

PRAĆENJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA HOLESTAZE I INTENZITETA OKSIDATIVNOG STRESA KOD BOLESNIKA SA HOLEDHOLITIJAZOM

Zoran Damnjanović¹, Aleksandar Nagorni², Gordana Kocić³, Zoran Blagojević⁴, Đorđe Mančić⁵ i Ivana Damnjanović³

Ekstrahepatična holestaza je posledica mehaničke prepreke u oticanju žuči kroz ductus hepaticus, choledochus ili papilu Vateri, što dovodi do pojave manifestnog ikterusa. Najčešće je izazvana holedoholitijazom. Praćena je oštećenjem hepatocita zbog nagomilavanja hidrofobnih žučnih soli i nekonjugovanog bilirubina.

Za ciljeve ovog rada postavljeno je sagledavanje oštećenja ćelija jetre, analiziranje poremećaja hepatobilijarne funkcije i određivanje intenziteta i karakteristika oksidativnog stresa kod bolesnika sa opstruktivnom žuticom, izazvanom holedoholitijazom.

U ispitivanje je bilo uključeno 60 ispitanika podeljenih u dve grupe. Prva je kontrolna grupa (30 zdravih ispitanika), a drugu čini 30 bolesnika sa intraluminalnom ekstrahepatičnom opstrukcijom izazvanom holedoholitijazom. Od biohemijskih parametara holestaze određivani su AST, ALT, GGT i AF, nivoi ukupnog, direktnog i indirektnog bilirubina i koncentracija albumina.

Došlo je do značajnog porasta aktivnosti enzima AST, ALT, GGT i AF u plazmi holestaznih bolesnika, u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$). Nivoi ukupnog, direktnog i indirektnog bilirubina u plazmi bolesnika sa holestazom su povišeni ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu. Nivo albumina u plazmi kod bolesnika sa holestazom je značajno snižen u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Intenzitet oksidativnog stresa, meren kroz nivo lipidne peroksidacije (MDA) i količine oksidativno modifikovanih proteina (karbonilne grupe), značajno je veći kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika ($p < 0,001$).

Kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom izazvanom holedoholitijazom primećeno je višestruko povišenje aktivnosti markera holestaze (ALT, AST, AF i GGT) i pad koncentracije albumina, pri čemu se javlja hiperbilirubinemija mešovitog tipa. Ujedno, javlja se povećan intenzitet oksidativnog stresa. *Acta Medica Medianae* 2008;47(3):21-27.

Ključne reči: holestaza, holedoholitijaza, oksidativni stres, bilirubin, albumini

Sanofi Aventis u Beogradu, Srbija¹
Klinika za gastroenterologiju Kliničkog centra u Nišu²
Medicinski fakultet u Nišu³
Interno odeljenje, Vojna bolnica u Nišu⁴
Odeljenje za hirurške bolesti, Vojna bolnica u Nišu⁵

Kontakt: Zoran Damnjanović
Sanofi Aventis
11000 Beograd

Uvod

Holestaza je poremećaj funkcije jetre nastao zbog prestanka oticanja žuči žučnim putevima u tanko crevo (1). Opstruktivni ikterus nastaje kao posledica ekstrahepatične opstrukcije usled mehaničke prepreke u oticanju žuči kroz ductus hepaticus, ductus choledochus ili papilu Vateri. To je zastojna, opstruktivna ili ekstrahepatična holestaza, koja nastaje na bilo kom nivou, počevši od levog i desnog hepatičnog voda pa sve do uliva zajedničkog žučnog kanala u ampulu Vateri. Žučni kamenci, tumori, upalni eksudat ili paraziti mogu dovesti do začepjenja

žučnih vodova. Pomenuta opstrukcija na bilo kom delu bilijarnog trakta dovodi do biohemijskog sindroma holestaze i kliničkih manifestacija opstruktivnog ikterusa (2). Najčešći uzrok ekstrahepatične holestaze je prisustvo kalkulusa u glavnom žučnom vodu (3).

U kliničkoj slici ekstrahepatične holestaze javlja se bol tipa kolike, ali nekada taj bol može biti tup, lokalizovan u gornje-desnom delu trbuha i u predelu epigastriuma, 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. Ako se pored opstrukcije, razvije i holangitis, javlja se Charcotov trijas bol, povišena telesna temperatura (jeza, drhtavica), kao i žutica (4).

Biohemijski poremećaji su posledica porasta vrednosti konjugovanog bilirubina. Kod protrahovane parcijalne opstrukcije zbog oštećenja hepatocita hiperbilirubinemija je mešovita, konjugovana i nekonjugovana (4). Tokom holestaze dolazi do porasta aktivnosti membranskih enzima u plazmi

(γ -glutamilttransferaze, alkalne fosfataze, 5'-nukleotidaze) usled retencije žučnih soli koje vrše solubilizaciju membrane, što dovodi do izlaska pomenutih enzima u cirkulaciju. Takođe, u plazmi holestaznih bolesnika je povišena aktivnost enzima iz hepatocita (alanin aminotran-sferaze - ALT i aspartat aminotransferaze AST), zbog povećane propustljivosti ćelijske membrane ili nekroze (5).

Hipoalbuminemija ukazuje na oštećenje jetre i njenu sniženu sposobnost za sintezu belančevina. U teškim oštećenjima jetre javlja se hipoglikemija zbog smanjene glikogenolize. Oštećenje CNS-a u uslovima holestaze, posledica je hiperbilirubinemije i hipoksije.

Oksidativni stres je proces oštećenja tkiva delovanjem slobodnih radikala. Oni imaju sposobnost oštećenja skoro svih biomolekula u ćeliji (6). U fiziološkim uslovima, u organizmu postoji balans između stvaranja slobodnih radikala i antioksidativne odbrane, čime se sprečava pojava oksidativnog stresa. Lipidna peroksidacija nezasićenih masnih kiselina, delovanjem slobodnih radikala, nepovoljan je i negativan proces koji je praćen masivnim oštećenjem lipidnih membrana ćelija. Ona izaziva porast membranske propustljivosti plazma membrane hepatocita (7). Parola i saradnici (1996) su detektovali povećan nivo lipidne peroksidacije (MDA) i oksidativne modifikacije proteina (karbonilne grupe) u jetri pacova sa opstrukcijom zajedničkog žučnog kanala (8). Takođe, brojne druge studije dokazuju intenzivniji oksidativni stres u plazmi i tkivu jetre kod životinja sa eksperimentalno izazvanom holestazom (9,10,11).

Osnovne metode u morfološkoj dijagnostici ekstrahepatično uzrokovanog opstruktivnog ikterusa su: ultrazvuk (UZ), kompjuterizovana tomografija (CT) i magnetna rezonanca (NMR). Ultrazvuk je najjeftinija, najbezbednija i veoma senzitivna tehnika za prikazivanje hepatobiliopankreatičnog sistema i predstavlja idealnu skrining metodu (12).

Imajući sve ovo u vidu, značajan interes u ovom istraživanju posvećen je rasvetljavanju promena u aktivnosti enzima markera holestaze, koncentraciji bilirubina i albumina u krvnoj plazmi, kao i intenzitet oksidativnog stresa meren kroz nivo malondialdehida (MDA - sekundarnog produkta lipidne peroksidacije) i koncentraciju karbonilnih grupa (oksidativna modifikacija proteina) bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom izazvanom holedoholitijazom.

Cilj rada

Za ciljeve ovog rada postavljeno je:

- sagledavanje oštećenja ćelija jetre u toku ekstrahepatične holestaze izazvane holedoholitijazom, kroz praćenje aktivnosti hepatičnih enzima (aspartat aminotransaminaze - AST, alanin aminotransaminaze - ALT, γ -glutamilttransferaze - γ -GT i alkalne fosfataze - AF) i koncentraciju albumina u krvnoj plazmi,
- analiziranje poremećaja hepatobilijarne funkcije jetre kroz praćenje poremećaja koncentracija bilirubina u plazmi holestaznih bolesnika,

- određivanje intenziteta i karakteristika oksidativnog stresa kod bolesnika sa opstruktivnom žuticom, izazvanom holedoholitijazom.

Ispitanici i metode

Opšti metodološki pristup je komparacija podataka dobijenih prospektivnom i retrospektivnom analizom anamnestičkih podataka i kliničko-biohemijskih pokazatelja.

U ispitivanje je bilo uključeno 60 ispitanika podeljenih u dve grupe: *I grupa* - 30 bolesnika sa opstruktivnom žuticom izazvanom holedoholitijazom; *II grupa* - 30 zdravih ispitanika.

Da bi se izbegao uticaj različitih patoloških procesa koji mogu dovesti do opstruktivne žutice, u ispitivanje su bili uključeni samo bolesnici sa ekstrahepatičnom holestazom koja je nastala usled mehaničke prepreke izazvane holedoholitijazom (bilirubinski, holesterolski, mešoviti). Opstrukcije žučnih puteva izazvane drugim faktorima nisu uzete u razmatranje.

Dijagnoza opstruktivnog ikterusa je postavljana na osnovu anamnestičkog nalaza, kliničke slike, biohemijskih i kliničkih metoda dijagnostikovanja (ultrazvučnog pregleda žučnih puteva).

Svi ispitanici su anamnestički i klinički sagledani na Internom odeljenju Vojne bolnice u Nišu. Ispitivanje bolesnika sprovedeno je tokom 2007/2008. godine. Osnovni biohemijski pokazatelji i parametri oksidativnog stresa bili su određivani u Biohemijskoj laboratoriji Vojne bolnice u Nišu i laboratoriji Instituta za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu.

Aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze, alkalne fosfataze (AF), γ -glutamilttransferaze (γ -GT) određivana je u plazmi bolesnika. Aktivnost enzima je izražavana u jedinicama na litar plazme (U/L).

Nivo *bilirubina* i količina albumina određivani su u plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom opstrukcijom. Koncentracija bilirubina u plazmi izražavana je u $\mu\text{mol/L}$, a albumina u g/l.

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

Količina *malondialdehida* (MDA), krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije u tkivu jetre određivan je reakcijom s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) (13).

Koncentracija *karbonilnih grupa*, kao mera oksidativne modifikacije proteina, određivana je spektrofotometrijskom metodom, upotrebom 2.4 dinitrophenilhidrazinom (DPNH) - tradicionalnog karbonil reagensa (14).

Podaci su obrađeni korišćenjem standardnih deskriptivnih statističkih metoda (srednja vrednost i standardna devijacija). U radu je primenjen Student-ov t test za uparene i neuparene uzorke. Obrada dobijenih podataka izvršena je korišćenjem statističkog programskog paketa Statistical Package for Social Science (SPSS) softverom, verzija 11,0 u Windows 2000 okruženju, pri čemu su rezultati prikazani tabelarno i grafički.

Rezultati

Ukupno je ispitano 30 bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom izazvanom holedoholitijazom i 30 kontrolnih ispitanika. Osnovne karakteristike prikazane su u Tabeli 1.

Tabela 1. Opšte karakteristike ispitanika

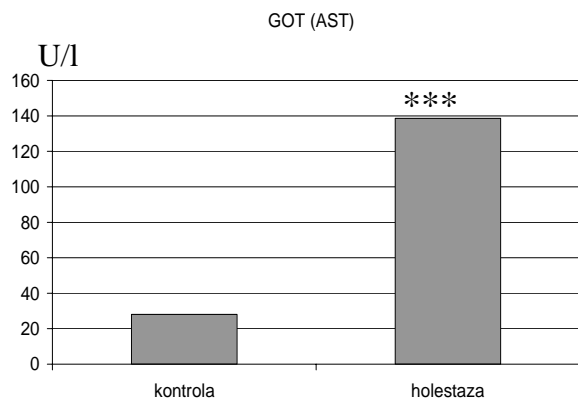
	broj	%	muškarci	žene	starost (god.)
holestaza	30	50	16	14	60,2±14,6
kontrola	30	50	19	11	54,5±15
ukupno	60	100	35 (58,3%)	25 (41,7%)	57,3±14,8

NS. za sve parametre

Od ispitivanog broja bolesnika, 35 (58,3%) je bilo muškog, a 25 (41,7%) ženskog pola. Statistička analiza je pokazala ravnomernu polnu distribuciju u ispitivanim grupama. Prosečna starost ispitanika je bila 57,35±14,8 godina. Nije bilo statistički značajne razlike u starosti između polova.

Ispitivanje markera holestaze obuhvatilo je analizu aktivnosti enzima GOT (AST), GPT (ALT), AF i γ -GT, kao i nivo ukupnog i direktnog bilirubina.

Aktivnost enzima GOT (AST) u krvnoj plazmi u ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 1. Kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom izazvanom holedoholitijazom, došlo je do značajnog porasta aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu grupu (138,61±81,55 U/l u odnosu na 28,07±8,07 U/l; $p < 0,001$) (Grafikon 1).

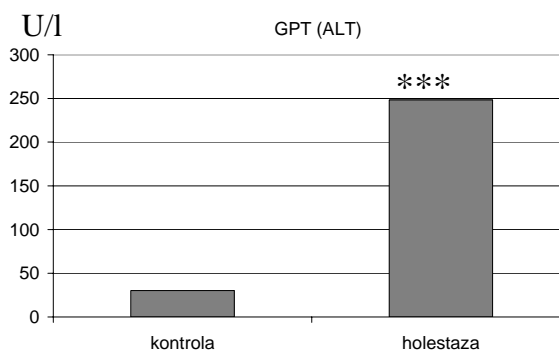


*** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolu

Grafikon 1. Aktivnost enzima GOT (AST) u krvnoj plazmi u ispitivanim grupama

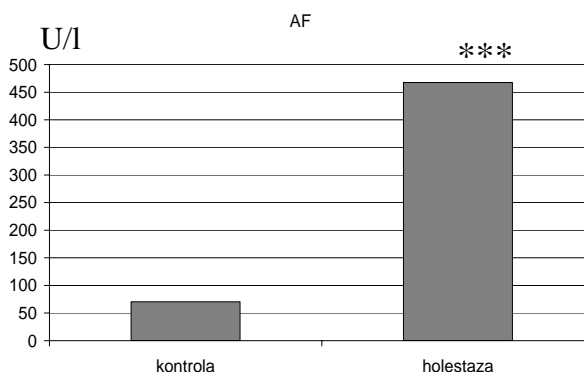
Na Grafikonu 2. prikazana je aktivnost GPT (ALT) u plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom. Kod bolesnika sa holestazom izazvanom holedoholitijazom, došlo je do značajnog porasta aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu grupu (248,24±154,23 U/l u odnosu na 30,2±10,49 U/l; $p < 0,001$) (Grafikon 2).

Na Grafikonu 3. prikazana je aktivnost alkalne fosfataze (AF) u plazmi bolesnika sa holestazom. Kod bolesnika sa holestazom došlo je do višestrukog porasta aktivnosti pomenutog enzima u odnosu na kontrolnu grupu (467,62±141,32 U/l u odnosu na 70,43±18,66 U/l; $p < 0,001$) (Grafikon 3).



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

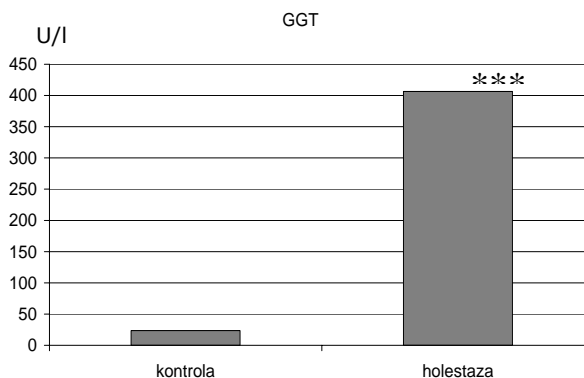
Grafikon 2. Aktivnost enzima GPT (ALT) u ispitivanim grupama



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

Grafikon 3. Aktivnost enzima alkalne fosfataze (AF) u ispitivanim grupama

Aktivnost enzima γ -GT u plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom izazvanom holedoholitijazom, prikazana je na Grafikonu 4. Rezultati pokazuju da je došlo do značajnog porasta aktivnosti ovog enzima u plazmi holestaznih bolesnika (406,45±266,17 U/l u odnosu na kontrolu 23,78±8,45 U/l; $p < 0,001$) (Grafikon 4).

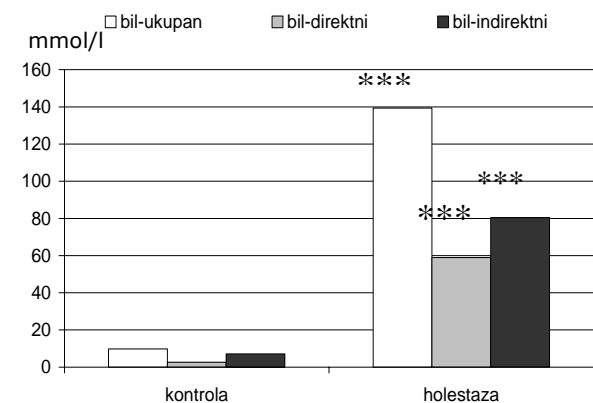


*** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolu

Grafikon 4. Aktivnost enzima γ -glutamil transferaze (GGT) u krvnoj plazmi ispitanika

Nivoi ukupnog, direktnog i indirektnog bilirubina u krvnoj plazmi kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom su statistički znatno povišeni ($p < 0,001$) u odnosu na vrednosti kod kontrolnih bolesnika (ukupni - 139,4±72,60 μ mol/l u odnosu na 9,8±2,1 μ mol/l, direktni - 59,0±34,33 μ mol/l u odnosu na 2,7±1,03 μ mol/l,

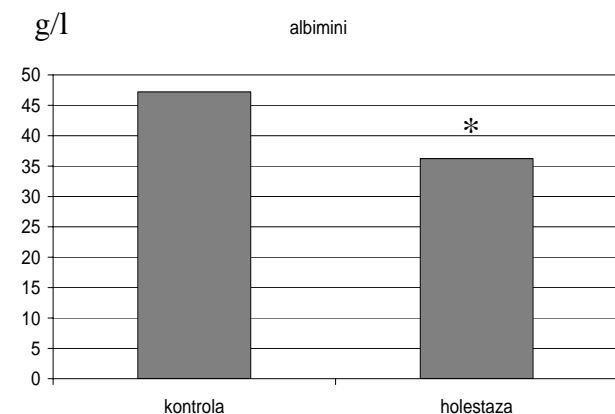
indirektni - $80,4 \pm 34,63 \mu\text{mol/l}$ u odnosu na $7,1 \pm 1,44 \mu\text{mol/l}$) (Grafikon 5).



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

Grafikon 5. Koncentracija bilirubina (mmol/l) u krvnoj plazmi kontrolne i holestazne grupe

Nivo albumina u krvnoj plazmi kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom izazvanom holedoholitijazom je statistički značajno snižen u odnosu na kontrolu ($36,25 \pm 6,81 \text{ g/l}$ u odnosu na $47,24 \pm 4,22 \text{ g/l}$; $p < 0,05$) (Grafikon 6).



* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu

Grafikon 6. Nivo albumina (g/l) u krvnoj plazmi kontrolnih i holestaznih ispitanika

Intenzitet oksidativnog stresa je meren kroz: krajnji produkt lipidne peroksidacije (malondialdehid - MDA) i količinu oksidativno modifikovanih proteina (karbonilne grupe) i prikazan je u Tabeli 2.

Tabela 2. Intenzitet oksidativnog stresa u ispitivanim grupama

parametri oksidativnog stresa	ekstrahepatična holestaza	kontrola
MDA ($\mu\text{mol/l}$)	$55,1 \pm 25,3^{***}$	$20,15 \pm 2,4$
karbonilne grupe ($\mu\text{mol/g prot.}$)	$9,2 \pm 2,55^{***}$	$5,3 \pm 1,2$

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

Vrednosti MDA i karbonilnih grupa bile su značajno veće kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Diskusija

U holestaznom sindromu hidrofobne žučne soli i nekonjugovani bilirubin imaju najznačajnije toksične efekte na parenhim jetre (1). Najveći procenat kod intraluminalne opstrukcije žučnih kanala pripada holedoholitijazi. Najčešći uzrok intramuralne opstrukcije su akutni holecistopankreatitis i tumori duktus holedohus-a, dok su najčešći razlozi za ekstraluminalnu opstrukciju žučnih vodova akutni kalkulozni holecistitis i tumori glave pankreasa (2).

U ispitivanom uzorku bolesnika sa ekstrahepatičnom opstrukcijom izazvanom holedoholitijazom nije postojala značajnija razlika u polnoj distribuciji (Tabela 1).

Prema rezultatima populacionih studija na Tajvanu, ukupna prevalenca kalkuloze žučne kese iznosi 5,0%, pri čemu je približno slično zastupljena kod muškaraca - 4,6% i žena - 5,4% (15). Slične rezultate iznose studije sprovedene u Americi, koje prevalencu kalkuloze procenjuju na 5,9 - 21,9%, dok je ovaj procenat čak i nešto veći u evropskim zemljama 10 do 20%, ali bez značajnije razlike između polova (16). Najnovije studije sprovedene u Nemačkoj ukazuju da je najveća prevalenca ove bolesti u razdoblju od 70-79 godina života (17).

Tok holedoholitijaze nije najbolje izučen. Iako su komplikacije vrlo česte i ozbiljne, smatra se da manje od 50% bolesnika sa kalkulozom žučnih puteva razvije simptome i da više od 20% ovih kamenova prođe spontano (18,19).

Aktivnosti enzima AST i ALT kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom su značajno povišene u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$) (Grafikoni 1 i 2). Dobijeni rezultati ukazuju na to da u uslovima holestaze toksične žučne kiseline nakupljene u jetri oštećuju membranu hepatocita (svojim deterdžentskim dejstvima) i dovode do izlaska citozolarnog ALT u cirkulaciju (20). Ovo je u skladu sa nalazima drugih autora koji navode da je aktivnost transaminaza značajno povećana u svim stanjima sa holestazom (21). Nešto veći porast ALT se objašnjava činjenicom da je ALT specifičniji enzim jetre, jer ga u ostalim organima ima relativno malo, za razliku od AST-a. ALT je citozolarni enzim hepatocita, tako da i kod manjih oštećenja tkiva jetre izlazi u cirkulaciju, dok je AST prisutan u mitohondrijama (60-70 %) i citozolu (30-40 %) hepatocita te je potrebno veće oštećenje hepatocita da bi se ispoljio porast ovog enzima u plazmi (22).

Enzim alkalna fosfataza (AF) spada u enzime koji čine integralni deo ćelijske membrane. Vrednosti AF kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom izazvanom holedoholitijazom su skoro 7 puta povišene u odnosu na kontrolne ispitanike ($p < 0,001$) (Grafikon 3). Ovo je u skladu sa nalazima da je povećanje alkalne fosfataze

mного sigurniji indikator bilijarne opstrukcije, naročito kod nekompletne i segmentne opstrukcije, gde vrednosti bilirubina ostaju normalne, te da vrednost alkalne fosfataze, a ne transaminaza (AST i ALT), pokazuje veći skok kod opstruktivne žutice (23). Oboljenja jetre i žučnih kanala praćena su povećanjem aktivnosti AF, koje je naročito karakteristično za sindrom holestaze. Ranije je dokazano da u holestazi, žučne soli indukuju sintezu novih molekula AF (24).

Enzim γ -GT je lokalizovan na plazma membranama (naročito na epitelu žučnih kanala), dok je manje prisutan u citozolu i mikrozmima hepatocita. Sa kliničkog aspekta, aktivnost γ -GT u serumu je najosetljiviji pokazatelj oštećenja hepatobilijarnog sistema. Kod bolesnika sa opstruktivnom holestazom izazvanom holedoholitijazom, aktivnost ovog enzima u serumu pokazuje višestruki porast (skoro 20 puta) u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$) (Grafikon 4). Ovako značajno povišenje aktivnosti γ -GT u plazmi bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom u toku ove studije, može se objasniti na više načina. Hidrofobne žučne kiseline svojim deterdžentskim dejstvom na membranu hepatocita, dovode do oslobađanja ovog enzima u cirkulaciju. U holestazi, zbog regurgitacije konstituenata žuči u krv, povećava se aktivnost γ -GT u serumu. 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 (22, 25).

Usled mehaničke prepreke u žučnim kanalima, dolazi do retencije žučnih boja u cirkulaciju i javlja se hiperbilirubinemija konjugovanog tipa (26).

Pošto je ekskrecija bilirubina iz hepatocita limitirajući stupanj u njegovom metabolizmu u odnosu na konjugaciju, u početku holestaze, pri oštećenjima manjeg stepena uvek predomina hiperbilirubinemija konjugovanog tipa. Kasnije, pri napredovanju i pogoršavanju patološkog procesa, u krvnoj plazmi se povećava i koncentracija nekonjugovanog bilirubina (27). Kako se može zapaziti iz Grafikona 5, kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom došlo je do značajnog porasta vrednosti ukupnog, konjugovanog, kao i nekonjugovanog bilirubina u plazmi u odnosu na kontrolne ispitanike ($p < 0,001$). 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 (27).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je nivo albumina u krvnoj plazmi holestaznih bolesnika snižen u odnosu na kontrolne ispitanike ($p < 0,05$) (Grafikon 6). 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 krizom energetskog metabolizma u

hepatocitima i smanjenjem količine ATP u mitohondrijama. Proces oksidativne fosforilacije izmenjen je usled narušavanja strukturne organizacije mitohondrijalne membrane atakom hidrofobnih žučnih soli (28).

Rezultati dobijeni istraživanjima u ovoj studiji pokazuju značajan statistički porast nekonjugovanog bilirubina (Grafikon 5) i smanjenje nivoa albumina (Grafikon 6) u plazmi holestaznih bolesnika, u odnosu na iste vrednosti kod kontrolnih ispitanika. Iz svega ovoga, može se dati pretpostavka da usled smanjenog nivoa albumina u plazmi, deo nekonjugovanog bilirubina može se naći u slobodnom stanju i ispoljavati toksične efekte.

Intenzitet oksidativnog stresa meren kroz vrednosti MDA i karbonilnih grupa bio je značajno veći kod bolesnika sa holestazom ($p < 0,001$) (Tabela 2). Dobijeni rezultati u ovom eksperimentalnom istraživanju u skladu su sa literaturnim podacima u već pomenutim i sličnim studijama eksperimentalno izazvane holestaze. Hidrofobne žučne kiseline, zadržane u hepatocitima tokom holestaze, dovode do stvaranja slobodnih radikala, što dovodi do lipidne peroksidacije i oksidativne modifikacije proteina, kao i do posledičnog gubitka vitalnosti i funkcije ćelija jetre (29,30,31). Sokol i saradnici (2001) su pokazali da toksične žučne kiseline zadržane u hepatocitima tokom holestaze, povećavaju intenzitet oksidativnog stresa i dovode do trajnog gubitka sposobnosti ćelija za život (9). Ovo je posledica prekida respiratornog lanca i inhibicije sinteze ATP-a, sa sledstvenom nekrozom ili apoptozom (29). Yerushalmi i saradnici (2001) su zabeležili da i relativno niske koncentracije žučnih kiselina dovode do oksidativnog stresa u ćelijama (koji prethodi apoptozi), a takođe je primećena značajna pozitivna linearna koleracija između apoptoze i nivoa MDA (10).

U *in vitro* studiji Sreejayana i sar. (1999), dokazano je da taurodezoksiholna hidrofobna žučna kiselina dovodi do povišenja nivoa lipidne peroksidacije izazvane Fe^{2+} . Ovaj porast je bio trostruki tokom početne faze inkubacije, što može da sugeriše da žučne kiseline mogu da pokrenu inicijaciju i lančanu propagaciju peroksidacije. Hidrofobne žučne kiseline promovisu stvaranje hidroksilnog radikala i intenziviraju lipidnu peroksidaciju (6).

Zaključci

1. Kod bolesnika sa ekstrahepatičnom holestazom izazvanom holedoholitijazom primećeno je višestruko povišenje aktivnosti markera holestaze (ALT, AST, AF i γ -GT) i pad koncentracije albumina.
2. Usled ekstrahepatične holestaze javlja se hiperbilirubinemija mešovito tipa.
3. Kod bolesnika sa opstruktivnim ikerusom izazvanim holedoholitijazom, javlja se povećan intenzitet oksidativnog stresa (lipidne peroksidacije i oksidativne modifikacije proteina) u plazmi.

Literatura

- Kullak-Ublick G, Maier P. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 2000; 4(2): 357-85.
- Heathcote EJ. Diagnosis and management of cholestatic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5(7):776-82.
- Benjamin IS. Bening and malignant lesions of the biliary tract. In: Garden OJ (ed.) *Hepatobiliary and pancreatic surgery*. New York, London: WB Saunders, 1997. pp. 201-258.
- Maffei M, Hadengue A. Cholestasis in adults. 2. Clinical signs and symptomatic treatment. *Rev Med Suisse* 2006;2(77):1969-71.
- Collier J, Bassendine M. How to respond to abnormal liver function tests. *Clin Med* 2002; 2(5):406-9.
- Sreejayan N, Von Ritter C. Lipid peroxidation in bile: the role of hydrophobic bile acids and the effect on biliary epithelial cell function. *Patophysiology* 1999; 5(4): 225-32.
- Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278(6): G992-G999.
- Parola M, Leonarduzzi G, Robino G et al. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 (3): 351-59.
- Sokol RJ, Straka MS, Dahl R et al. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr Res* 2001; 49 (4): 519-31.
- Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW et al. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001; 33(3): 616-26.
- Shivaram KN, Winkhofer-Roob BM, Straka MS et al. The effect of idebenone, a coenzyme Q analogue, on hydrophobic bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(4-5): 480-92.
- Watanabe Y, Nagayama M, Okumura A, Amoh Y, Katsube T, Suga T, Koyama S, Nakatani K, Dodo Y. MR imaging of acute biliary disorders. *Radiographics* 2007;27(2):477-95.
- Stroev EA and Makarova VG. *Laboratory manual in biochemistry*. Mir Publishers Moscow 1989; 251-55.
- Levine RL, Williams JA, Stadman ER, Shacter E. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;233:246-57.
- Chen CH, Huang MH, Yang JC, Nien CK, Etheredge GD, Yang CC, Yeh YH, Wu HS, Chou DA, Yueh SK. Prevalence and risk factors of gallstone disease in an adult population of Taiwan: an epidemiological survey. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(11):1737-43.
- Aerts R, Penninckx F. The burden of gallstone disease in Europe. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18(supplement 3): 49e-53e
- Vo lzke H, Baumeister SE, Alte D, Hodmann W, Schwahn C, Simon P, et al. Independent risk factors for gallstone formation in a region with high cholelithiasis prevalence. *Digestion* 2005;71:97-105.
- 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;239:28-33.
- Caddy GR, Kirby J, Kirk SJ, Allen MJ, Moorehead RJ, Tham TC. Natural history of asymptomatic bile duct stones at time of cholecystectomy. *Ulster Med J* 2005;74:108-12.
- 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.
- Topić E. *Bolesti jetre. U Medicinsko biohemijska dijagnostika u kliničkoj praksi*. Zagreb. Medicinska naklada, 2004.
- Koraćević D. *Enzimi. U: Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G. Biohemija, Savremena administracija, Beograd, 1996. pp. 1-162.*
- Collier J, Bassendine M. How to respond to abnormal liver function tests. *Clin Med* 2002; 2:406-9.
- Alvaro D, Benedetti A, Marucci L, Delle Monache M, Monterubbianesi R, Di Cosimo E, et al. The function of alkaline phosphatase in the liver: regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. *Hepatology*. 2000;32(2):174-84.
- Sokolović D. *Biohemijski aspekti holestaze sa osvrtom na metabolizam poliamina*. Magistarski rad. Medicinski fakultet Niš, 2004.
- Phillips J, Poucell S, Oda M. Mechanisms of Cholestasis. *Laboratory Investigation* 1986;54(6):593-608.
- Zimmerman HJ. Intrahepatic Cholestasis. *Arch Intern Med* 1979;139:1038-45.
- Kocić G. *Biohemijski i klinički aspekti enzima 5-nukleotidaze u sindromu opstruktivnog ikterusa neinfektivne prirode*. Magistarski rad, Niš, 1988.
- Rodrigues CM and Steer CJ. Mitochondrial membrane perturbation in cholestasis. *Hepatology* 2000;32:135-41.
- Nikolic J, Cvetkovic T, Sokolovic D, Jevtovic T, Bjelakovic G, Djordjevic J. Uticaj azotemije na aktivnost arginaze jetre u akutnom oštećenju bubrega. *Acta Medica Medianae* 2002; 4: 1-8.
- Sokolović D, Bjelaković G, Nikolić J, Kocić G, Đinđić B, Pavlović D, Radić S, Bašić J, Jović M, Koutsonanos D. Uticaj putrescina na intenzitet lipidne peroksidacije u moždanom tkivu pacova sa holestazom. *Acta Medica Medianae* 2006; 45(2): 45-51.

FOLLOW-UP OF BIOCHEMICAL PARAMETERS AND INTENSITY OF OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH EXTRAHEPATIC CHOLESTASIS

Zoran Damjanovic, Aleksandar Nagorni, Gordana Kocic, Zoran Blagojevic, Djordje Mancic and Ivana Damjanovic

In cholestasis, due to impossibility of gall flow into duodenum, there occurs a 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 the biochemical parameters, enzyme activity AST, ALT, γ -GT and AF, bilirubin concentration and albumins, and intensity of oxidative stress in blood plasma in patients with different types of extrahepatic cholestasis.

The study included 60 subjects divided into two groups. The first one was control group (30 healthy subjects), while II group involved 30 patients with intraluminal extrahepatic obstruction.

Significant increase of enzyme activity of AST, ALT, γ -GT and AF in plasma of cholestatic patients was present in comparison to the control group ($p < 0,001$). The levels of total direct and indirect bilirubin in plasma of cholestatic patients increased ($p < 0,001$) when compared to the control group. The level of albumin in plasma of cholestatic patients significantly decreased in comparison to the control group ($p < 0,05$). The intensity of oxidative stress measured through the levels of malondialdehyde (MDA) and carbonyl group concentration in plasma of cholestatic patients increased ($p < 0,001$) when compared to the control group.

Significant increase of cholestasis enzyme markers (AST, ALT, γ -GT and AF) and bilirubin levels in blood plasma was noticed in patients with extrahepatic cholestasis. Cholestasis leads to significant disorders of synthetic function of the liver that are manifested by decrease of albumin concentration in plasma. *Acta Medica Medianae 2008;47(3):21-27.*

Key words: cholestasis, choledocholithiasis, oxidative stress, bilirubin, albumin