

PRAĆENJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA KOD BOLESNIKA SA EKSTRAHEPATIČNOM HOLESTAZOM

Saša Zajić¹, Zoran Damnjanović², Miroslav Stojanović³, Milan Višnjić³, Srđan Denčić⁴, Dejan Ilić², Dušan Sokolović⁵

U holestazi, zbog nemogućnosti oticanja žuči iz jetre u duodenum, dolazi do posledičnog vraćanja konstituenata žuči u hepatocite i cirkulaciju. Ekstrahepatična holestaza je posledica mehaničke prepreke u oticanju žuči kroz *ductus hepaticus*, *choledochus* ili *papilu Vateri*, što dovodi do pojave manifestnog ikterusa. U događajima koji dovode do oštećenja ćelija, pre svih, hidrofobne žučne soli i nekonjugovani bilirubin imaju najznačajnije toksične efekte.

Ciljevi ovog rada bili su: praćenje biohemijskih parametara, aktivnost enzima *-GT i AF, koncentracija bilirubina, ukupnih proteina i albumina u krvnoj plazmi bolesnika sa različitim vrstama ekstrahepatične holestaze.

U ispitivanje je bilo uključeno 90 ispitanika podeljenih u četiri grupe. Prva je kontrolna grupa, dok su tri kliničke grupe oformljene na osnovu tipa ekstrahepatične opstrukcije: kontrolna (20 zdravih ispitanika), I grupa (20 bolesnika sa intraluminalnom ekstrahepatičnom opstrukcijom-ILH), II grupa (20 bolesnika sa intramuralnom opstrukcijom-IMH), III grupa (30 bolesnika sa ekstraluminalno izazvanom ekstrahepatičnom opstrukcijom-ELH).

Došlo je do značajnog porasta aktivnosti *-GT i AF u plazmi holestaznih bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). U plazmi holestaznih bolesnika u III grupi, aktivnost *-GT je povišena u odnosu na I grupu bolesnika ($p < 0,05$), dok je u I grupi aktivnost AF snižena u odnosu na II ($p < 0,05$) i III grupu ($p < 0,01$) bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom. Nivoi ukupnog, direktnog i indirektnog bilirubina u plazmi bolesnika sa holestazom su povišeni ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu. Koncentracija direktnog i indirektnog bilirubina u plazmi bolesnika sa holestazom iz II i III grupe su značajno povišeni u odnosu na iste vrednosti kod I grupe bolesnika sa holestazom. Kod bolesnika sa holestazom značajno je snižen nivo albumina u plazmi u odnosu na kontrolu. Kod bolesnika sa IMH i ELH, postoji negativna korelacija umerenog intenziteta između vrednosti direktnog bilirubina i albumina.

Kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom primećeno je značajno povišenje markera holestaze (*-GT i AF) i nivoa bilirubina u krvnoj plazmi. Najintenzivniji porast postoji kod bolesnika sa ELH. Holestaza dovodi do značajnih poremećaja sintetske funkcije jetre koji se manifestuju smanjenjem koncentracije albumina u plazmi i to najizrazitije kod bolesnika sa intramuralnom i ekstraluminalnom holestazom. *Acta Medica Medianae* 2008;47(1): 5-12.

Ključne reči: holestaza, *-GT, alkalna fosfataza, bilirubin, albumini

Odeljenje za hirurgiju Zdravstvenog centra u Kruševcu¹
Sanofi Aventis u Beogradu, Srbija²
Klinika za hirurgiju Kliničkog centra u Nišu³
Odeljenje za hirurgiju Zdravstvenog centra u Pirotu⁴
Institut za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu⁵

Kontakt: Sasa Zajic
Odeljenje za hirurgiju Zdravstvenog centra
Kruševac, Srbija
Tel.: 037/414532
E-mail: zajac@nadlanu.com

Uvod

Holestaza je poremećaj funkcije jetre nastao zbog nemogućnosti oticanja žuči žučnim putevima u tanko crevo, koji za posledicu ima retenciju žučnih konstituenasa u jetri i regurgitaciju u krvi. Ona može biti intrahepatična ili ekstrahepatična.

Ekstrahepatična holestaza je posledica mehaničke prepreke u oticanju žuči kroz *ductus hepaticus*, *choledochus* ili *papilu Vateri*. Ekstrahepatična holestaza je klinički sindrom izazvan opstrukcijom ekstrahepatičnih žučnih vodova i povećanjem nivoa bilirubina u plazmi na vrednost od preko 30 $\mu\text{mol/l}$, što dovodi do pojave manifestnog ikterusa ili žutice (1).

U opstruktivnoj holestazi, javljaju se adaptivni mehanizmi reapsorpcije žučnih soli iz obliterisanog lumena žučnog kanala. To potvrđuju studije Traunera i sar. (2), koje daju jasne molekularne i funkcionalne dokaze pojačane ekspresije Na^+ -zavisnih transportera žučnih soli (Isbt) na luminalnoj membrani holangiocita, koji obezbeđuju transportne mehanizme za uklanjanje žučnih soli iz opstruiranog žučnog kanala kroz proliferisani žučni epitel. Dva transportera na bazo-

lateralnoj membrani holangiocita t-Asbt i MRP-3, daju dodatne mehanizme za izbacivanje reapsorbovanih žučnih soli iz holangiocita nazad u sistemsku cirkulaciju. To je dopunski odvodni put za žučne soli iz holestatskih hepatocita i holangiocita (2) (Slika 1). Isbt membranski proteini nalaze se i u apikalnoj membrani terminalnog ileuma, gde obavljaju funkciju u enterohepatičnoj cirkulaciji žučnih soli, te je njihova aktivnost u uslovima holestaze smanjena (3). Ovakve adaptivne molekularne ekspresije, Isbt i MRP-2, olakšavaju urinarni gubitak žučnih soli kod opstruktivne holestaze (2) što je potvrđeno kod pacova sa podvezanim ductus choledochusom, kod kojih količina žučnih soli u urinu progresivno raste (4). Traner i saradnici su zaključili da se tokom opstruktivne bolesti jetre, javljaju adaptivni i regulatorni odgovori organizma, pojačanom ekspresijom transportnih proteina žučnih soli u bubregu i holangiocitima, koji olakšavaju ekskreciju žučnih soli alternativnim putevima (2).

Podaci sugerišu da hidrofobne žučne kiseline imaju toksičnu ulogu u holestaznim oboljenjima jetre. Tako su istraživanja Schmuckera i sar. pokazala da hidrofobne žučne kiseline oštećuju hepatocelularnu membranu usled deterdžentskog dejstva (5). Međutim, ova istraživanja su izvedena sa koncentracijama žučnih kiselina reda milimola, tako da su čak i hidrofilne žučne kiseline (koje ne pokazuju deterdžentska svojstva) izazvale oštećenja hepatocita. Novije studije su pokazale da mikromolarne koncentracije žučnih kiselina oštećuju hepatocite nedeterdžentskim mehanizmima. Ovi mehanizmi uključuju oksidativni stres i povećanu lipidnu peroksidaciju, toksično oštećenje mitohondrija i apoptozu hepatocita, sve to delovanjem hidrofobnih žučnih kiselina u ćelijama jetre (6).

Apoptoza hepatocita u uslovima holestaze može biti pokrenuta: mitohondrijalnom disfunkcijom izazvanom žučnim kiselinama (7). Toksične, hidrofobne žučne kiseline izazivaju premeštanje pro-apoptotičkog Bax proteina iz citozola u mitohondrije, a to dovodi do oslobađanja citohroma c koji aktivira kaspaze i izaziva apoptozu (8).

Bolesnici sa holestaznom bolešću jetre uglavnom pate od ekstrahepatičkih manifestacija ove bolesti. Javljaju se pruritus, zamor i simptomi povezani sa metaboličkim poremećajem u kostima (9).

U kliničkoj slici, u zavisnosti od uzroka nastanka ekstrahepatične holestaze, javlja se bol tipa kolike, ali nekada taj bol može biti tup, lokalizovan u gornje-desnom delu trbuha i u predelu epigastrijuma, sa osećajem neugodnosti i pritiska ili je, pak, bol pojasnog karaktera. Bol je praćen mukom, gađenjem i povraćanjem. Karakter bola može oscilovati u zavisnosti od tipa opstrukcije, u vidu ataka i remisija, a tegobe se mogu ispoljavati i u vidu dispepsije. Nekada bol ne prati pojavu ikterusa kao posledicu ekstrahapatične holestaze, što je slučaj kod malignih uzroka. Ako se pored opstrukcije, prisustva stranog tela i bakterija razvije holangitis, javlja se Charcot-ov trijas bol, povišena telesna temperatura (jeza, drhtavica), kao i žutica (10).

Biohemijski poremećaji su brojni i raznovrsni. Uglavnom su posledica porasta vrednosti konjugovanog bilirubina. Kod nepotpune i segmentne opstrukcije hiperbilirubinemija može izostati. Kod protrahovane parcijalne opstrukcije zbog oštećenja hepatocita hiperbilirubinemija je mešovita, konjugovana i nekonjugovana. U holestazi dolazi do porasta aktivnosti membranskih enzima u plazmi (γ -glutamiltransferaze, alkalne fosfataze, 5'-nukleotidaze) usled retencije žučnih soli koje vrše solubilizaciju membrane, što dovodi do izlazaka pomenutih enzima u cirkulaciju. Povećanje aktivnosti AF je mnogo sigurniji indikator bilijarne opstrukcije, naročito kod nekompletne i segmentne opstrukcije, gde vrednosti bilirubina ostaju normalne. Alkalna fosfataza se mnogo sporije vraća na normalne vrednosti, ponekad ostaje trajno povišena uprkos klinički uspešne bilijarne rekonstrukcije.

Dugotrajna opstrukcija dovodi do smanjenja sinteze albumina, naročito kod maligne opstrukcije. Hipoalbuminemija, ukazuje na oštećenje jetre i njenu sniženu sposobnost za sintezu proteina. U teškim oštećenjima jetre javlja se hipoglikemija zbog smanjene glikogenolize. Oštećenje CNS-a u uslovima holestaze posledica je hiperbilirubinemije i hipoksije. U toku opstrukcije žučnih puteva zapaženo je prisustvo viška slobodnog holesterola u serumu i stvaranje ksantoma. Enterohepatična cirkulacija žučnih soli može biti potpuno prekinuta ili oštećena u zavisnosti od stepena opstrukcije. Odsustvo žučnih soli u crevima rezultira proliferaciju crevne flore i pojačanu reapsorpciju endotoksina. Smanjena količina žučnih soli u tankom crevu dovodi do poremećaja u apsorpciji lipida i liposolubilnih vitamina i posledično do steatoreje. Hipovitaminoza vitamina K dovodi do poremećaja u koagulaciji krvi zbog smanjene sinteze faktora koagulacije – protrombina i faktora VII, IX i X. Dugotrajna holestaza dovodi i do osteomalacije zbog hipovitaminoze vitamina D. Nakupljanje žučnih soli u koži izaziva svrab (pruritus). Takođe, u plazmi je povećana aktivnost enzima iz hepatocita (aspartat i alanin-aminotransferaza), zbog povećane propustljivosti ćeliskih membrana ili nekroze (7,8,11).

Cilj rada

Ciljevi ovog istraživanja proistekli su iz težnje da se sagledaju razlike u metaboličkim zbivanjima kod oštećenja jetre bolesnika usled intraluminalne, intramuralne ili ekstraluminalne opstrukcije ekstrahepatičnih žučnih puteva.

- Sagledavanje oštećenja ćelija jetre u toku ekstrahepatične holestaze, kroz praćenje aktivnosti enzima γ -glutamiltransferaze (γ -GT) i alkalne fosfataze (AF) u krvnoj plazmi.
- Sagledavanje poremećaja hepatobilijarne funkcije jetre kroz praćenje poremećaja koncentracija bilirubina u plazmi bolesnika sa različitim vrstama ekstrahepatične holestaze.
- Procenjivanje sintetske funkcije holestazne jetre, na osnovu koncentracija ukupnih proteina i albumina u krvnoj plazmi.

Materijal i metode

U ispitivanje je bilo uključeno 90 ispitanika od kojih je 70 bolesnika sa dijagnostikovanom ekstrahepatičnom holestazom i 20 zdravih ispitanika. Svi bolesnici su anamnestički i klinički sagledani i lečeni na Hirurškoj klinici. Trajanje istraživanja i kliničko ispitivanje bolesnika ostvareno je u periodu od juna 2006. do oktobra 2007. godine. Kliničko-dijagnostičke metode za utvrđivanje uzroka i procenu težine opstrukcije žučnih puteva urađene su na Hirurškoj klinici. Biohemijski pokazatelji bili su određivani u Biohemijskoj laboratoriji Kliničkog centra u Nišu (na Pedijatriji) i laboratoriji Instituta za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu. Svi ispitanici su podeljeni u četiri grupe. Prva je kontrolna grupa, dok su tri kliničke grupe (I, II i III) oformljene na osnovu tipa ekstrahepatične opstrukcije.

Kontrola - čine je 20 zdravih ispitanika

I grupa - 20 bolesnika sa *intraluminalnom* ekstrahepatičnom opstrukcijom

II grupa - 20 bolesnika sa *intramuralnom* ekstrahepatičnom opstrukcijom

III grupa - 30 bolesnika sa *ekstraluminalno* izazvanom ekstrahepatičnom opstrukcijom

Kontrolna grupa je formirana od 20 zdravih ispitanika slične starosne i polne distribucije u odnosu na kliničke grupe. Svi ispitanici su dobrovoljni davaoci krvi.

Prva klinička grupa je formirana od bolesnika sa intraluminalnom opstrukcijom izazvanom kalkulusom (bilirubinski, holesterolski, mešoviti) koji je formiran u sklopu primarne ili sekundarne holedoholitijaze.

Druga klinička grupa je formirana od bolesnika sa intramuralnom opstrukcijom lumena ekstrahepatičnih žučnih puteva izazvanom tumorskom infiltracijom (Klatskin tumor), benignom stenozom, zapaljenskim stanjima-holangitisi.

Treća klinička grupa je formirana od bolesnika sa ekstraluminalnom opstrukcijom ekstrahepatičnih žučnih puteva koja je izazvana tumorima ampularne regije (distalni deo duktsa holedohusa, papile Vateri i glava pankreasa), zapaljenjem žučne kese (Mirizzi sindromi), pankreatitisom i uvećanim limfnim žlezdama.

Sve biohemijske metode određivane su gotovim testom firme Ellitech, na biohemijskom analizatoru BTS-370 (BioSystems).

γ -glutamilttransferaza (γ -GT) je određivana preko 4-nitroanilina u alkalnoj sredini. Aktivnost enzima u plazmi, izražena je u jedinicama na litar plazme (U/L).

Određivanje aktivnosti **alkalne fosfataze (AF)** u plazmi, obavljeno je kolorimetričkim merenjem nivoa oslobodjenog p-nitrofenola, delovanjem ovog enzima na p-nitrofenilfosfat pri 405nm. Aktivnost enzima u plazmi, izražena je u jedinicama na litar plazme (U/L).

Visina **bilirubina** u plazmi određivana je kolorimetričkom metodom na 540 nm. Koncentracija ukupnog, konjugovanog i nekonjugovanog bilirubina u plazmi, izražena je u μ mol/L.

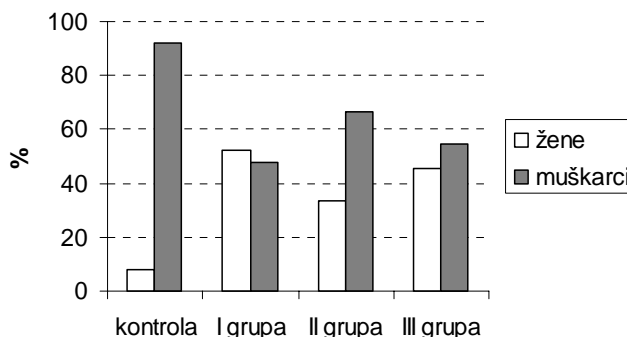
Količina **ukupnih proteina** u plazmi određivana je po biuret-metodi. Koncentracija ukupnih proteina u plazmi izražena je u g/L.

Količina **albumina** u krvnoj plazmi određivana je reakcijom sa bromkrezol-zelenilom (BCG, bromcresol green). Koncentracija albumina u krvnoj plazmi izražena je u g/L.

Podaci su obrađeni korišćenjem standardnih deskriptivnih statističkih metoda (srednja vrednost i standardna devijacija). Rezultati su analizirani upotrebom odgovarajućih testova u zavisnosti od veličine grupe, vrste obeležja i tipa distribucije.

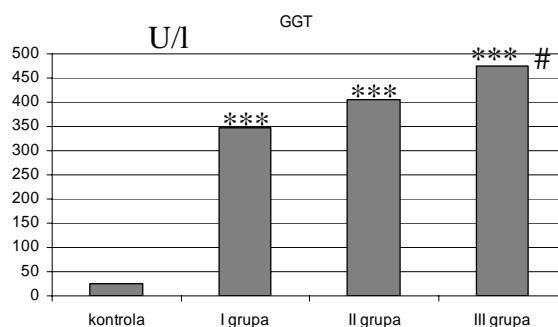
Rezultati

U ispitivanim grupama postoji ravnomerna zastupljenost bolesnika oba pola, pri čemu nije nađena statistički značajnija razlika u zastupljenosti polova između ispitivanih kliničkih grupa. Međutim, u kontrolnoj grupi je primetno veći procenat muškaraca u odnosu na žene (Grafikon 1).



Grafikon 1. Zastupljenost polova među ispitivanim grupama

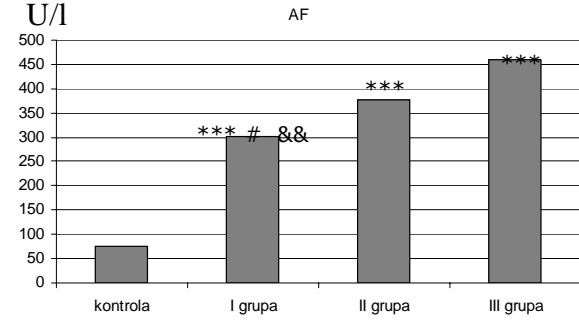
Aktivnost enzima γ -GT u plazmi bolesnika sa sva tri tipa holestaze prikazana je na Grafikonu 2. Rezultati pokazuju da je došlo do značajnog porasta aktivnosti ovog enzima u plazmi holestaznih bolesnika, u odnosu na kontrolne ispitanike (I grupa $347,89 \pm 271,17$ U/l, II grupa $405,25 \pm 296,76$ U/l, III grupa $474,95 \pm 358,87$ U/l u odnosu na kontrolu $24,84 \pm 5,85$ U/l; $p < 0,001$). Primećuje se da je u plazmi holestaznih bolesnika u III grupi, aktivnost γ -GT povišena u odnosu na I grupu bolesnika sa holestazom ($p < 0,05$).



*** $p < 0,001$ (u odnosu na kontrolu), # $p < 0,05$ (u odnosu na I grupu);

Grafikon 2. Aktivnost enzima γ -GT u plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom

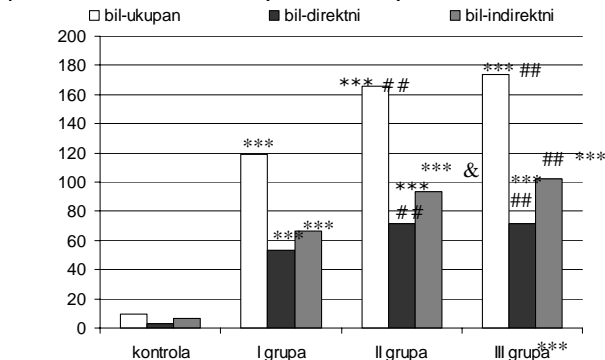
Na Grafikonu 3 prikazana je aktivnost AF u plazmi bolesnika sa holestazom. Kod bolesnika sa holestazom (u sve tri kliničke grupe) došlo je do značajnog porasta aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu grupu (I grupa 301,5±141,46 U/l, II grupa 377,41±236,26 U/l, III grupa 458,79±371,81 U/l u odnosu na kontrolu 74,76±15,76 U/l; $p<0,001$). Primećuje se da je u plazmi holestaznih bolesnika u I grupi, aktivnost AF značajno snižena u odnosu na II grupu ($p<0,05$) i III grupu ($p<0,01$) bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom.



*** $p<0,001$ (u odnosu na kontrolu), # $p<0,05$ (u odnosu na II grupu), & $p<0,01$ (u odnosu na III grupu)

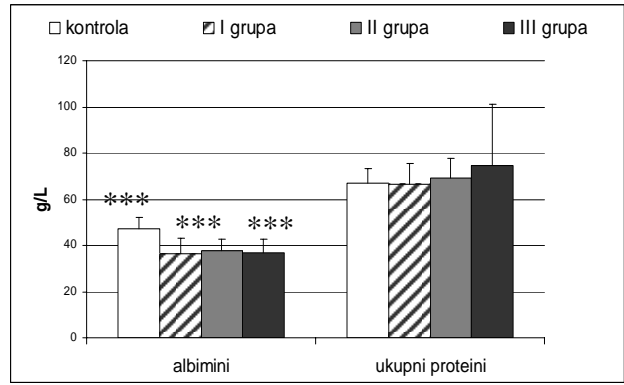
Grafikon 3. Aktivnost enzima AF u plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom

Nivoi ukupnog, direktnog i indirektnog bilirubina u krvnoj plazmi kod bolesnika sa holestazom iz I grupe statistički su znatno povišeni ($p<0,001$) u odnosu na vrednosti kod kontrolnih bolesnika (ukupni - 119,27±75,90 $\mu\text{mol/l}$ u odnosu na 9,61±2,94 $\mu\text{mol/l}$, direktni - 53,11±31,34 $\mu\text{mol/l}$ u odnosu na 2,92±1,03 $\mu\text{mol/l}$, indirektni - 66,15±32,43 $\mu\text{mol/l}$ u odnosu na 6,69±1,43 $\mu\text{mol/l}$) (Grafikon 4). Isti trend promena (značajno povišenje) zabeležen je i u plazmi II i III grupe sa holestazom, u odnosu na kontrolu (ukupni - 165,35±84,84 $\mu\text{mol/l}$ II grupa, 173,5±119,17 $\mu\text{mol/l}$ III grupa, direktni - 71,88±37,2 $\mu\text{mol/l}$ II grupa, 71,36±48,46 $\mu\text{mol/l}$ III grupa, indirektni - 93,47±43,87 $\mu\text{mol/l}$ II grupa, 102,14±57,98 $\mu\text{mol/l}$ III grupa; $p<0,001$) (Grafikon 4). Koncentracija ukupnog, direktnog i indirektnog bilirubina u krvnoj plazmi kod bolesnika sa holestazom iz II i III grupe su statistički znatno povišeni u odnosu na iste vrednosti kod I grupe bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom (Grafikon 4).



*** $p<0,001$ (u odnosu na kontrolu), ## $p<0,01$ (u odnosu na I grupu); & $p<0,05$ (u odnosu na I grupu)

Grafikon 4. Nivo bilirubina u plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom

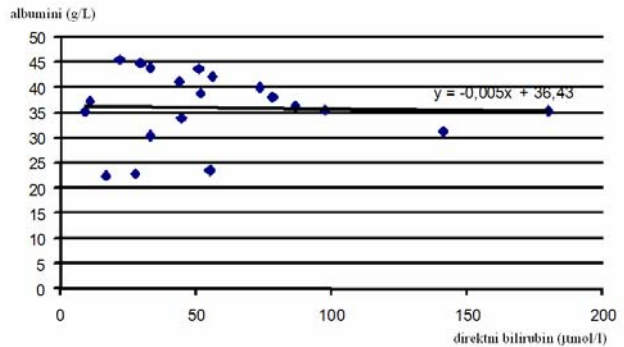


*** $p<0,001$ (u odnosu na kontrolu)

Grafikon 5. Nivo ukupnih proteina i albumina u krvnoj plazmi bolesnika sa holestazom

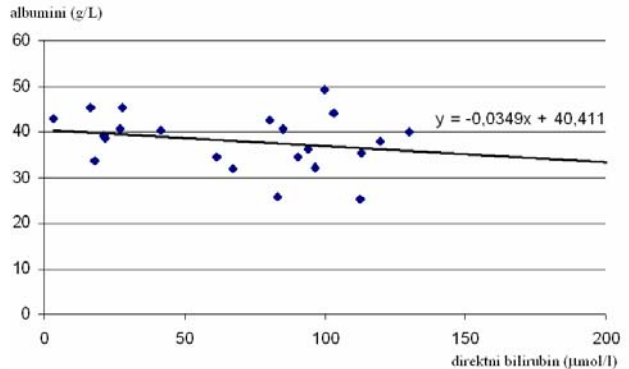
Rezultati koji pokazuju količinu ukupnih proteina u krvnoj plazmi ispitivanih bolesnika pokazuju da između sve četiri grupe ne postoji značajna statistička razlika (Grafikon 5).

U grupi bolesnika sa intraluminalnom opstrukcijom postoji blaga negativna povezanost koncentracije albumina sa vrednostima direktnog bilirubina $C=-0,03$, ali je ova povezanost slaba i u linearnom regresionom modelu ne pokazuje značajniji nagib regresione linije (Grafikon 6).



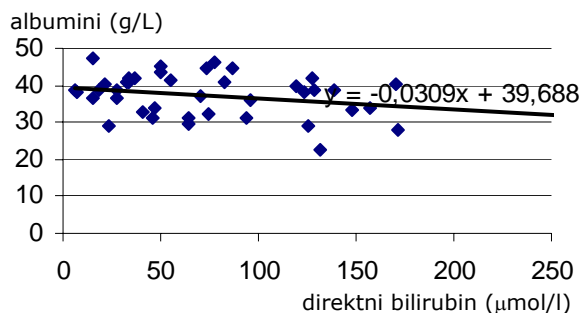
Grafikon 6. Odnos koncentracije albumina sa vrednostima direktnog bilirubina kod bolesnika sa intraluminalnom holestazom

U grupi bolesnika sa intramuralnom opstrukcijom postoji izražena negativna povezanost koncentracije albumina sa vrednostima direktnog bilirubina $C=-0,38$. Ova povezanost prikazana u linearnom regresionom modelu pokazuje značajniji nagib regresione linije (Grafikon 7).



Grafikon 7. Odnos koncentracije albumina sa vrednostima direktnog bilirubina kod bolesnika sa intramuralnom holestazom

U grupi bolesnika sa ekstraluminalnom opstrukcijom postoji izražena negativna povezanost koncentracije albumina sa vrednostima direktnog bilirubina $C = -0,35$. Ova povezanost prikazana u linearnom regresionom modelu pokazuje značajni nagib regresione linije (Grafikon 8).



Grafikon 8. Odnos koncentracije albumina sa vrednostima direktnog bilirubina kod bolesnika sa ekstraluminalnom holestazom

Diskusija

U stanjima holestaze, koja dovode do oštećenja ćelija, pre svih, hidrofobne žučne soli i nekonjugovani bilirubin imaju najznačajnije toksične efekte. Ovi toksični metaboliti imaju dramatičan uticaj na brojne ćelijske funkcije: procese transporta, signalnu transdukciju, gensku ekspresiju, sintezu proteina (12). Dugotrajna, hronična holestaza dovodi do nepovratne destrukcije jetrinog parenhima i razvoja sekundarne ciroze.

Najvažniji i najsigurniji biohemijski pokazatelji zastoja žuči su povećane vrednosti bilirubina, holesterola i žučnih soli u krvnoj plazmi, kao i porast aktivnosti „enzima holestaze“: γ -GT, AF i 5'-nukleotidaze.

γ -GT je lokalizovan na plazma membrana, dok je mali deo prisutan u citozolu i mikrozomima hepatocita. Aktivnost ove transpeptidaze je najveća u epitelnim ćelijama u kojima se intenzivno odvija aktivni transport (naročito u epitelu žučnih kanala). Sa kliničkog aspekta, aktivnost γ -GT u serumu je najosetljiviji pokazatelj oštećenja hepatobilijarnog sistema. Veoma visoke vrednosti γ -GT prate kako ekstrahepatičnu tako i intrahepatičnu holestazu različite etiologije.

U ovom istraživanju, kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom došlo je do značajnog porasta aktivnosti γ -GT u plazmi u odnosu na kontrolne ispitanike (Grafikon 2). Ovako značajno povišenje aktivnosti γ -GT u plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom (u sve tri kliničke grupe) u toku ove studije može se objasniti na više načina. Prvo, hidrofobne žučne kiseline svojim deterdžentskim dejstvom na ćelijsku membranu hepatocita, dovode do oslobađanja ovog enzima u cirkulaciju. U holestazi, zbog regurgitacije konstituenata žuči u krv, povećava se aktivnost γ -GT u serumu (u žuči je u proseku oko 10 puta veća aktivnost γ -GT nego u serumu zdravih osoba). Ranije studije su pokazale da je u uslovima holestaze u hepatocitima povećana *de novo* sinteza γ -GT. Kako u holestazi dolazi do nekroze epitelnih ćelija žučnih kanala (koje su

bogate γ -GT), povećava se aktivnost ovog enzima u cirkulaciji. I na kraju, zbog proliferacije epitelnih ćelija bilijarnih kanala, koje su bogate sa γ -GT, značajno se povećava njegova aktivnost u serumu (13).

Rezultati prikazani na Grafikonu 2 pokazuju da je u plazmi holestaznih bolesnika iz III grupe, aktivnost γ -GT povišena u odnosu na I grupu bolesnika sa holestazom. Najverovatnije je kod bolesnika sa ekstraluminalno izazvanom ekstrahepatičnom opstrukcijom došlo do potpune opstrukcije žučnog kanala, koja je trajala duže vreme, te je došlo do vraćanja žučnih konstituenata u hepatocite. Žučne kiseline su svojim toksičnim dejstvom na membranu hepatocita, dovele do oslobađanja γ -GT u cirkulaciju (5,14,15).

Alkalna fosfataza je po strukturi glikoprotein i spada u enzime koji čine integralni deo ćelijske membrane. Plazma membrane epitelnih ćelija su najbogatije ovim enzimom. Oboljenja jetre i žučnih kanala praćena su povećanjem aktivnosti AF, koje je naročito karakteristično za sindrom holestaze. Porast nivoa AF u serumu je znatno veći kod ekstrahepatičnih, nego kod intrahepatičnih oblika holestaze. Opstruktivni ikterus izazvan malignim procesima u jetri obično dovodi do znatnijeg uvećanja serumske AF, nego opstrukcija prouzrokovana promenama benigne prirode.

U ovom istraživanju, u krvnoj plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom, u sve tri kliničke grupe, došlo je do znatnog porasta aktivnosti alkalne fosfataze u odnosu na kontrolne ispitanike (Grafikon 3). Ovi podaci su u skladu sa podacima iz literature, koji svedoče da kod svih patoloških procesa koji dovode do smetnji u protoku žuči dolazi do izražaja solibilizirajuće dejstvo žučnih soli, koje izazivaju oslobađanje AF sa spoljne strane ćelijske membrane, bez lize samih ćelija. Sem toga, ranije je dokazano da u holestazi žučne soli indukuju sintezu novih molekula AF (16). Dokazano je da kod ekstrahepatične holestaze, aktivnost AF može da bude čak i 10-12 puta veća od normalnih (pri kompletnoj opstrukciji), a kod intrahepatičnih obično 2-3 puta (16). U našem istraživanju primećeno je da je aktivnost AF u plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom različite etiologije 4-7 puta veća nego kod normalnih ispitanika.

Najintenzivniji porast aktivnosti AF zabeležen je kod bolesnika iz III kliničke grupe (skoro sedmostruki porast), zatim iz II grupe, a najmanji kod bolesnika iz I kliničke grupe sa ekstrahepatičnom holestazom (Grafikon 3). Enzimski slika katkad omogućava da se opstruktivna holestaza izazvana konkreimentima razlikuje od one izazvane malignim procesom (najčešće tumorom glave pankreasa), jer je u ovom drugom slučaju obično snižena aktivnost holinesteraze i višestruko povećana aktivnost AF. Ako su prisutne i metastaze, često se nalazi i veliki porast aktivnosti aldolaze i laktat dehidrogenaze (LDH) (17).

Usled mehaničke prepreke u žučnim kanalima dolazi do retencije žučnih boja u cirkulaciju. Tada dominira holestaza i menja se smer kre-

tanja žuči, pa on sa svojim sastojcima (konjugovanim bilirubinom, žučnim solima) počinje da se kreće od bilijarnog ka sinusoidalnom polu hepatocita. Deo konjugovanog bilirubina prelazi u krvnu plazmu, pa se javlja hiperbilirubinemija konjugovanog tipa. Dokazano je da žučne soli povećavaju filtraciju konjugovanog bilirubina kroz glomerule bubrega. Ovo je razlog što kod bolesnika sa bilijarnom opstrukcijom koncentracija konjugovanog bilirubina u krvnoj plazmi ne prelazi granicu od 510-680 $\mu\text{mol/l}$ (1).

Pošto je ekskrecija bilirubina iz hepatocita limitirajući stupanj u njegovom metabolizmu u odnosu na konjugaciju, u početku holestaze, pri oštećenjima manjeg stepena, uvek predominira hiperbilirubinemija konjugovanog tipa. Kasnije, pri napredovanju i pogoršavanju patološkog procesa, u krvnoj plazmi se povećava i koncentracija nekonjugovanog bilirubina. Ovo se objašnjava time što povećana koncentracija konjugovanog bilirubina u hepatocitima dovodi do alosterijske inhibicije enzima UDP-glukuronil transferaze (UDPGT), čime se koči proces konjugacije, što ima za rezultat porast koncentracije i nekonjugovanog bilirubina u krvi. Neke studije su dokazale da pri težim oštećenjima jetre dolazi do skraćenja života eritrocita pa se javlja nekonjugovana hiperbilirubinemija (12).

Kako se može zapaziti iz Grafikona 4, kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom iz sve tri ispitivane kliničke grupe, dolazi do značajnog porasta vrednosti ukupnog bilirubina u plazmi u odnosu na kontrolne ispitanike od 12 do 18 puta. Porast je izražen u povišenju koncentracije konjugovanog ali i nekonjugovanog bilirubina (Grafikon 4). Smatra se da je povećanje vrednosti direktnog bilirubina u plazmi u holestazi, posledica povećanog koncentracionog gradijenta između ćelija i plazme ili izlaska bilirubina usled ćelijskog oštećenja izazvanog opstrukcijom oticanja žuči. Ranije studije su pokazale da povećanje nivoa konjugovanog bilirubina u plazmi više ide u prilog oštećenja membrane, odnosno njene solubilizacije, nego prostog difuzionog procesa (12,18).

Za razliku od konjugovanog koji je netoksičan, nekonjugovani bilirubin u slobodnom stanju veoma je toksičan za ćelije. Zato se indirektni bilirubin kompleksira sa albuminima iz krvne plazme. Razlog zbog kojeg se nekonjugovani bilirubin može naći u slobodnom stanju je taj što se on u telesnim tečnostima ponaša kao anjon, a neki drugi organski anjoni (npr. žučne kiseline, masne kiseline, kofein, neki lekovi-tetraciklini i salicilati), konkurišu sa bilirubinom za vezujuća mesta za albumine. Zbog ovog konkurentnog odnosa, u prisustvu većih koncentracija ovih anjona, pojavljuje se veća količina slobodnog (nevezanog za albumine) bilirubina i povećava se njegova toksičnost. Dokazano je da je najveći deo žučnih soli vezan u serumu za albumine, a oko 22-34% za lipoproteine.

Rezultati dobijeni istraživanjima u ovoj studiji, pokazuju značajan statistički porast nekonjugovanog bilirubina (Grafikon 4) i smanjenje nivoa albumina (Grafikon 5) u krvnoj plazmi hole-

staznih bolesnika, u odnosu na iste vrednosti kod kontrolnih ispitanika. Iz svega ovoga može se pretpostaviti i eventualno zaključiti da se usled smanjenog nivoa albumina i velikog porasta količine ukupnih žučnih kiselina (koje konkurišu bilirubinu za vezujuća mesta za albumine) u krvnoj plazmi, deo nekonjugovanog bilirubina može naći u slobodnom stanju i ispoljavati toksične efekte.

Green i sar. (1984) su dokazali da su žučne soli u holestazi odgovorne za narušavanje permeabiliteta i strukture hematoencefalne barijere (19). U početku dolazi do otežanog transfera materija, a zatim i do narušavanja integriteta ove barijere i to tako što prvo stradaju endotelne ćelije a zatim i glija koja ih obavlja. U početku su ove promene reverzibilne, a zatim dobijaju nepovratni karakter, u zavisnosti od koncentracije žučnih soli. Ovaj efekat se tumači jakim deterdžentskim svojstvima žučnih soli i mogućnošću da solubiliziraju ćelijske membrane (20). Jedna od toksičnih supstanci koja može biti odgovorna za oštećenje mozga u ovim uslovima je i nekonjugovani bilirubin povećan u holestazi. Na nivou subcelularnih struktura mozga, pokazano je da nekonjugovani bilirubin dovodi do inhibicije respiratornog lanca, sinteze DNK i proteina, modulator je sinteze, oslobađanja i prihvatanja neurotransmitera, a on je i inhibitor fosforilacije proteina.

Nisu svi regioni mozga podjednako osetljivi na oštećenje uzrokovano nekonjugovanim hiperbilirubinemijom u holestazi. Pokazano je da su neuroni jako vulnerabilniji u odnosu na astrocite. To se objašnjava činjenicom da neuroni pokazuju manju sposobnost oksidacije ili aktivnog transporta nekonjugovanog bilirubina (21). Podaci o toksičnosti nekonjugovanog bilirubina su naročito dokumentovani u neonatalnoj hiperbilirubinemiji, posebno ako ona traje više od 5 ili 7 dana i ukoliko indirektni bilirubin premašuje koncentraciju od 340 $\mu\text{mol/l}$.

Od nedavno se smatra da je glavni faktor oštećenja CNS-a delovanje bilirubina putem glutamatskih NMDA receptora. Ovo je u skladu sa kliničkim osmatranjima, gde je encefalopatija izazvana bilirubinom pogoršana hipoksijom/ ishemijskom koja takođe ima ekscitotoksični mehanizam neuronalnog oštećenja (22).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je nivo albumina u krvnoj plazmi holestaznih bolesnika snižen u odnosu na kontrolne ispitanike (Grafikon 5). Naši rezultati ukazuju da je kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom izazvanom intramuralnom i ekstraluminalnom opstrukcijom došlo do značajnog oštećenja sintetske funkcije jetre, te se zapaža snižena sposobnost jetre za sintezu albumina, što se manifestuje negativnom korelacijom između vrednosti albumina i porasta direktnog bilirubina (grafikoni 7 i 8). Gubitak ove inverzne korelacije u grupi sa intraluminalnom opstrukcijom je najverovatnije uslovljen činjenicom da ovaj tip opstrukcije izazivaju mahom akutni poremećaji koji još nisu doveli do izrazite insuficijencije sintetske funkcije

hepatocita, te porast direktnog bilirubina ne prati smanjenje koncentracije albumina (Grafikon 6).

Na osnovu naših rezultata, može se pretpostaviti da je u holestazno oštećenoj jetri naročito smanjena sinteza albumina i drugih proteina sa dužim polipeptidnim lancem. Objašnjenje za ovaj proces u vezi je sa sintezom proteina i krizom energetskeg metabolizmom u hepatocitima. Naime, u holestaznom sindromu prisutna je smanjena količina ATP u mitohondrijama. Proces oksidativne fosforilacije izmenjen je usled narušavanja strukturne organizacije mitohondrijalne membrane atakom hidrofobnih žučnih soli (pri čemu najveći toksični efekat ispoljava dezoksiholna i henodezoksiholna kiselina) (23).

Zaključci

Na osnovu rezultata iznetih u ovom radu može se zaključiti sledeće:

1. Kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom primećeno je značajno povišenje aktivno-

sti "enzima markera" holestaze (γ -GT i AF). Najintenzivniji porast ovih enzima pronađen je kod bolesnika sa ekstraluminalno izazvanom opstrukcijom, nešto manji kod bolesnika sa intramuralnom ekstrahepatičnom opstrukcijom, a najmanji kod bolesnika sa intraluminalnom ekstrahepatičnom opstrukcijom žučnih puteva.

2. Usled ekstrahepatične holestaze javlja se značajno povišenje nivoa bilirubina (ukupnog, direktnog i indirektnog) u plazmi bolesnika. Koncentracije ukupnog, direktnog i indirektnog bilirubina u plazmi kod bolesnika sa intramuralnom i ekstraluminalnom holestazom su znatno više u odnosu na iste vrednosti kod bolesnika sa intraluminalnom holestazom.
3. Holestaza dovodi do značajnijih poremećaja sintetske funkcije jetre koji se manifestuju smanjenjem koncentracije albumina u krvnoj plazmi. Poremećaji sintetske funkcije su najizraženiji kod bolesnika sa intramuralnom i ekstraluminalnom holestazom.

Literatura

1. Phillips J, Poucell S, Oda M. Mechanisms of Cholestasis. Laboratory Investigation 1986;54(6): 593-608.
2. Trauner M, Meier P, Boyer J. Molecular Pathogenesis of Cholestasis. N Engl J Med 1998;339:1217-27.
3. Sauer P, Stiehl A, Fitscher BA, Hans-Dieter R, Benz C, Kloters-Plachky P, Stengelin S, Stremmel W, Kramer W. Downregulation of ileal bile acids absorption in bile-duct ligated rats. J Hepatol 2000;33: 4169-78.
4. Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler D. Expression of the conjugate export pump encoded by the Mrp2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. J Am Soc Nephrol 1997; 8:1213-21.
5. Schmucker DL, Ohta M, Kanai S et al. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. Hepatology 1990;12(5): 1216-21.
6. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ et al. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. Gastroenterology 1999;117(3): 669-77.
7. Jaeschke H, Gores G, Cederbaum A, Hinson J, Pessayre D and Lemasters J. Mechanisms of Hepatotoxicity. Toxicological Sciences 2002;65:166-76.
8. Rodrigues CM, Steer CJ. Mitochondrial membrane perturbation in cholestasis. Hepatology 2000; 32:135-41.
9. Glasova H, Beuers U. Extrahepatic manifestations of cholestasis. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2002;17:938-48.
10. Collins C, Maguire D, Ireland A, Fitzgerald E, O'Sullivan GC A prospective study of common bile duct calculi in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy: natural history of choledocholithiasis revisited. Ann Surg 2004;239(1):28-33.
11. Vleggaar FP, Van Ooteghem NA, Van Buuren HR, Van Berge Henegouwen GP. Cholestatic liver diseases: slow progress in understanding and treating slowly progressive disorders. Scand J Gastroenterol 2000; Suppl.(232):86-92.
12. Kullak-Ublick G and Maier P. Mechanisms of cholestasis. Clin Liver Dis 2000; 4(2):357-85.
13. Koračević D. Enzimi. U: Koračević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G. Biohemija, Savremena administracija, Beograd, 1996:1-162.
14. Sokolović D. Biohemijski aspekti holestaze sa osvrtom na metabolizam poliamina. Magistarski rad, Niš, 2004.
15. Castro-e-Silva Junior O, Franco CF, Souza ME, Picinato MA, Santos JS, Ceneviva R. Serum gamma-glutamyl transpeptidase in chronic extrahepatic cholestasis. Braz J Med Biol Res.1990; 23(6-7): 515-8.
16. Alvaro D, Benedetti A, Marucci L, Delle Monache M, Monterubbianesi R, Di Cosimo E, Perego L, Macarri G, Glaser S, Le Sage G, Alpini G. The function of alkaline phosphatase in the liver: regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. Hepatology 2000;32(2):174-84.
17. Pasanen P, Pikkarainen P, Alhava E, Partanen K, Penttilä I. Value of serum alkaline phosphatase, aminotransferases, gamma-glutamyl transferase, leucine aminopeptidase, and bilirubin in the distinction between benign and malignant diseases causing jaundice and cholestasis: results from a prospective study. Scand J Clin Lab Invest. 1993;53(1): 35-9.
18. Zimmerman HJ. Intrahepatic Cholestasis. Arch Intern Med 1979;139:1038-45.
19. Green J, Beyar R, Bomzom L, Finberg JP and Better OS. Jaundice, the circulation and the kidney. Nephron 1984;37:145-52.
20. Greenwood J, Adu J, Davey AJ, Abbott NJ, Bradbury MW. The effect of bile salts on the permeability and ultrastructure of the perfused, energy depleted rat blood brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab 1991;11: 644-54.
21. Notter MFD, Kendig YW. Differential sensitivity of neural cells to bilirubin toxicity. Exper Neurol 1986;94: 670-82.
22. Panahian N, Huang T and Maines MD. Enhanced neuronal expression of the oxidoreductase-biliverdin reductase after permanent focal cerebral ischemia. Brain Res 1999;850: 1-13.
23. Kocić G. Biohemijski i klinički aspekti enzima 5-nukleotidaze u sindromu opstruktivnog ikterusa neinfektivne prirode. Magistarski rad, Niš, 1988.

FOLLOW-UP OF BIOCHEMICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH EXTRAHEPATIC CHOLESTASIS

Sasa Zajic, Zoran Damnjanovic, Miroslav Stojanovic, Milan Visnjic, Srdjan Dencic, Dejan Ilic and Dusan Sokolovic

In cholestasis, due to impossibility of gall flow into duodenum, there occurs subsequent return of gall constituents to hepatocytes and circulation. Extrahepatic cholestasis is the result of mechanic obstacle of gall flow through ductus hepaticus, choledochus or papilla Vateri, leading to the occurrence of manifest icterus. In cases leading to liver damage, hydrophobic gall salts and non-conjugated bilirubins have the most important toxic effects.

The aim of this study was to follow up biochemical parameters, enzyme activity *-GT and AF, bilirubin concentration, total proteins and albumins in blood plasma in patients with different types of extrahepatic cholestasis.

The study included 90 subjects divided into four groups. The first one was control, while the three other groups were formed according to the type of extrahepatic obstruction: the control group (20 healthy subjects), I group (20 patients with intraluminal extrahepatic obstruction -ILH), II group (20 patients with intraluminal obstruction-IMH), III group (30 patients with extraluminarily induced extrahepatic obstruction-ELH).

Significant increase of activity of *-GT and AF in plasma of cholestatic patients was present in comparison to the control group ($p < 0,001$). In plasma of cholestatic patients in the third group, *-GT activity increased in comparison to the first group of patients ($p < 0,05$), while in the first group AF activity decreased in comparison to the second group ($p < 0,05$) and third group ($p < 0,01$) of patients with extrahepatic cholestasis. The levels of total direct and indirect bilirubin in plasma of cholestatic patients increased ($p < 0,001$) when compared to the control group. Concentration of direct and indirect bilirubin in plasma of cholestatic patients of II and III group significantly increased in comparison to the same values in the first group of cholestatic patients. The level of albumin in plasma of cholestatic patients significantly decreased in comparison to the control group. There is a negative correlation of moderate intensity between values of direct bilirubin and albumin in patients with IMH and ELH.

Significant increase of cholestasis markers (*-GT and AF) and bilirubin levels in blood plasma was noticed in patients with extrahepatic cholestasis. The most intense increase was present in patients with ELH. Cholestasis leads to significant disorders of synthetic function of the liver that are manifested by decrease of albumin concentration in plasma and are the most prominent in the patients with intraluminal and extraluminarily cholestasis. *Acta Medica Medianae 2008;47(1):5-12.*

Key words: cholestasis, *-GT, alkaline phosphatase, bilirubin, albumin