dodati 100 µl stop-otopine u sve jažice kada najviši standard razvije tamnoplavu boju
- Očitati apsorbanciju reakcijske otopine u jažicama unutar 1h koristeći čitač mikrotitarskih pločica na valnoj duljini 450 nm

3.2.2.2. Izračunavanje koncentracije IL-6 u serumu

Nakon očitavanja apsorbancije standarda konstruira se baždarna krivulja sa poznatim apsorbancijama na ordinati i koncentracijama humanog IL-6 na apscisi. Za određivanje koncentracije humanog IL-6 iz uzorka, potrebno je na ordinati pronaći dobivenu apsorbanciju za uzorak i povući horizontalnu crtu te na presjecištu sa standardnom krivuljom povući okomicu na apscisu i očitati koncentraciju za određeni uzorak. Tijekom samog ELISA postupka, uzorci su bili razrijeđeni 1 : 2 , stoga se koncentracije očitane iz standardne krivulje moraju pomnožiti sa faktorom razrijeđenja (x 2) .

3.2.3. Određivanje ukupnog bilirubina fotometrijskim testom bojanja na Beckman Coulter analizatoru

Uzorak u kojem se određuje ukupni bilirubin može biti serum i EDTA plazma ili heparinizirana plazma. Uzorke je potrebno zaštititi od svjetlosti. Načelo testiranja temelji se na reakciji u kojoj stabilizirana diazonijeva sol, 3,5-diklorfenil-diazonij-tetrafluoroborat (DPD), u reakciji s konjugiranim bilirubinom izravno, a sa nekonjugiranim bilirubinom u pristunosti akceleratora daje azobilirubin. Apsorpcija na 540 nm proporcionalna je ukupnoj koncentraciji bilirubina. U serumskim uzorcima koji su se koristili u ovom istraživanju, ukupni bilirubin se određivao na AU2700 Beckman Coulter analizatoru (SAD) na Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava.

3.3. STATISTIČKE METODE

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2010, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc v. 12.2.1.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Korištenjem deskriptivne analize prikazani su dobiveni podaci, a skupovi podataka ispitani su Kolmogorov-Smirnovljevim statističkim testom na normalnost raspodjele. Ako distribucija podataka ne bude slijedila Gaussovu raspodjelu koristi ćemo neparametrijske testove analogne parnom t-testu, te podatke opisivati medijanom i rasponom. Za ispitivanje sukladnosti varijabli koja govori o njihovoj povezanosti korišten je statistički postupak izračunavanja korelacije, kojim se dobiva Spearmanov koeficijent korelacije (ρ) koji predstavlja neparametrijsku inačicu koeficijenta korelacije i njegova statistička značajnost P koja ukazuje postoji li značajno odstupanje od linearnosti. Vrijednosti $P < 0,05$ statistički su značajne. Koeficijenti korelacije tumače se prema Coltonu (Tablica 2.). Za utvrđivanje postotka povezanosti između varijabli izračunat je i koeficijent determinacije (R^2).

Povezanost parnih varijabli u dva mjerenja procjenjeno je Spearmanovim testom. Rezultati su prikazani grafičkim prikazom histograma kojim se može primjetiti da raspodjela podataka ne slijedi Gaussovu krivulju, zatim, pravcem regresije s jednadžbom $y = a + bx$, gdje „a“ predstavlja odsječak na osi y u kojem pravac siječe ordinatu, a „b“ nagib pravca, tj. porast na osi y za jedinični porast na osi x, uz naznačene granice pouzdanosti od 95% i granice predviđenih vrijednosti od 95%. U sklopu regresijske raščlambe prikazane su i standardne

pogrješke prognoze ili rezidue (ostaci) koje predstavljaju mjeru rasipanja rezultata oko pravca regresije.

Za utvrđivanje postojanja statistički značajne razlike između varijabli prije i poslije dekompresije, korišten je neparametrijski Wilcoxonov test. Usporedba varijabli skupine A i skupine B prikazana je grafikonom (*eng.* box and whiskers) u kojem možemo uspoređivati medijane, minimume i maksimume, te odstupajuće vrijednosti.

Tablica 2. Tumačenje koeficijenta korelacije r prema Coltonu

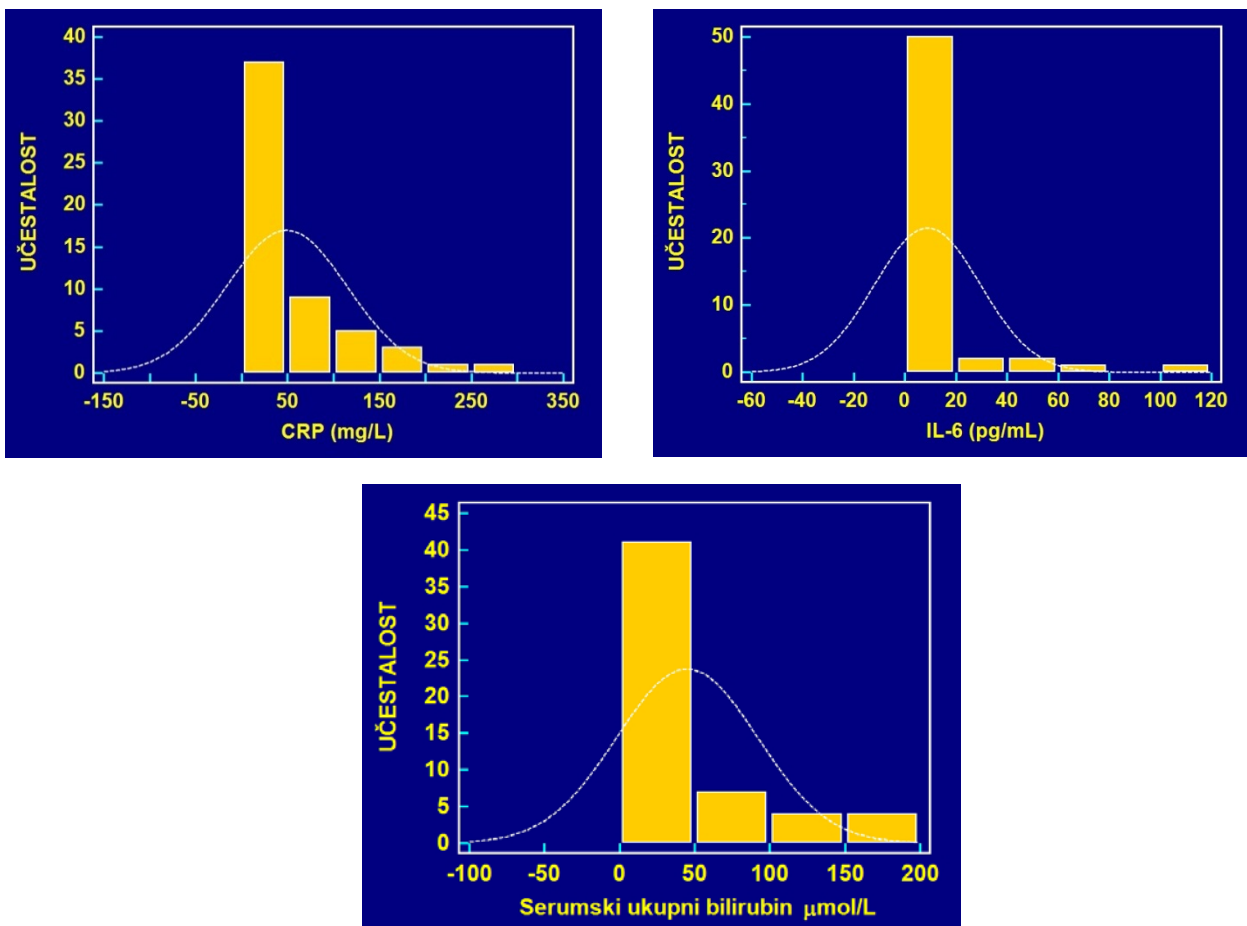
KOEFICIJENT KORELACIJE (r)	POVEZANOST
0 do $\pm 0,25$	nema povezanosti
$\pm 0,26$ do \pm	slaba povezanost
$\pm 0,51$ do $\pm 0,75$	umereno do dobra povezanost
$\pm 0,76$ do ± 1	dobra do izvrsna povezanost

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

4.1.1. Prikaz rezultata kroz deskriptivnu statistiku

U istraživanju je sudjelovalo 28 bolesnika koji boluju od opstruktivne žutice te koji su vadili krv neposredno prije i 12 sati nakon endoskopske bilijarne dekompresije. Na njihovim uzorcima provedena su mjerenja serumskog ukupnog bilirubina, IL-6 i CRP. Skupina A predstavlja skup rezultata analiza uzoraka koji su dobiveni neposredno prije endoskopske bilijarne dekompresije, a skupina B je skup rezultata analiza uzoraka dobivenih 12 sati poslije endoskopske bilijarne dekompresije.



Slika 3 . Grafički prikaz histograma koji pokazuje kakvu raspodjelu slijede podaci mjerenja.

Iz prikaza histograma vidi se da dobiveni podaci ne slijede normalnu raspodjelu. Krivulja je nagnuta u desnu stranu. Najučestalije koncentracije CRP nalaze se u rasponu 0-50 mg/L a IL-6 u rasponu od 0-20 pg/mL.

Tablica 3. Prikaz referentnih intervala za zdravu populaciju.

Analit	Mjerna jedinica	Spol	Dob	Referentni interval
Uk. bilirubin	μmol/L	M, Ž	≥ 20 g.	3 -20
CRP	mg/L	M, Ž	≥ 20 g.	< 5, 0
IL-6	pg/mL	M, Ž	nije definirana	< 10 pg/mL

Tablica 4. Statistička obilježja skupova podataka grupe A i B za izmjerene koncentracije CRP, IL-6 i serumski ukupni bilirubin.

	SKUPINA A			SKUPINA B		
	UK. BILIRUBIN (μmol/L)	CRP mg/L	IL-6 (pg/mL)	UKUPNI BILIRUBIN (μmol/L)	CRP mg/L	IL-6 (pg/mL)
N	28	28	28	28	28	28
Srednjavrijednost	57,2	51,6	6,9	32,5	46,1	10,6
95% CI	37,1 – 77,4	21,9 - 81,3	0,1 - 13,6	17,5 - 47,4	25,1 - 67,1	1,4 - 19,8
SD	51,93	76,59	17,54	38,55	54,09	23,74
SEM	9,8	14,4	3,3	7,2	10,2	4,4
Medijan	34,1	13,0	0,5	17,6	17,3	1,1
95% CI	19,1 – 76,3	4,3 - 40,7	0,0 - 3,1	12,7- 25,0	7,5 - 61,7	0,2 - 6,5
Minimum	9,9	0,9	0,0	8,0	0,9	0,0
Maksimum	181,0	290,8	77,2	169,0	190,9	114,0
5-95 percentili	10,9 – 166,6	1,4 - 241,2	0,0 - 58,7	8,0 - 117,7	2,6 - 181,5	0,0 - 57,4
P (testiranje na distribuciju)	0,0580	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0066	<0,0001

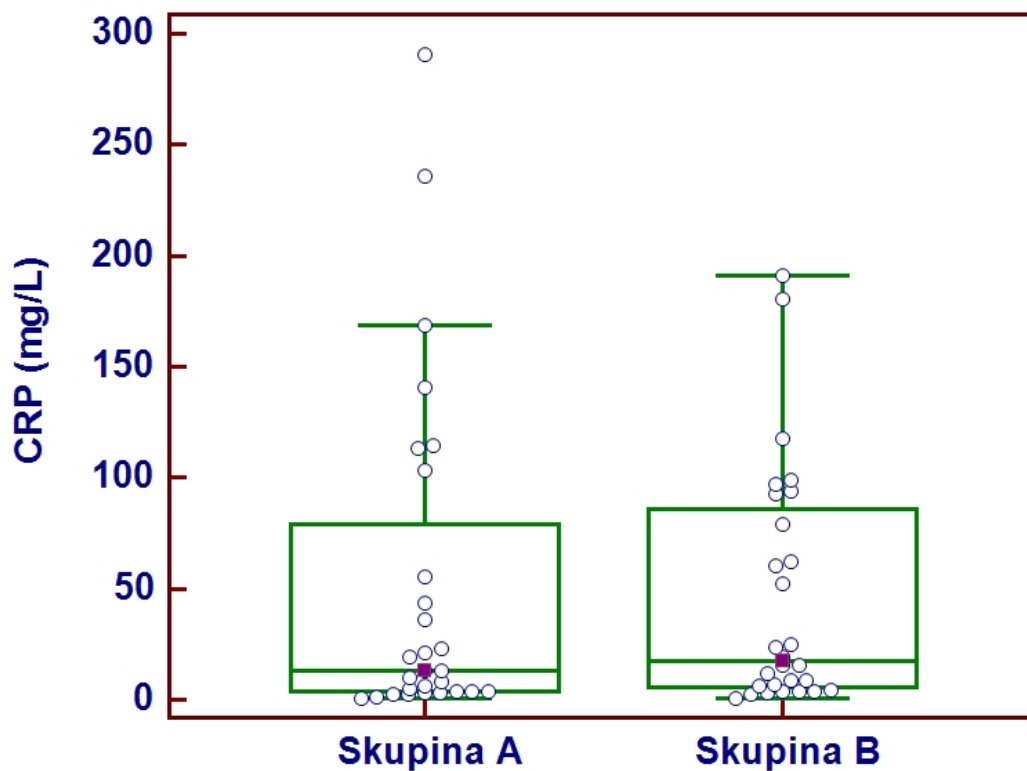
U tablici 4. prikazan je skup podataka skupine A i B, za izmjereni C-reaktivni protein, interleukin 6 i ukupni bilirubin. Statističkom obradom podataka prikazali smo broj uzoraka (N), srednju vrijednost, 95%-tni interval pouzdanosti aritmetičke sredine (95% CI), standardnu devijaciju (SD), standardnu pogrešku aritmetičke sredine (SEM), medijan, 95% interval pouzdanosti za medijan (95% CI), minimum i maksimum čiji raspon je mjera rasapa podataka, 25-75 percentila koji predstavljaju 25-75% dio distribucije i parametar P koji predstavlja statistički značajnu povezanost. Distribucija podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim statističkim testom kojim dobivamo parametar P. Testiranje je pokazalo da se distribucije svih podataka značajno razlikuju od normalne raspodjele osim bilirubina u prvoj seriji mjerenja ($P < 0.05$). Dakle, u daljnjim statističkim obradama podataka koristit ćemo neparametrijske testove za nenormalnu raspodjelu.

Usporedbom referentnih intervala za CRP i IL-6 (Tablica 3.) sa srednjim vrijednostima za CRP i IL-6 (Tablica 4.) primjećujemo da se radi o povišenim koncentracijama i kod skupine A i kod skupine B.

4.1.2. Utjecaj endoskopske bilijarne dekompresije na upalni odgovor

4.1.2.1. Utjecaj endoskopske bilijarne dekompresije na koncentraciju CRP

Koncentracija C-reaktivnog proteina kod bolesnika s opstrukcijskom žuticom neposredno prije endoskopske bilijarne dekompresije ima uži raspon vrijednosti (9,9 – 181,0) od koncentracije CRP-a pacijenata poslije dekompresije (0,9 – 190,9).



Slika 4. Koncentracije CRP neposredno prije endoskopske bilijarne dekompresije (skupina A) i 12 sati nakon endoskopske bilijarne dekompresije (skupina B).

4.1.2.1.1. Značajnost razlike koncentracije CRP u skupinama A i B

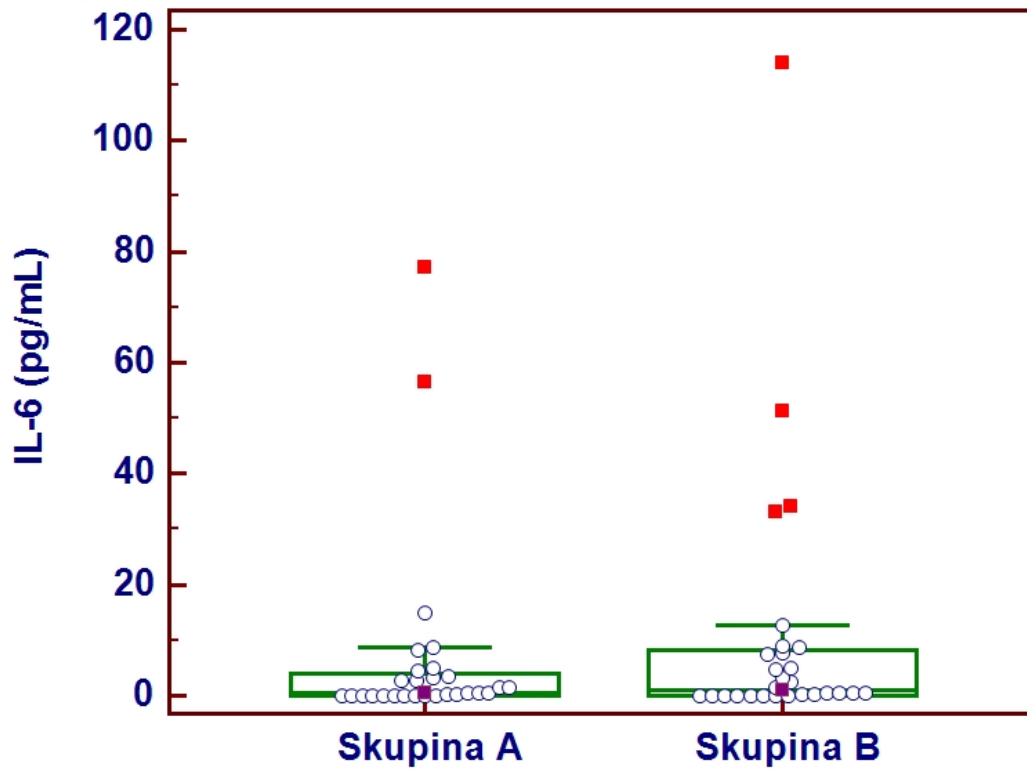
Tablica 5.: Prikaz podataka za CRP dobivenih Wilcoxonovim testom za parna mjerenja.

	SKUPINA A	SKUPINA B
Varijabla	CRP	CRP
N	28	28
Minimum	0,9	0,9
Maksimum	290,8	190,9
Medijan	13,0	17,3
95% CI	4,3-40,7	7,5-61,7
P	0,8101	

Serije podataka skupine A i B testirane su pomoću Wilcoxonovog parnog testa. Rezultati testiranja nisu pokazali postojanje statistički značajne razlike koncentracije CRP neposredno prije i 12 sati nakon endoskopske bilijarne dekompresije (P=0,8101).

4.1.2.2. Utjecaj endoskopske bilijarne dekompresije na koncentraciju IL-6

Mjerenja pokazuju da su uže vrijednosti koncentracije IL-6 kod bolesnika neposredno prije dekompresije (0,0 – 3,0) nego kod uzoraka 12 sati nakon dekompresije (0,2 – 6,5).



Slika 5. Koncentracije IL-6 neposredno prije endoskopske bilijarne dekompresije (skupina A) i 12 sati nakon endoskopske bilijarne dekompresije (skupina B).

4.1.2.2.1. Značajnost razlike koncentracije IL-6 u skupinama A i B

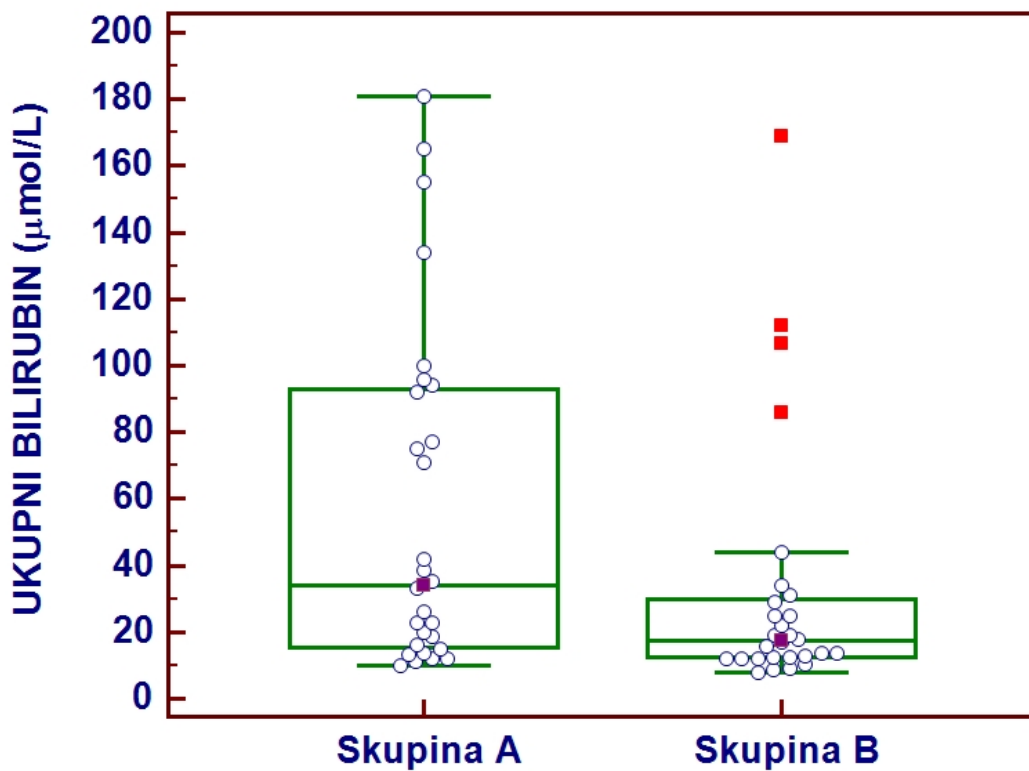
Tablica 5.: Prikaz podataka za IL-6 dobivenih Wilcoxonovim testom za parna mjerenja.

	SKUPINA A	SKUPINA B
Varijabla	IL-6	IL-6
N	28	28
Minimum	0,0	0,0
Maksimum	77,2	114,0
Medijan	0,5	1,1
95% CI	0,0 – 3,0	0,2 – 6,5
P	0,4761	

Obradom podataka skupine A i B za IL-6 Wilcoxonovim parnim testom izračunat je $P=0,4761$ što znači da se koncentracije IL-6 ne razlikuju statistički značajno ako su izmjerene neposredno prije i 12 sati nakon endoskopske bilijarne dekompresije.

4.1.2.3. Utjecaj endoskopske bilijarne dekompresije na koncentraciju ukupnog serumskog bilirubina

Koncentracija ukupnog serumskog bilirubina kod bolesnika neposredno prije endoskopske bilijarne dekompresije ima širi raspon vrijednosti (9,9-181,0) od koncentracije ukupnog bilirubina kod pacijenata 12 sati nakon endoskopske bilijarne dekompresije (8,0-169,0).



Slika 10. Koncentracije ukupnog bilirubina prije endoskopske bilijarne dekompresije (skupina A) i 12 sati nakon endoskopske bilijarne dekompresije (skupina B).

4.1.2.3.1. Značajnost razlike koncentracije ukupnog serumskog bilirubina u skupinama A i B

Tablica 5. Prikaz podataka za ukupni serumski bilirubin dobivenih Wilcoxonovim testom za parna mjerenja.

	SKUPINA A	SKUPINA B
Varijabla	UK. BILIRUBIN	UK. BILIRUBIN
N	28	28
Minimum	9,9	8,0
Maksimum	181,0	169,0
Medijan	34,1	17,6
95% CI	19,1-76,2	12,7-25,0
P	0,0006	

Wilcoxonovim testom za ukupni serumski bilirubin dobiven je $P=0,006$, što znači da se mjerenja ukupnog bilirubina 12 sati neposredno prije i 12 sati poslije endoskopske dekompresije statistički značajno razlikuju.

4.1.3. Međuovisnost protuupalnog citokina IL-6 i CRP

4.1.3.1. Međuovisnost protuupalnog citokina IL-6 i CRP skupine A

Statističkom obradom podataka 28 uzoraka dobivenih neposredno prije endoskopske bilijarne dekompresije (skupina A) izračunat je Spearmanov koeficijent korelacije $\rho=0,501$ ($P= 0,0066$, 95% CI: 0,2 – 0,7) što prema Coltonu označava slabu povezanost.

Tablica 6. Korelacija CRP i IL-6 skupine A.

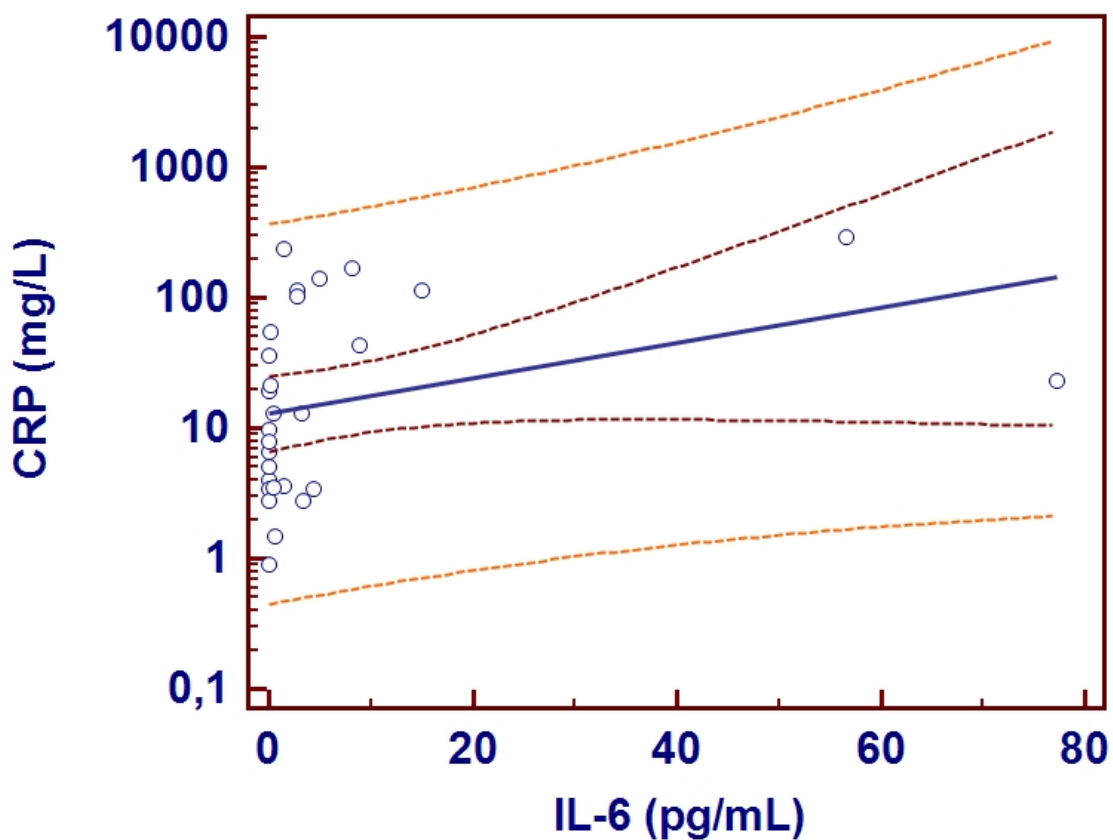
N	28
ρ (rho)	0,501
Kategorija povezanosti prema Coltonu	slaba povezanost
95% CI	0,2 – 0,7
P	0,0066

U tablici 6. Prikazani su podaci dobiveni korelacijskim postupkom. N je broj uzoraka, ρ predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije, 95% interval pouzdanosti (CI) i P statistička značajnost.

4.1.3.1.1. Regresijski model za povezanost IL-6 i CRP skupine A

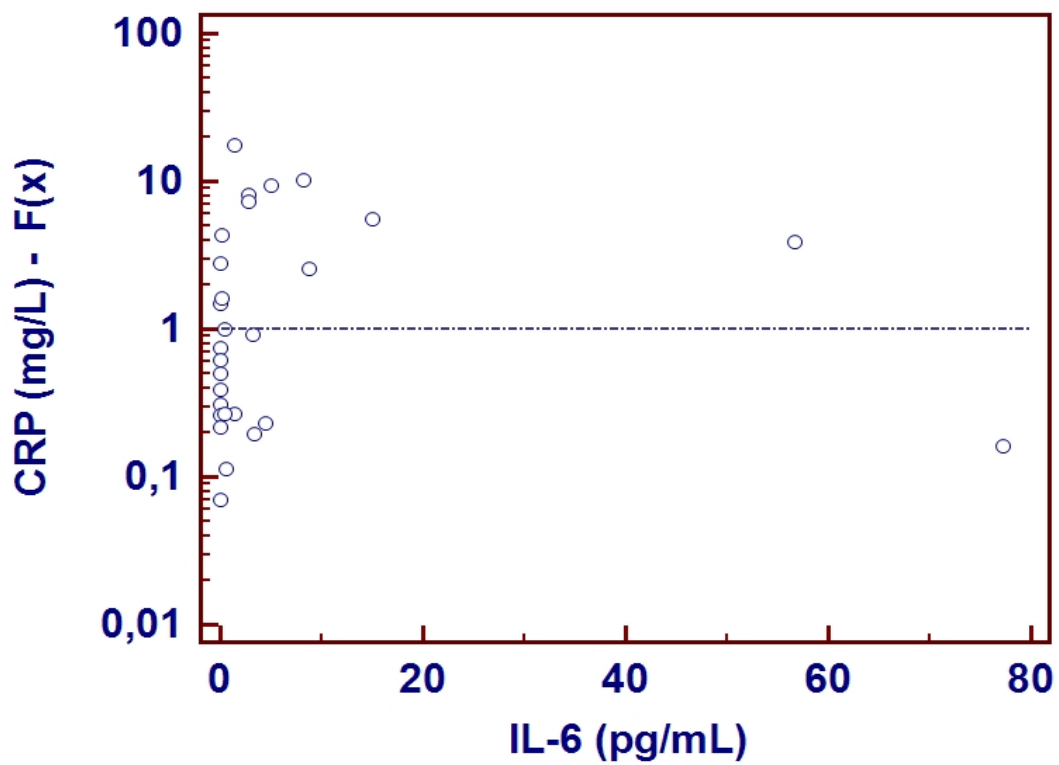
Rezultati koje smo dobili za CRP ne slijede Gaussovu krivulju, no logaritamskom preobrazbom rezultata za CRP dobili smo normalnu raspodjelu podataka pa možemo pristupiti regresijskom modelu.

Koeficijent determinacije iznosi $R^2=0,11$ tj. 11% mjerenja ukazuje na povezanost CRP i IL-6. Pravac regresije je $\log(y)=1,1095 + 0,01352x$, u kojem odsječak na osi y A iznosi 1,1095 (95% CI: 0,8 – 1,4), a nagib pravca B iznosi 0,01352 (95% CI: -0,002 – 0,029).



Slika 11. Pravac regresije skupine A s prikaznim granicama pouzdanosti i granicama predviđenih vrijednosti za povezanosti CRP i IL-6.

Na slici 11. može se primjetiti samo manji broj podataka koji se nalazi unutar granica pouzdanosti.



Slika 12. Točkasti dijagram reziduala CRP skupine A. $CRP (mg/L) - F(x)$ predstavlja razliku izmjerene vrijednosti CRP-a i izračunate vrijednosti prema regresijskom modelu.

Slika 12. prikazuje pogreške prognoze ili rezidualne (ostatke) koji predstavljaju mjeru rasipanja rezultata oko pravca regresije. Vidimo da dosta dobivenih rezultata u većoj mjeri varira oko pravca regresije.

4.1.3.2. Međuovisnost protuupalnog citokina IL-6 i CRP skupina B

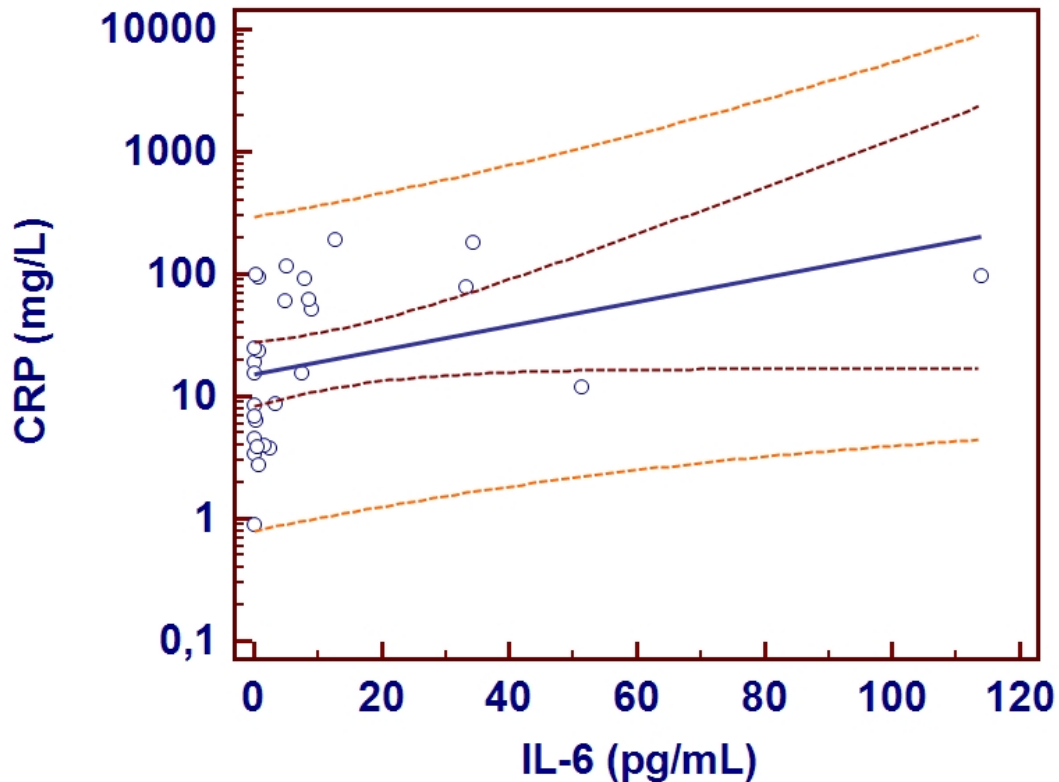
Iz 28 uzoraka dobivenih 12 sati nakon endoskopske bilijarne dekompresije, statističkom obradom je izračunat Spearmanov koeficijent korelacije $\rho=0,561$ ($P=0,0019$, 95% CI: 0,2 – 0,8).

Tablica 6. Korelacija CRP i IL-6 skupine A.

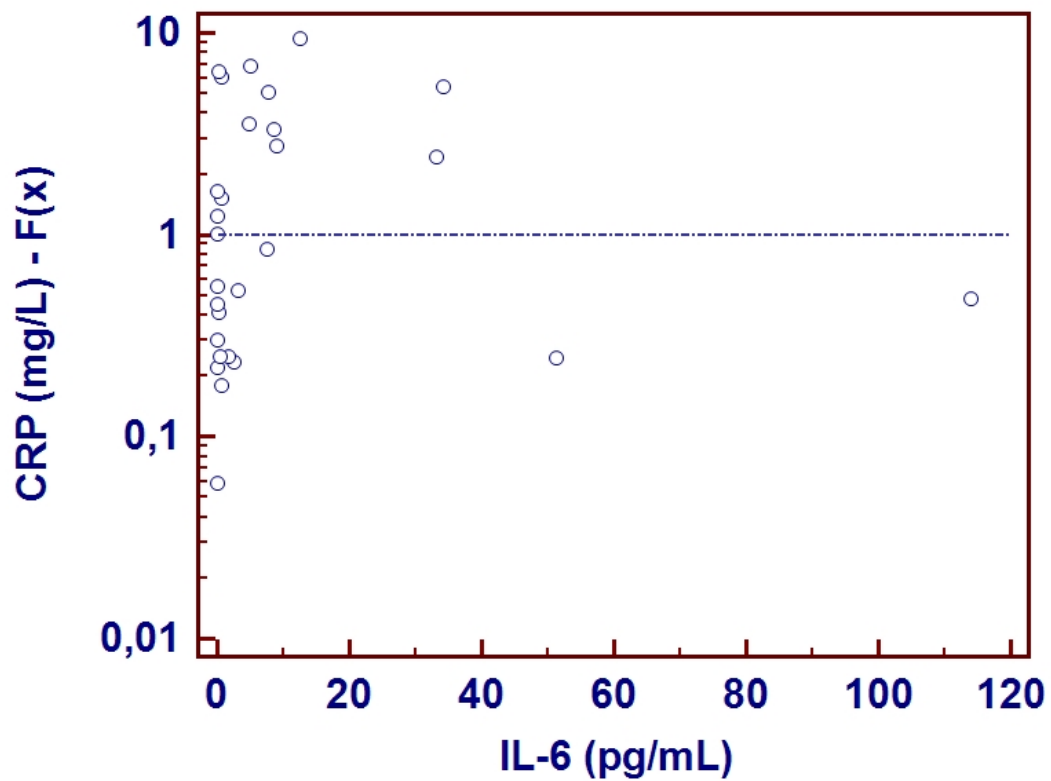
N	28
ρ (rho)	0,561
Kategorija povezanosti prema Coltonu	Umjerena do dobra povezanost
95% CI	0,2 – 0,8
P	0,0019

4.1.3.2.1. Regresijski model za povezanost IL-6 i CRP skupine B

Koeficijent determinacije $R^2 = 0,13$ što znači da 13% mjerenja ukazuje na povezanost CRP i IL-6. Slijedom regresijskog modela dobiven je pravac regresije je $y = 1,1863 + 0,009795x$, iz čega odsječak na osi y A iznosi 1,1863 (95% CI: 0,9 – 1,4) a nagib pravca B iznosi 0,009795 (95% CI: -0,0003916 – 0,01998).



Slika 13. Pravac regresije skupine B s prikaznim granicama pouzdanosti i granicama predviđenih vrijednosti za povezanost CRP i IL-6.



Slika 14. Točkasti dijagram reziduala CRP skupine B. CRP (mg/L) – F(x) predstavlja razliku izmjerene vrijednosti CRP-a i izračunate vrijednosti prema regresijskom modelu.

4.1.4. Povezanost CRP i IL-6 s koncentracijom ukupnog bilirubina

Tablica 7. Određivanje stupnja povezanosti između ukupnog bilirubina i CRP.

Varijabla Y	Ukupni bilirubin
Varijabla X	CRP
Rho	0,245
P	0,0685
95% CI za rho	-0,12 do 0,45

Analizom korelacije ukupnog bilirubina i CRP izračunat je Spearmanov koeficijent korelacije $\rho=0,245$, te $P=0,0685$ koji upućuju na zaključak da te dvije varijable ne pokazuju statistički značajnu povezanost.

Tablica 8. Određivanje stupnja povezanosti između ukupnog bilirubina i IL-6.

Varijabla Y	Ukupni bilirubin
Varijabla X	IL-6
Rho	-0,0786
P	0,5647
95% CI za rho	-0,34 do 0,19

Izračunavanjem korelacije ukupnog bilirubina i interleukina-6 dobiven je Spearmanov koeficijent korelacije $\rho=-0,0786$, te $P=0,5647$ prema čemu možemo zaključiti da dvije navedene varijable ne pokazuju statistički značajnu povezanost.

4.2. RASPRAVA

Opstrukcija u bilijarnom traktu oštećuje jetreni parenhim a time i ekskrecijske i sintetske funkcije jetre, te do oštećenja jetrenog parenhima. Napredovanje tkivnog oštećenja prati nizspecifičnih i nespecifičnih biokemijskih i fizioloških zbivanja kojima je konačni cilj zaštita i obrana organizma. Biosinteza proteina akutne faze pripada jednom od glavnih nespecifičnih odgovora organizma na oštećenje vlastitih stanica. Radi se o strukturno i funkcionalno raznovrsnoj skupini proteina koji se sintetiziraju u jetri. U krvi zdravih ljudi postoje u fiziološkim koncentracijama, no nakon pojave tkivnog oštećenja njihova koncentracija vrlo brzo raste. Najosjetljiviji protein akutne faze je C-reaktivni protein, dok je interleukin-6 najznačajniji upalni citokin. Navedena dva upalna biljega smo istraživali u opstruktivskoj žutici. Pratili smo koncentraciju upalnih biljega prije i nakon učinjene endoskopske bilijarne dekompresije. Ujedno smo pratili i ulogu endoskopske bilijarne drenaže na oporavak jetrene funkcije.

Proučavajući dostupnu literaturu uočavamo mali broj radova o patofiziološkim zbivanjima kod opstruktivske žutice. U dosadašnjim istraživanjima radilo se s malim brojem ispitanika što utječe na statističku značajnost dobivenih rezultata.

Naše je istraživanje obuhvatilo 28 bolesnika koji boluju od opstrukcije bilijarnog sustava benigne naravi. Kod oboljelih ispitanika učinjena je bilijarna endoskopska dekompresija, te su CRP, IL-6 i ukupni bilirubin u serumu određivani neposredno prije i 12 sati nakon bilijarne dekompresije. Rezultati su svrstani u dvije grupe, skupina A koja predstavlja rezultate neposredno prije dekompresije i skupina B s rezultatima 12 sati nakon dekompresije.

Prvi nedostatak ovog istraživanja je mali broj uzoraka, manji od 35. Drugi nedostatak je što su varijable koje predstavljaju biljege upale pokazale da ne slijede normalnu raspodjelu. Za statistički postupak regeresijske analize one bi trebale slijediti normalnu raspodjelu. No, u korelaciji smo dobili zadovoljavajući Spearmanov koeficijent korelacije zbog kojeg smo odlučili primjeniti i regresijski model na naše podatke nakon što smo logaritmiranjem preveli jednu varijablu normalnu distribuciju.

Oštećenje jetrenog parenhima uzrokovano opstrukcijom protoka žuči aktiviralo je nespecifični upalni obrambeni odgovor organizma što je rezultiralo povišenim koncentracijama IL-6 i

CRP. Najučestalije koncentracije CRP (RI <5mg/L) nalaze se u rasponu 0-50 mg/L a IL-6 (RI <10 pg/mL) u rasponu od 0-20 pg/mL što se povezuje s blagom upalom.

Utjecaj endoskopske bilijarne drenaže na upalni odgovor ispitivali smo uspoređujući koncentracije upalnih biljega i serumskog ukupnog bilirubina neposredno prije i 12 sati poslije endoskopske dekompresije. Koncentracija CRP u grupi A uzoraka uzetih prije endoskopske dekompresije ima užu raspon od koncentracije CRP u grupi B uzorka uzetih 12 sati poslije endoskopske dekompresije. Kako je upala postojala i prije endoskopske dekompresije, u 12 sati nakon dekompresije moguće je da se raspon koncentracije CRP proširi jer je vrijeme postizanja koncentracijskog vrhunca za CRP 48 sati, a vrijeme poluživota za CRP iznosi oko 19 sati. Stoga zaključujemo da 12 sati nije bilo dovoljno vrijeme u kojem bi se koncentracija značajno smanjila. Wilcoxonovim testom ispitivali smo da li se koncentracija CRP statistički značajno razlikuje neposredno prije i 12 sati nakon endoskopske dekompresije. Rezultat je $P=0,8101$ te zaključujemo da razlike nema. Vrijednost medijana za CRP u grupi A iznosi 13,0 a u grupi B 17,3 i one se nalaze izvan referentnog intervala za CRP (Tablica 3.). Također možemo primjetiti da je medijan koncentracija CRP uzoraka nakon endoskopske drenaže veće vrijednosti nego medijan koncentracija CRP uzoraka prije endoskopske drenaže (Tablica 4.). To možemo objasniti činjenicom da je potrebno 48 sati da bi se postigla vršna koncentracija CRP nakon čega bi se tek koncentracija CRP počela smanjivati s poluvremenom od 19 sati. Zaključujemo da je navedenih 12 sati između mjerenja prekratko vrijeme da bi se koncentracija CRP značajno smanjila. U drugim istraživanjima (Wozniak i sur.; Sultan i sur, 2002) . srednja vrijednost koncentracije CRP bila je najviša nakon 24 sata, a najviša koncentracija izmjerena je nakon 48 sati. Takvi podaci u usporedbi s našim govore da je nakon ERCP metode ipak došlo do dodatnog upalnog odgovora organizma, koja se ipak ne može otkriti rano pomoću biljega CRP. Njihova istraživanja upućuju da je važno identificirati pacijente koji će razviti post-ERCP upalni odgovor organizma određujući biljege upale. Istraživanjem Kaw M. i Singh S (Kaw i sur., 2001) zaključuju da su CRP i IL-6 ipak korisni za određivanje stupnja post-ERCP upale.

Utjecaj endoskopske bilijarne dekompresije na upalni odgovor organizma ispitivali smo uspoređujući koncentracije IL-6 između grupe A uzoraka uzetih prije endoskopske dekompresije i grupe B uzoraka uzetih poslije endoskopske dekompresije. Mjerenja su pokazala da se koncentracije IL-6 u grupi A uzoraka nalaze u užem rasponu i statistički se značajno razlikuju ($P<0,0001$) od koncentracije IL-6 u grupi B. Primjenom neparametrijskog parnog Wilcoxonovog testa željeli smo usporediti parove mjerenja da bismo utvrdili postoji li

statistički značajna razlika u medijanama između. Dobili smo $P=0,4761$, što pokazuje da razlike nema. Vrijednosti medijana iznose 0,5 pg/mg za grupu A i 1,1 pg/mg za grupu B (Tablica 4.). Vrijednosti medijana koncentracije IL-6 ostale su unutar referentnih intervala. Poluvrijeme života za citokine iznosi svega nekoliko minuta, tako da im se koncentracija brzo smanjuje u slučaju upale i njihove produkcije.

Uspoređivanjem koncentracija serumskog ukupnog bilirubina grupe A i grupe B istraživali smo uspješnost učinjene endoskopske bilijarne dekompresije. Koncentracija ukupnog bilirubina u serumu kod pacijenata prije endoskopske bilijarne dekompresije ima širi raspon i statistički se značajno razlikuje ($p=0,0001$) od koncentracije ukupnog bilirubina u serumu pacijenta 12 sati nakon endoskopske bilijarne dekompresije. U kolestatskoj žutici bilirubin se normalno stvara u RES-u, i putem krvi dolazi do jetre gdje se normalno konjugira. Ali zbog opstrukcije žučnih kanalića ne može se putem žuči izlučivati u crijevo pa se vraća u krvi i koncentracija mu je povećana. Primjenom Wilxonovog testa za usporedbu koncentracija bilirubina 12 sati prije i nakon dekompresije potvrdili smo da se koncentracije statistički značajno razlikuju ($P=0,0006$). Vrijednost medijana koncentracija serumskog ukupnog bilirubina u grupi A iznosi 34,1 $\mu\text{mol/L}$ što je izvan referentnog intervala a u grupi B 17,6 $\mu\text{mol/L}$ što se nalazi unutar referentnog intervala (Tablica 3.). Iz naših rezultata vidljivo je da se koncentracija serumskog ukupnog bilirubina značajno smanjila, što znači da je opstrukcija uklonjena, uspostavljen je protok tj. metoda endoskopske bilijarne dekompresije bila je učinkovita.

Statističkom obradom podataka ispitivali smo međuovisnost citokina IL-6 i CRP u skupini A (uzorci uzeti prije endoskopske dekompresije) i skupini B (uzorci uzeti nakon endoskopske dekompresije). Spearmanov koeficijenti korelacije pokazuju da je povezanost IL-6 i CRP slaba (skupina A) i umjereno dobra (skupina B), prema Coltonovom tumačenju koeficijenta korelacije (Grupa A: $\rho=0,501$; Grupa B $\rho=0,561$). U istraživanjima Wozniak i sur. također je uočena pozitivna korelacija između IL-6 i CRP. Da bi postigli vjerodostojniji regresijski model, jednu varijablu smo logaritmirali, i time dobili slijed normalne distribucije. Regresijskom raščlambom dobiveni su koeficijenti determinacije R^2 za obje grupe kojim smo približno utvrdili postotak uzoraka koji pokazuju mogućnost predviđanja vrijednosti jedne varijable iz vrijednosti druge varijable, on iznosi 11% za grupu A odnosno 13% za grupu B. Povezanost varijabli IL-6 i CRP prikazana je i grafički, u točkastom dijagramu, pomoću jednadžbe pravca regresije u obliku $y = A + Bx$, gdje „A“ predstavlja odsječak na osi y u kojem pravac sječe ordinatu, a „B“ nagib pravca tj. porast na osi y za jedinični porast na osi x.

Pravac regresije prikazan je s 95% granicama pouzdanosti i 95 % granicama predvidljivosti koje predstavljaju raspon vrijednosti rezultata unutar kojeg s određenom sigurnošću nalazimo predviđene rezultate. U obje grupe točke u točkastom dijagramu ne leže idealno na pravcu, nego u većoj mjeri odstupaju od njega. U regresijskoj raščlambi prikazan je i dijagram standardne pogreške prognoze ili rezidual (ostatak) koji opisuje variranje rezultata oko pravca regresije. U obje grupe rezultata mali broj točaka se nalazi u blizini pravca regresije. U istraživanju Wozniak i sur. uočeno je da koncentracija IL-6 postiže vršnu vrijednost prije koncentracije CRP i objašnjavaju to stimulacijskom ulogom IL-6 u produkciji CRP.

Analiza korelacije ukupnog serumskog bilirubina i CRP navodi nas na zaključak da te dvije varijable ne pokazuju statistički značajnu povezanost ($\rho=0,245$; $P=0,0685$). Ispitivanjem povezanosti ukupnog serumskog bilirubina i IL-6 zaključili samo da i te dvije varijable ne pokazuju statistički značajnu povezanost ($\rho= -0,078$; $P>0,5647$). Rezultati nas navode na zaključak da su biljezi upale i biljezi protoka žuči pokazatelji odvojenih patofizioloških i mehaničkih procesa te se ne može očekivati da uspostavljen protok kojeg dokazuje koncentracija bilirubina, garantira stišavanje ili nestanak upalnog procesa. No, svjedno ih trebamo oboje određivati, jer je ERCP, rizična endoskopska metoda dekompresije koja može uzrokovati dodatnu aktivaciju upalnog odgovora, a njega možemo predvidjeti određivanjem koncentracije upalnih biljega. S druge strane, određivanjem koncentracije bilirubina dobivamo informaciju o uspješnosti metode.

Kao idealan primjer možemo navesti vrijednosti jednog od pacijenata koji je imao koncentraciju CRP prije endoskopske dekompresije 290,8 mg/L a nakon endoskopske dekompresije 180,5 mg/L kao rezultat uspješne drenaže. Njegove koncentracije IL-6 bile su 56.6 pg/mg prije endoskopske drenaže i 34.2 pg/mg poslije endoskopske drenaže, što znači da se koncentracije IL-6 nisu nastavile povećavati jer nije bilo interleukinskog podražaja. Dakle, endoskopska bilijarna dekompresija nije uzrokovala povećanje upalnog odgovora. Koncentracije serumskog ukupnog bilirubina bile su 75 $\mu\text{mol/L}$ prije endoskopske drenaže, a 25 $\mu\text{mol/L}$ nakon, što znači da je uspostavljen protok žuči, serumski ukupni bilirubin se u konačnici smanjio i možemo zaključiti da je metoda bila djelotvorna.

Koncentracija IL- i CRP ovisi i o mnogim drugim čimbenicima. Jedan od njih je visoki kronicitet upale, koji je u većoj mjeri ošteti jetreni parenhim zbog čega se možda CRP neće sintetizirati u povećanom obujmu. Metoda ERCP prolazi kroz kanale koji su blizu jetre, što takođe treba uzeti u obzir što se tiče proizvodnje IL-6, zbog čega se možda nije povećala

koncentracija IL-6. Singh sa suradnicima (Singh i sur., 2011) uočio je da su upalni biljezi slabo povišeni kod starijih osoba, što uzrokuje brojne bolesti povezane sa starenjem. Pretjerani fizički napori i prekomjerna tjelesna težina direktno su povezani s koncentracijom CRP tj. upalnim procesom u organizmu (Lavie i sur., 2011). CRP pripada obitelji proteina pentraksina i kao takav sastoji se od pet identičnih, nekovalentno povezanih jedinica koje mogu disocirati u monomernu izoformu CRP (Eisenhardt i sur., 2001) što može otežati potpunu detekciju CRP. Nekoliko istraživanja dokazuje i povišene koncentracije CRP u kardiovaskularnim bolestima, karcinomima i depresiji (Santos i sur., 2008; Coventry i sur., 2009; Howren i sur., 2009).

Zanimljivo istraživanje napravio je Deviere (Deviere i sur., 2001) u kojem su analizirali utjecaj IL-10 na razvoj post ERCP pankreatitisa. Također su određivali upalne biljege IL-6 i CRP 4, 24, 48 sati nakon ERCP. Nisu zapažena povećanja koncentracije upalnih biljega, što upućuje na uspješnu IL-10 redukciju post-ERCP upale.

Naše istraživanje dijelom se slaže s literaturnim, prije svega zbog različitih vremenski razlika između mjerenja. Mjerenje 12 sati nakon endoskopske dekompresije možda nije dovoljno dugo da izmjerimo značajnija povišenja upalnih biljega, kao kod mjerenja u različitim istraživanjima nakon 24 i 48 sati. Protok žuči je i u našem i u drugim istraživanjima uspješno uspostavljen. U nekim dosadašnjim istraživanjima koncentracije upalnih biljega su se povećale nakon ERCP što se ne slaže s našim rezultatima, u kojima je upala ostala na istom stupnju što je sukladno s kliničkim tijekom u ispitivanoj bolesničkoj skupini. Ni jedan bolesnik nije razvio komplikacije upalne naravi, što u skladu s rezultatima mjerenja biljega - indikatora upale..

ERCP je rizična metoda koja se koristi i u dijagnostičke i terapijske svrhe. Najveći rizik predstavlja akutni pankreatits koji bi se mogao predvidjeti povišenim koncentracijama upalnih biljega. Upravo zbog takvih komplikacija, ERCP se uglavnom koristi u terapijske svrhe.

5. ZAKLJUČCI

Određivanjem koncentracije IL-6, CRP i ukupnog bilirubina u serumu neposredno prije i 12 sati nakon ERCP možemo zaključiti:

- Koncentracije IL-6, CRP i ukupnog bilirubina bile su povišene neposredno prije ERCP, što znači da je u organizmu već bio aktiviran upalni proces.
- 12 sati nakon provedene ERCP koncentracije IL-6 i CRP su ostale povišene ali se nisu statistički značajno razlikovale od koncentracija određenih neposredno prije ERCP; upala se nije dodatno povećala nakon ERCP.
- Koncentracija serumskog ukupnog bilirubina smanjila se 12 sati nakon ERCP, što dokazuje da je uspostavljen protok žuči, i da je ERCP uspješno izveden.
- Međuovisnost IL-6 i CRP postoji, ali njihov odnos nije moguće egzaktno objasniti matematičkom metodom linearne regresije.
- Ne postoji povezanost između mjerenih upalnih biljega i bilirubina kao ekskrecijskog biljega.
- Mjerenje IL-6 i CRP ne može zamijeniti mjerenje serumskog ukupnog bilirubina, ali mogu biti mjera stupnja upale i pojave mogućih komplikacija (akutni pankreatitis).
- Određivanje koncentracije serumskog ukupnog bilirubina mjera je uspješnosti ERCP.

6. LITERATURA

1. Biery L. D. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography: What role does it have in primary care? JAOA, Vol. 100, No.12, Supplement to December, 2000
2. Cohard M. Interleukin 10 reduces the incidence of pancreatitis after therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Gastroenterology 2001; 120(2):498-505
3. Coventry B.J, Ashdown M.L, Quinn M.A, Markovic S.N, Yatomi-Clarke S.L, i Robinson A.P. CRP identifies homeostatic immune oscillations in cancer patients: a potential treatment targeting tool? Journal of Translational Medicine: 2009; 7: 102
4. C-Reactive Protein: From Pneumococcal Pneumonia to Cardiovascular Disease Risk. http://centennial.rucare.org/index.php?page=C-Reactive_Protein, pristupljeno 13.01.2012.
5. Čepelak I, Štraus B, Dodig S, Labar B. Medicinsko-biokemijske smjernice. Zagreb, Medicinska naklada: 2004; 19-49
6. Deviere J, Le Moine O, Van Laethem JL, Eisendrath P, Ghilain A, Severs N, Cohard M. Interleukin 10 reduces the incidence of pancreatitis after therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Gastroenterology 2001; 120(2):498-505
7. Eisenhardt SU, Thiele JR, Bannasch H, Stark GB, Peter K. C-reactive protein: how conformational changes influence inflammatory properties. Cell Cycle 2009; 8(23):3885-92
8. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. i sur. Poremećaj hepatobilijarnog sustava. Patofiziologija. Zagreb, Medicinska naklada: 2005; 995-1027
9. Grundy SM. Atlas of lipid disorders. New York: Gower Medical Publishing; 1990.
10. Howren B.M, MA, Lamkin D.M, MA i Suls Jerry. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1 i IL-6: A meta-analysis. Psychosomatic Medicine 2009; 71: 71-186
11. Kaw M, Singh S. Serum lipase, C-reactive protein, and interleukin-6 levels in ERCP-induced pancreatitis. Gastrointestinal Endoscopy 2001; 54(4):435-40

12. Kishimoto Tadimitsu. IL-6: from discovery to clinical applications. *International immunology* 2010; 347-352
13. Krnić A. Žučni vodovi – radiološke metode pregleda. *Vodič kroz pretrage* br.50 (10/06), 2006
14. Kumar Y, Cotran R. S, Robbins S. L. *Jetra i žučni putovi. Osnove patologije* Zagreb, Školska knjiga: 2000; 523-568
15. Lavie CJ, Church TS, Milani RV, Earnest CP. Impact of physical activity, cardiorespiratory fitness, and exercise training on markers of inflammation. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation & Prevention* 2011; 31(3):137-45
16. Opačić M. Bolesti žučnog mjehura. *Medicus* 2006; Vol. 15, No.1, 161-168
17. Rustemović N. Bolesti žučnih vodova. *Medicus* Vol. 15, No.1_Gastroenterologija 2006; 153-159
18. Santos M.G, Pegoraro M, Sandrini F, Macuco E. C. Risk factors for development of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Arq Bras Cardiol* 2008; 90(4): 276-283
19. Singh T, Newman AB. Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Research Reviews* 2011; 10(3):319-29
20. Sultan S, Baillie J. What are the predictors of post-ERCP pancreatitis, and how useful are they?. *Journal of the Pancreas* 2002; 3(6):188-94
21. Štraus B, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Citokini i citokinski receptori. Zagreb: Medicinska naklada; 2009, 438-460
22. Štraus B, Čvorišćec D. Štrausova medicinska biokemija. Funkcija jetre. Zagreb: Medicinska naklada; 2009; 438-460
23. Thomas L, ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results.* Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH: 1998; 700-706.
24. Thomas L, ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results.* Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH: 1998; 769-770.
25. Wozniak B, Winiewska-Jarosinska M, Drzewoski J. Evaluation of selected parameters of the inflammatory response to endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Pancreas* 2001;23:349-355

7. SAŽETAK

Razvojem opstrukcije u žučnom drenažnom sustavu dolazi do oštećenja ekskrecijske i sintetske funkcije jetre, te oštećenja jetrenog parenhima. Cilj rada je bio utvrditi kakav je odgovor organizama na opstrukciju u tijeku žuči i da li rizična terapijska metoda ERCP izaziva dodatni upalni odgovor organizma, određivanjem stupnja upale.

Ispitano je 28 bolesnika s benignom opstrukcijskom žuticom a podjeljeni su u dvije skupine, skupina A, neposredno prije i skupina B, 12 sati nakon ERCP. Određivali smo koncentracije IL-6, CRP i ukupnog bilirubina u serumu i uspoređivali rezultate.

Dobivene vrijednosti upalnih biljega uspoređivali smo između grupa, iz čega smo zaključili da se upala koja je postojala i prije endoskopske dekompresije, nakon ERCP nije povećala. Usporedbom koncentracije ukupnog serumskog bilirubina između skupine A i skupine B vidljivo je smanjenje koncentracije, što poazuje uspješnost izvedne ERCP.

7.1. SUMMARY

Development of obstruction in the bile drainage system causes damage to the excretory and synthetic function of liver and damaging the liver parenchyma. The aim of this work was to determine how the organism reacts to the obstruction of the bile drainage and does the risky therapeutic method ERCP causes additional inflammation by determining degree of inflammation.

The study included 28 patients with benign obstruction jaundice, they were divided into two groups, group A, right before and group B, 12 hours after ERCP. We determined concentration of IL-6, CRP and total serum bilirubin and compared the results.

We compared given values of inflammatory markers between the groups, from which we concluded that after ERCP inflammation didn't increase. Comparing concentration of total serum bilirubin between group A and group B, we concluded that ERCP was conducted successfully.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

UTJECAJ OŠTEĆENJA JETRENOG PARENHIMA NA AKTIVNOST C- REAKTIVNOG PROTEINA I INTERLEUKINA-6

Marina Josipović

SAŽETAK

Razvojem opstrukcije u žučnom drenažnom sustavu dolazi do oštećenja ekskrecijske i sintetske funkcije jetre, te oštećenja jetrenog parenhima. Cilj rada je bio utvrditi kakav je odgovor organizama na opstrukciju u tijeku žuči i da li rizična terapijska metoda ERCP izaziva dodatni upalni odgovor organizma, određivanjem stupnja upale. Ispitano je 28 bolesnika s benignom opstrukcijskom žuticom a podjeljeni su u dvije skupine, skupina A, neposredno prije i skupina B, 12 sati nakon ERCP. Određivali smo koncentracije IL-6, CRP i ukupnog bilirubina u serumu i uspoređivali rezultate. Dobivene vrijednosti upalnih biljega uspoređivali smo između grupa, iz čega smo zaključili da se upala koja je postojala i prije endoskopske dekompresije, nakon ERCP nije povećala. Usporedbom koncentracije ukupnog serumskog bilirubina između skupine A i skupine B vidljivo je smanjenje koncentracije, što poazuje uspješnost izvedne ERCP.

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

Rad sadrži: 52 stranica, 14 grafička prikaza, 8 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: CRP, IL-6, ukupni serumski bilirubin, ERCP, upala, opstrukcija.

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *docent, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *docent, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Dr. sc. Dunja Rogić, *docent, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Dr.sc . Roberta Petlevski, *izvanredni profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Rad prihvaćen: 11. travnja 2012.

Basic documentation card

University of Zagreb

Diploma thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and
Hematology

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

INFLUENCE OF DAMAGE OF LIVER PARENCHYMA ON ACTIVITY OF C-REACTIVE PROTEIN AND INTERLEUKIN-6

Marina Josipović

SUMMARY

Development of obstruction in the bile drainage system causes damage to the excretory and synthetic function of liver and damaging the liver parenchyma. The aim of this work was to determine how the organism reacts to the obstruction of the bile drainage and does the risky therapeutic method ERCP causes additional inflammation by determining degree of inflammation. The study included 28 patients with benign obstruction jaundice, they were divided into two groups, group A, right before and group B, 12 hours after ERCP. We determined concentration of IL-6, CRP and total serum bilirubin and compared the results. We compared given values of inflammatory markers between the groups, from which we concluded that after ERCP inflammation didn't increase. Comparing concentration of total serum bilirubin between group A and group B, we concluded that ERCP was conducted successfully.

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

Thesis includes: 52 pages, 14 figures, 8 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: CRP, IL-6, total serum bilirubin, ERCP, inflammation, obstruction.

Menthor: **Nada Vrkić, Ph.D.** *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

Reviewers: **Nada Vrkić, Ph.D.** *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

Dunja Rogić, Ph.D. *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

Roberta Petlevski, Ph.D. *Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

The thesis accepted: 11th April 2012.

